



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL
CENTER I.A.P.

ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
CULTIVOS PRIMARIOS DE PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA Y OBESIDAD

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

P R E S E N T A

DR. DANIELA SHVEID GERSON

ASESOR DE TESIS:

DR. MOISÉS MERCADO ATRI

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:

DR. FRANCISCO MORENO SÁNCHEZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Agosto 2019



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.

AUTORIZACIONES

Dr. JUAN OSVALDO TALAVERA

Jefe de la División de Enseñanza e Investigación

Centro Médico ABC

División de Estudios de Postgrado Facultad de Medicina U.N.A.M

DR. FRANCISCO MORENO SÁNCHEZ

Profesor Titular del Curso de Especialización en Medicina Interna

Centro Médico ABC

División de Estudios de Postgrado Facultad de Medicina U.N.A.M

DR. MOISÉS MERCADO ATRI

Asesor de tesis

Médico Especialista en Medicina Interna y Endocrinología con Post - Doctorado en
Endocrinología Molecular

Centro Médico ABC

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros, por su constante ayuda y sabiduría.

A mi familia, por su apoyo incondicional y su interés.

A mi esposo, por el primero de muchos logros juntos.

“La ciencia encarna el deseo humano de entender la naturaleza; la tecnología conjuga ese deseo con la ambición de controlarla.”

- *Siddhartha Mukherjee, El emperador de todos los males: Una biografía del cáncer*

“La ciencia moderna es una tradición única de conocimiento, por cuanto admite abiertamente ignorancia colectiva en relación los las cuestiones más importantes.”

- *Yuval Noah Harari, De animales a dioses: Breve historia de la humanidad*

ÍNDICE

TEMÁTICO

ÍNDICE	1
TEMÁTICO	1
TABLAS	4
GRÁFICAS	5
IMÁGENES	6
1. RESUMEN	12
2. GLOSARIO	14
3. INTRODUCCIÓN	19
4. MARCO TEÓRICO.....	20
4.1 CÁNCER	20
4.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA.....	21
4.3. IMPACTO DEL SOBREPESO COMO FACTOR PRONÓSTICO NEGATIVO EN CÁNCER DE MAMA.....	24
4.4. MODELOS EXPERIMENTALES EN EL ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA	25
4.5. REPRODUCIBILIDAD DEL MODELO BIOLÓGICO EN RATONES ATÓMICOS	26
4.6. CULTIVOS PRIMARIOS EN EL ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA.....	27
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31
7. HIPÓTESIS METODOLÓGICA DE INVESTIGACIÓN.....	32
8. OBJETIVOS	33
8.1. OBJETIVO GENERAL.....	33
8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
9. METODOLOGÍA.....	35
9.1. TIPO Y DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO.....	35
9.2. GRUPO DE ESTUDIO	35

9.3. GRUPO DE CONTROLES	35
9.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	35
9.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	38
9.6. UNIVERSO DE ESTUDIO, SELECCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA, UNIDAD DE ANÁLISIS Y OBSERVACIÓN	39
9.7. CÁLCULO DE LA MUESTRA	40
9.8. CREACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS	44
9.9. INOCULACIÓN EN RATONES ATÓMICOS	44
9.10. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA (MOTILIDAD)	46
9.11. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	47
9.12. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	48
9.13. MEDIO CONDICIONADO	48
9.14. OBTENCIÓN DE CÉLULAS HUVEC	50
9.15. ENSAYO DE ADHESIÓN Y LECTURA POR CONTADOR DE CENTELLEO	52
9.16. ENSAYO DE ADHESIÓN Y LECTURA POR XCELLIGENCE	53
9.17. PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN, INSTRUMENTOS A UTILIZAR Y MÉTODOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS DATOS	53
9.18. PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: MÉTODOS Y MODELOS DE ANÁLISIS DE LOS DATOS SEGÚN TIPO DE VARIABLES	53
9.19. PROGRAMAS A UTILIZAR PARA ANÁLISIS DE DATOS	54
10. ASPECTOS ÉTICOS	55
10.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS	55
10.2. PROCEDIMIENTOS PARA GARANTIZAR ASPECTOS ÉTICOS EN LAS INVESTIGACIONES CON SUJETOS HUMANOS O ANIMALES	56
11. RESULTADOS	58
11.1. CULTIVOS CELULARES	58
11.2. INOCULACIÓN DE RATONES ATÓMICOS	94
11.3. PATOLOGÍA	96
11.4. ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN	102
11.5. ÍNDICE DE CITOTOXICIDAD	103
11.6. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA / MOTILIDAD	108
11.7. MEDIO CONDICIONADO	109
11.7.1. CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR BRADFORD	109
11.8. ENSAYO DE ADHESIÓN Y LECTURA; CONTADOR DE CENTELLEO .	111

11.9. ENSAYO DE ADHESIÓN Y LECTURA: XCELLIGENCE.....	113
11.10.GENOTIPIFICACIÓN	116
12. DISCUSIÓN	125
13. CONCLUSIONES	130
14. BIBLIOGRAFÍA	131
15. PRESUPUESTO.....	138
16. ANEXOS	141
16.1 ANEXO 1.....	141
16.2 ANEXO 2.....	144
16.3 ANEXO 3.....	147

TABLAS

Tabla 1.- Operacionalización de variables.....	38
Tabla 2.- Cuantificación de proteína.....	110
Tabla 3.- Ensayo de adhesión y lectura; por contador de centelleo.....	112
Tabla 4.- Resultado de la genotipificación realizado en el INMGEN	124

GRÁFICAS

Gráfica 1.- Curva de proliferación de DSG – BC1 e imágenes mostrando crecimiento y expansión celular diaria	102
Gráfica 2.- Curva de proliferación de DSG – BC2 e imágenes mostrando crecimiento y expansión celular diaria.	103
Gráfica 3.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 con doxorubicina e imágenes muerte celular diaria.....	104
Gráfica 4.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 con doxorubicina e imágenes muerte celular diaria.....	104
Gráfica 5.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC2 con doxorubicina e imágenes muerte celular diaria.....	105
Gráfica 6.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC2 con doxorubicina e imágenes muerte celular diaria.....	105
Gráfica 7.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 con paclitaxel e imágenes muerte celular diaria.....	106
Gráfica 8.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 con paclitaxel e imágenes muerte celular diaria.....	106
Gráfica 9.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC2 con paclitaxel e imágenes muerte celular diaria.....	107
Gráfica 10.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC2 con paclitaxel e imágenes muerte celular diaria.....	107
Gráfica 11.- Cuantificación de proteínas en medios condicionados.....	110
Gráfica 12.- Cuantificación de proteínas por Bradford	110
Gráfica 13.- Impedancia monocapa de células HUVEC	114
Gráfica 14.- Índice celular por xCelligence	114
Gráfica 15.- Control, DSG – BC1 vs DSG – BC2 en ensayo de adhesión por xCelligence	115

IMÁGENES

Imagen 1.- Pacientes sometidas a mastectomía	42
Imagen 2.- Pacientes sometidas a mastectomía posterior al establecimiento de la metodología de toma de explantes	43
Imagen 3.- Ensayos de tumorigénesis.....	45
Imagen 4.- Ensayos de tumorigénesis.....	45
Imagen 5.- Ensayos de tumorigénesis.....	46
Imagen 6.- Proliferación celular	47
Imagen 7.- Ensayos con medio condicionado.....	49
Imagen 8.- Ensayos con medio condicionado.....	49
Imagen 9.- Ensayos con medio condicionado.....	50
Imagen 10.- Ensayos con medio condicionado.....	50
Imagen 11.- Ensayos con medio condicionado.....	50
Imagen 12.- Ensayos con medio condicionado.....	50
Imagen 19.- Incubar en agua tibia 10 minutos, homogeneizar y sacar líquido	52
Imagen 20.- Lavar con PBS	52
Imagen 21.- Sembrar en placas	52
Imagen 22.- Base de datos	59
Imagen 23.- Base de datos posterior a la estandarización de la metodología de toma de cultivos.....	60
Imagen 24.- Periodo de capacitación	64
Imagen 25.- Periodo de capacitación	64
Imagen 26.- Periodo de capacitación	64
Imagen 27.- Periodo de capacitación	64
Imagen 28.- Metodología cultivos celulares	65
Imagen 29.- Separación celular.....	65
Imagen 30.- Utilización de colagenasa	66

Imagen 31.- Utilización de colagenasa	66
Imagen 32.- Aros de clonación	67
Imagen 33.- Aros de clonación	67
Imagen 34.- Congelación de viales	67
Imagen 35.- Toma de explantes	68
Imagen 36.- Toma de explantes	68
Imagen 37.- Toma de explantes	68
Imagen 38.- Toma de explantes	68
Imagen 39.- Toma de explantes	68
Imagen 40.- Marcaje de bordes.....	69
Imagen 41.- Marcaje de bordes.....	69
Imagen 42.- Marcaje de bordes.....	69
Imagen 43.- Cuidado general de cultivos	70
Imagen 44.- Cuidado general de cultivos	70
Imagen 45.- Cuidado general de cultivos	70
Imagen 46.- Cuidado general de cultivos	70
Imagen 47.- Cuidado general de cultivos	70
Imagen 48.- Tejido mamario normal 1	71
Imagen 49.- Tejido mamario normal 1	71
Imagen 50.- Tejido mamario normal 1	71
Imagen 51.- Cáncer de mama 2	72
Imagen 52.- Cáncer de mama 2	72
Imagen 53.- Cáncer de mama 2	72
Imagen 54.- Tejido mamario normal 3	73
Imagen 55.- Tejido mamario normal 3	73
Imagen 56.- Tejido mamario normal 3	73
Imagen 57.- Cáncer de mama 4	74

Imagen 58.- Cáncer de mama 4	74
Imagen 59.- Cáncer de mama 4	74
Imagen 60.- Cáncer de mama 4	74
Imagen 61.- Cáncer de mama 4	74
Imagen 62.- Cáncer de mama 4	74
Imagen 63.- Cáncer de mama 5	75
Imagen 64.- Cáncer de mama 5	75
Imagen 65.- Cáncer de mama 5	75
Imagen 66.- Cáncer de mama 5	75
Imagen 67.- Cáncer de mama 5	75
Imagen 68.- Cáncer de mama 5	75
Imagen 69.- Cáncer de mama 6	76
Imagen 70.- Cáncer de mama 6	76
Imagen 71.- Cáncer de mama 7	77
Imagen 72.- Cáncer de mama 7	77
Imagen 73.- Cáncer de mama 7	77
Imagen 74.- Cáncer de mama 7	77
Imagen 75.- Cáncer de mama 7	77
Imagen 76.- Cáncer de mama 7	77
Imagen 77.- Cáncer de mama 8	78
Imagen 78.- Cáncer de mama 8	78
Imagen 79.- Cáncer de mama 8	78
Imagen 80.- Cáncer de mama 9	78
Imagen 81.- Cáncer de mama 9	78
Imagen 82.- Tejido mamario normal	79
Imagen 83.- Tejido mamario normal	79
Imagen 84.- Tejido mamario normal	79

Imagen 85.- Cáncer de mama 11	79
Imagen 86.- Cáncer de mama 11	79
Imagen 87.- Tejido mamario normal 12	80
Imagen 88.- Tejido mamario normal 12	80
Imagen 89.- Tejido mamario normal 12	80
Imagen 90.- Cáncer de mama 13	81
Imagen 91.- Cáncer de mama 13	81
Imagen 92.- Cáncer de mama 13	81
Imagen 93.- Cáncer de mama 13	81
Imagen 94.- Cáncer de mama 15	82
Imagen 95.- Cáncer de mama 15	82
Imagen 96.- Cáncer de mama 16	82
Imagen 97.- Cáncer de mama 16	82
Imagen 98.- Cáncer de mama 17	83
Imagen 99.- Cáncer de mama 18	83
Imagen 100.- Cáncer de mama 18	83
Imagen 101.- Cáncer de mama 11	84
Imagen 102.- Cáncer de mama 12	84
Imagen 103.- Cáncer de mama 13	85
Imagen 104.- Cáncer de mama 14	85
Imagen 105.- Cáncer de mama 15	85
Imagen 106.- Cáncer de mama 16	86
Imagen 107.- Cáncer de mama 17	86
Imagen 108.- Cáncer de mama 18	86
Imagen 109.- Cáncer de mama 19	87
Imagen 110.- Cáncer de mama 19	87
Imagen 111.- Cáncer de mama 19	87

Imagen 112.- Cáncer de mama 19	87
Imagen 113.- Cáncer de mama 19	87
Imagen 114.- Cáncer de mama 20	88
Imagen 115.- Cáncer de mama 20	88
Imagen 116.- Cáncer de mama 20	88
Imagen 117.- Cáncer de mama 20	88
Imagen 118.- Cáncer de mama 20	88
Imagen 119.- Cáncer de mama 20	88
Imagen 120.- Cáncer de mama 21	89
Imagen 121.- Cáncer de mama 21	89
Imagen 122.- Cáncer de mama 21	89
Imagen 123.- Cáncer de mama 22	89
Imagen 124.- Cáncer de mama 22	89
Imagen 125.- Cáncer de mama 22	90
Imagen 126.- Cáncer de mama 22	90
Imagen 127.- Cáncer de mama 22	90
Imagen 128.- Cáncer de mama 22	90
Imagen 129.- Cáncer de mama 23	91
Imagen 130.- Cáncer de mama 23	91
Imagen 131.- Cáncer de mama 23	91
Imagen 132.- Cáncer de mama 23	91
Imagen 133.- Cáncer de mama 25	92
Imagen 134.- Cáncer de mama 25	92
Imagen 135.- Cáncer de mama 26	92
Imagen 136.- Cáncer de mama 26	92
Imagen 137.- Cáncer de mama 27	92
Imagen 138.- Cáncer de mama 27	93

Imagen 139.- Cáncer de mama 27	93
Imagen 140.- Ensayos de tumorigénesis.....	95
Imagen 141.- Ensayos de tumorigénesis.....	96
Imagen 142.- Análisis de patología	98
Imagen 143.- Análisis de patología	98
Imagen 144.- Análisis de patología DSG-BC1.....	99
Imagen 145.- Análisis de patología DSG-BC1.....	99
Imagen 146.- Análisis de patología DSG-BC1.....	99
Imagen 147.- Análisis de patología: DSG-BC2.....	100
Imagen 148.- Análisis de patología: DSG-BC2.....	100
Imagen 149.- Análisis de patología: DSG-BC2.....	101
Imagen 150.- Análisis de patología: DSG-BC2.....	101
Imagen 151.- Ensayo de motilidad DSG - BC1.....	108
Imagen 152.- Ensayo de motilidad DSG – BC2.....	109
Imagen 153.- Células HUVEC: Obtención de células endoteliales HUVEC de cordones umbilicales.....	113
Imagen 154.- Perfil genético.....	117

1. RESUMEN

El cáncer de mama representa la primera causa de muerte asociada a enfermedades neoplásicas en mujeres y se considera un problema emergente de salud pública. Se ha establecido una asociación causal entre la obesidad y el cáncer de mama. Actualmente no existen cultivos primarios o líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer de mama y obesidad. Los cultivos celulares son conjuntos de células neoplásicas que permiten valorar el comportamiento del cáncer en cuestión y por ende, valorar características como respuesta a tratamiento, tasas de proliferación y más. Con base en la literatura, se puede inferir que existen diferencias en el comportamiento celular y el perfil molecular de las células de cáncer de mama originadas en pacientes con obesidad.

Este ensayo busca establecer cultivos primarios de cáncer de mama en pacientes con obesidad y compararlos con cultivos primarios de pacientes no obesas para poder determinar las diferencias entre el comportamiento de ambos tipos de cánceres. La manera en que se lleva a cabo es tomando explantes de pacientes con cáncer de mama, creando cultivos celulares al separar de manera particular células neoplásicas de tejido circundante sean fibroblastos, adipocitos o células endoteliales y realizar diferentes ensayos con los cultivos. Entre los ensayos que se llevan a cabo con ensayos para valorar crecimiento y proliferación celular, reproducibilidad in vivo, respuesta a quimioterapia y de manera indirecta, capacidad de invasión y metástasis.

Se lograron establecer dos líneas celulares nuevas, una proveniente de un paciente con cáncer de mama y obesidad, DSG – BC1 (Daniela Shveid Gerson – Breast Cancer 1) y otra sin obesidad, DSG – BC2 (Daniela Shveid Gerson – Breast Cancer 2). Se logró su caracterización celular y molecular mediante ensayos de tasas de proliferación y motilidad in vitro, tasas de citotoxicidad y determinación de concentración inhibitoria 50 de doxorubicina y paclitaxel, genotipificación, tumorigénesis en ratones atímicos de la cepa nu/nu, análisis por patología, aislamiento y composición de medio condicionado y ensayos de adhesión y lectura por contador de centelleo y xCelligence. Se observaron

diferencias en la biología celular y los perfiles moleculares entre el cáncer de mama que se desarrolla en mujeres obesas y el que se desarrolla en mujeres sin obesidad en prácticamente todos los ensayos realizados.

De manera adicional, se obtuvieron los 32 cultivos celulares que dictaba el tamaño de muestra, obteniendo en total 3 cultivos celulares, en adición a las dos líneas celulares en las que se realizaron los ensayos variados previamente mencionados. Dichos ensayos sirven como base para comprender la importancia de un tratamiento individualizado. El cáncer de mama en personas con y sin obesidad se comporta de manera distinta, no obstante sería importante realizar más cultivos primarios para determinar con precisión las diferencias.

2. GLOSARIO

1. Adyuvancia: El tratamiento adyuvante es el tratamiento adicional para el cáncer que se administra después del tratamiento primario para disminuir el riesgo de que regrese⁽¹⁾. En este caso el tratamiento primario es la cirugía el el adyuvante es quimioterapia.
 - a. Doxorubicina: Un medicamento antibiótico que actúa como quimioterapéutico al bloquear la síntesis de ADN, intercalándose entre bases nitrogenadas e inhibiendo la topoisomerasa II, lo que lleva a destrucción del ADN.
 - b. Paclitaxel: Un quimioterapéutico que actúa en el esqueleto celular, específicamente en los microtúbulos, inhibiendo la división celular, específicamente la fase s del ciclo celular.
 - c. Debido a la accesibilidad, los costos y la información que existe en relación al uso de estos agentes quimioterapéuticos en ensayos de citotoxicidad, se decidió utilizar doxorubicina y paclitaxel en este protocolo.
2. Contador de Centelleo: Aparato que mide radiación ionizante en una muestra. En ciertas máquinas puede emitir luz o centellea cuando detecta la radiación, dado su nombre contador de centelleo. Los ensayos de adhesión realizados se llevan a cabo mediante células endoteliales y monocitos marcados como timidina tritiada, un elemento radioactivo. Al adicionar el medio condicionado producto del cultivo primario que se intenta caracterizar, los monocitos de adhieren al endotelio. Entre mayor adherencia, mayor la radiación y mayor la lectura del contador del centelleo.
3. Cultivo primario: cultivo de células derivadas directamente de explantes. Se trata de células que por primera vez proliferan in vitro en medio de cultivo definido suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se cuenta con un cultivo primario cuando hay proliferación celular por más 2 meses, lo cual diferencia a células

normales de células inmortales. Por tratarse de un cultivo de todas las células que emigran de los explantes puede tratarse de una población heterogénea.

4. DSG- BC1: Daniela Shveid Gerson – Breast Cancer 1. Primer cultivo de cáncer de mama caracterizado, proveniente de tejido con obesidad, luminal A.
5. DSG – BC2: Daniela Shveid Gerson – Breast Cancer 2. Segundo cultivo de cáncer de mama caracterizado, proveniente de tejido sin obesidad, triple negativo.
6. Ensayo de adhesión: Ensayos en donde se busca valorar la capacidad de los elementos dentro de un medio condicionado, sean citocinas o enzimas de otra índole, de adherir células. Indirectamente, al tener la capacidad de adhesión se discute la posibilidad de metástasis del cultivo de dónde provino el medio condicionado.
7. Ensayos de citotoxicidad: Estudios en los cuales se observa la toxicidad que tienen ciertos medicamentos o compuestos en la célula. Clásicamente tratan de probar quimioterapéuticos en células cancerosas, el punto final siendo la muerte celular.
8. Epigenética: Cambios heredables en la expresión génica que no involucran cambios en la composición del ADN. Los cambios epigenéticos son influidos por edad, medio ambiente, estilo de vida y enfermedades.
9. Explantes: sección del tejido derivado de una biopsia de la masa tumoral de 2 a 3 mm³ que se fija a la superficie plástica de las cajas de cultivo por deshidratación.
10. Factores confusores: El procedimiento para generar cultivos primarios de células tumorales se basan en fijar una pequeña pieza de tejido tumoral a las cajas de cultivo (explante) y dejar que las células presentes en el tejido migren a la caja de cultivo. Esto implica que se generan cultivos mixtos de células normales primarias (eritrocitos, linfocitos y fibroblastos principalmente) y células tumorales.
 - a. Para distinguir entre células primarias normales y células tumorales se empleará como primer criterio el mantenimiento de proliferación después de dos meses y medio de cultivo. Este criterio está basado en que las células normales no transformadas están programadas para un número finito de divisiones (límite de Hayflick: entre 40 y 50 divisiones) y que en

condiciones óptimas de cultivo este número de divisiones se alcanza en 2 meses de cultivo.

- b. Se considera que hasta un 25% de los explantes no desarrollará una línea celular, debido a contaminación con bacterias u hongos provenientes de la muestra o introducidas por un manejo deficiente del operador del cultivo. Una segunda causa de falta de cultivos es que las células tumorales no fueran capaces de migrar y/o crecer en las condiciones de cultivo (sustrato plástico con cargas positivas, medio de cultivo RPMI suplementado con 19% de suero fetal bovino). Una tercera posibilidad puede deberse a que en el explante sólo haya células primarias que después de dos meses dejaran de proliferar y entrarán en senescencia. Cualquiera de estas tres posibilidades podrán ser valoradas con la observación al microscopio o con el cultivo por más de dos meses y medio. Tomando en cuenta que solamente es necesario obtener el explante, no existe riesgo de pérdida de casos sin embargo al existir el consentimiento informado la paciente puede decidir no participar en el estudio y se retirará su explante y cultivo celular en cualquier fase de la investigación.
11. Fenotipo celular transformado: El primer cambio que distingue a una célula normal de una tumoral cuando presenta: pérdida de la inhibición de proliferación por contacto intercelular, una tasa de proliferación elevada con índices mitóticos iguales o mayores al 5% e inmortalidad (capacidad de crecimiento ilimitado más allá del límite de Hayflick)
12. Genotipificación: La caracterización genética, en forma de ADN, específico de un organismo.
13. IC50: También llamada concentración inhibitoria 50, es la concentración bajo la cual se logra el 50% de inhibición del crecimiento celular.
14. Índices de tumorigenicidad / tasas de crecimiento tumoral: La relación entre la cantidad y frecuencia en la cual células cancerosas forman tumores.
15. Inmunofenotipo: La caracterización de células según los marcadores inmunológicamente activos que se encuentran en su superficie⁽²⁾.

16. Investigación traslacional: Investigación que une los conocimientos derivados de la investigación básica a la prevención y tratamiento de enfermedades.
17. Medio condicionado: Un medio de cultivo es una solución que cuenta con los nutrientes necesarios que, bajo condiciones necesarias de temperatura y pH, favorece el crecimiento celular. El medio condicionado es el medio de cultivo que después de ser retirado de estímulos externos y agregados de nutrientes, es producido un cultivo celular. Las células del cultivo liberan factores propios de crecimiento necesarios para su proliferación, motilidad y supervivencia.
18. Motilidad: Capacidad celular de movimiento. También llamado ensayo de cierre de herida, un ensayo de motilidad muestra con que velocidad pueden moverse las células después de que hayan sido desplazadas por un insulto físico. Como parte de este protocolo se realizó una “herida” con una pipeta estéril sobre una monocapa de células provenientes de un cultivo primario y se observó qué tan rápido se vuelve a formar una monocapa. Para no confundirse con proliferación el medio de cultivo que se agrega no es suplementado con medio nutricio ni factores de crecimiento.
19. Perfil de expresión de receptores hormonales: Valoración del nivel de expresión de receptor de estrógenos tipo alfa, receptor de progesterona tipo beta, receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (Her2) por medio de inmuno-análisis tipo “western” en extractos proteicos totales. Estos estudios se complementan con ensayos de inmuno-fluorescencia empleando anticuerpos contra estos receptores en cultivos de células fijadas in vitro.
20. Tasas de motilidad: La relación entre cantidad y frecuencia del movimiento que tiene un grupo de células.
21. Tasas de proliferación: La relación entre la cantidad y frecuencia de número de células que se originan de una sola.
22. Tipificación celular: Proceso mediante el cual se determinan los componentes que identifican a una célula y la clasifican.
23. Tumorigénesis: La capacidad que tiene un cultivo de células cancerígenas de crear un tumor en un organismo vivo. En este caso los ensayos de tumorigénesis se realizaron con ratones atímicos.

24. xCelligence: Un análisis celular en tiempo real bajo el cual se pueden medir características celulares como proliferación, migración, morfología y adhesión, entre otros. Consiste en placas en las cuales se siembran cultivos celulares, se les aplica un estímulo de interés y se observa cómo es que modifica el comportamiento del cultivo celular sembrado. Específicamente en el protocolo se aislaron células endoteliales HUVEC y se valoró su adhesión con el medio condicionado proveniente de los cultivos DSG – BC1 y DSG – BC2.
25. Xenotrasplante: Procedimiento mediante el cual se trasladan órganos, tejidos o células de una persona a otra. Existen diversos tipos.
- a. Trasplante autólogo (autotrasplante): El donante y el receptor son el mismo.
 - b. Isotrasplante: El donante y el receptor son distintos pero genéticamente idénticos, como en el caso de gemelos.
 - c. Alotrasplante: El donante y el receptor son genéticamente distintos, aunque son de la misma especie.
 - d. Xenotrasplante: El donante y el receptor son de diferentes especies. Este es trasplante que se llevará a cabo en el protocolo dado a que se transferirán células humanas a ratones atómicos.

3. INTRODUCCIÓN

En México, el cáncer representa la tercera causa de morbi-mortalidad en la población mayor de 40 años. El cáncer de mama representa la primera causa de muerte asociada a enfermedades neoplásicas en mujeres y se considera un problema emergente de salud pública^{(3),(4)}. La mortalidad se asocia a la invasión metastásica de órganos vitales como pulmón, hueso cortical, hígado y cerebro. Su incidencia y morbi-mortalidad se agudizan si se consideran dos aspectos adicionales de la población mexicana: i) la inversión de la pirámide poblacional que predice el aumento en el número de mujeres mayores de 50 años en las próximas décadas⁽⁵⁾ y ii) la frecuencia del sobrepeso en más del 70 % de las mujeres en nuestro país^{(6),(7)}.

El índice de cáncer de mama en mujeres obesas es hasta tres veces mayor que en mujeres de peso ideal⁽⁸⁾ y cuenta con características biológicas particulares. Se ha descrito que pacientes con obesidad y cáncer tienen menor supervivencia global y mayor probabilidad de recurrencia. Esto es causado por las hormonas involucradas en la obesidad, como: lipogénicas, glucocorticoides e insulina las cuales muestran señalización aberrante y se secretan de manera anormal y promueven alteraciones en el almacenamiento de grasa⁽⁹⁾. Como consecuencia, esto propaga la obesidad y la producción de dichas hormonas que dan como resultado el desarrollo de enfermedades, tales como algunas neoplasias. A esto, es importante estudiar si el cáncer de mama que se genera en una mujer obesa difiere en su biología y susceptibilidad terapéutica al de aquel que se presenta en una mujer con un IMC dentro de parámetros normales.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales células de un tejido comienzan a dividirse sin control. Puede comenzar en prácticamente cualquier parte del cuerpo. Existen numerosas etiologías para el cáncer, que incluyen mutaciones genéticas, exposición a ambientes dañinos como tabaquismo y radiación, y cambios metabólicos incluyendo la obesidad. En el cáncer, el proceso normal de división celular, reparación de daños y renovación celular está alterado. Las células anormales no siguen los procesos normales de señalización celular para muerte programada, proliferando cuando deben morir y formando conglomerados de nuevas células en sitios adonde no son requeridas, llamados tumores. Los tumores cancerosos son malignos y tienen la capacidad de invadir o metastatizar a tejidos vecinos o incluso sitios lejanos al tumor inicial. Las células tumorales son menos especializadas que las células normales y tienen la habilidad de influenciar a células cercanas para crear un microambiente que favorece su crecimiento⁽¹⁰⁾.

A nivel del ciclo celular, las proteínas involucradas en la regulación de la división celular funcionan de una manera aberrante, permitiendo que grandes cantidades de células crezcan y se dividan sin control. Dado a que el cáncer es una enfermedad a nivel celular, el logro tecnológico de realizar cultivos celulares in vitro ha permitido determinar cuales son los eventos que dan lugar a la formación de tumores y cuales son las proteínas involucradas en el proceso. Investigadores ahora tienen la habilidad de crecer células en un medio de cultivo rico en nutrientes, lo cual ha dado lugar a la identificación de genes que permiten el avance del ciclo celular u oncogenes y aquellos que lo frenan, genes supresores tumorales⁽¹¹⁾.

4.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

La clasificación actual o intrínseca identifica al menos 5 diferentes formas (luminal-A, luminal-B, semejante al tipo basal, triple negativo y bajo en claudinas) que se subdividen, de acuerdo al nivel de expresión de marcadores moleculares como: receptores hormonales, HER2/neu y claudinas⁽¹²⁾.

Esta clasificación se fortalece con otros marcadores moleculares como *P53*, *KI67*, citoqueratinas 5 y 6 y con criterios histopatológicos que definen el grado de diferenciación de las células tumorales⁽¹³⁾. Los criterios de clasificación han revelado una diversidad de subtipos de cáncer de mama con diferentes características de evolución clínica y respuesta a esquemas terapéuticos y la existencia de subgrupos o subcategorías de pacientes en los que, a pesar de que las células cancerosas cumplen con los criterios de clasificación, no se presenta la respuesta clínica esperada⁽¹⁴⁾. En mujeres con índices de masa corporal mayor a 30 Kg/m², parece haber un peor pronóstico asociado con un sesgo hacia formas triple negativas^{(15),(16),(17),(18)}.

El cáncer de mama de perfil luminal A (50-60% del total de casos de cáncer de mama) se caracteriza por la expresión de genes activados por el receptor estrogénico (RE) como factor de transcripción, que se encuentran expresados en el epitelio de la luz de los ductos mamarios; y por presentar una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. A nivel inmunohistoquímico se ha caracterizado el perfil luminal A con la expresión de RE, receptor de progesterona (RPg), Bcl-2 y citoqueratina CK8/18 así como un bajo índice proliferativo mediante Ki67 y un bajo grado histológico.

Estos tumores presentan un mejor pronóstico con una menor incidencia de recaídas y con una mayor supervivencia. La supervivencia de estas pacientes tras la recaída prolongada (2.2 años) y el patrón de metástasis claramente diferente, presentan un mayor índice de

recaídas a nivel óseo (18.7%), siendo la tasa de incidencia de recaídas, a nivel visceral, SNC, hepática, pulmonar, etc.; inferior al 10%. La piedra angular del tratamiento para estas pacientes, tanto en adyuvancia como en el contexto de enfermedad metastásica, es la terapia hormonal.

Se conoce que la clasificación Luminal A, para cánceres de mama, confiere un pronóstico favorable a quien lo padece, debido a múltiples opciones de tratamiento, ya sea que tengan como blanco terapéutico receptores hormonales o HER2/neu. A diferencia de esto, la clasificación triple negativo o basal, confiere el peor pronóstico de los 5 subtipos, dado a que no existe un blanco terapéutico conocido al cual se pueda indicar un tratamiento específico^{(19),(20)}. Se define como una enfermedad triple negativo cuando la expresión de receptores de estrógenos, progesterona y HER2 está ausente. Esta clasificación tiene correlación con la conformación basal obtenida por microarreglos genéticos. Tomando esto en cuenta, es posible argumentar que el cáncer de mama triple negativo es de gran interés clínico y terapéutico, ya que se busca poder establecer medios para poder estudiar a este tipo de cáncer de manera aislada y poder determinar tratamientos que pudiesen ser eficaces en términos de su supervivencia y pronóstico.

El cáncer triple negativo se presenta en el 10 – 20% de los cánceres de mama invasivos; se ha observado con mayor predisposición en mujeres premenopáusicas, estadios avanzados, alto grado de diferenciación, índices mitóticos elevados, historia familiar de cáncer de mama y mutaciones *BRCA1*⁽²¹⁾. A nivel morfológico, los carcinomas de mama basal-like suelen ser carcinomas ductales infiltrantes, presentan un elevado índice mitótico, necrosis tumoral asociada, márgenes expansivos, y una evidente respuesta linfocítica estromal. Mujeres con cáncer de mama triple negativo cuentan con riesgo alto de recurrencia a tres años desde el diagnóstico y presentan aumento de mortalidad a los 5 años, lo cual se asocia también al tamaño tumoral, estadio e involucro ganglionar. En cuanto a los patrones de recaída, las metástasis tienden a ser más agresivas y de predominio visceral, sobretodo a nivel pulmonar, del sistema nervioso central y

ganglionar. La mayor agresividad y peor pronóstico podrían ser explicados por el alto índice de mutaciones en *p53* que presentan estos tumores. Sobre-expresan citoqueratinas de alto peso molecular como la CK 5/6 y 17, así como laminina, la p-cadherina, caveolinas 1 y 2, nestina, CD44 y EGFR. Pacientes menores de 40 años han demostrado presentar una menor sobrevida a pesar de la terapia sistémica agresiva⁽²²⁾.

El cáncer de mama es una entidad heterogénea, no representa una enfermedad única. La clasificación clínica internacional basada en el sistema de clasificación TNM describe factores clínicos como el tamaño tumoral (T), el involucro de ganglios (N) y metástasis o la extensión a órganos distantes (M). Algunas características clínicas tales como la edad, tamaño tumoral, involucro ganglionar y estado menopáusico representan factores pronóstico en el comportamiento clínico, desarrollo y extensión de la neoplasia más no revelan el estado molecular ni el comportamiento biológico individual de la neoplasia.

Como en las demás enfermedades oncológicas, el sistema TNM es una herramienta útil en la estadificación del cáncer de mama, desde la enfermedad localizada hasta los crecimientos metastásicos. Se ha reconocido una gran variedad de formas de cáncer de mama mostrando que es una enfermedad compleja con una gran variedad de subtipos.

Los tratamientos actuales utilizan los criterios de clasificación anteriormente expuestos para definir un plan de tratamiento, que no solo sirve para definir la secuencia correcta, sino los esquemas de quimio- y/o radio-terapia y cirugía. Gracias a este conocimiento y los avances obtenidos, se ha incrementado la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global. Lamentablemente, estas estrategias pierden eficacia cuando se aplican a estadios más avanzados. De aquí la importancia en la detección temprana. En México, la mayoría de las pacientes con cáncer de mama se identifican en estadios intermedios o avanzado limitando las posibilidades de sobrevida libre de enfermedad o libre de recurrencia⁽⁴⁾.

La clasificación histológica del cáncer de mama incluye entre los más frecuentes carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar in situ, carcinoma lobulillar infiltrante y entre los menos frecuentes el cáncer de mama inflamatorio, enfermedad de paget del pezón, tumor filoides de mama y angiosarcoma⁽²³⁾. Los cánceres llamado in situ están confinados a los ductos o lóbulos mamarios mientras que los invasivos o infiltrantes generalmente comienzan en los ductos o lóbulos y llegan a invadir el tejido adyacente⁽²⁴⁾. Se estima que alrededor de 80% de todos los cánceres de mama son carcinomas ductales infiltrantes y suelen ser más comunes conforme a la edad⁽²⁵⁾.

4.3. IMPACTO DEL SOBREPESO COMO FACTOR PRONÓSTICO NEGATIVO EN CÁNCER DE MAMA

En los últimos 20 años se ha incrementado la incidencia de sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$) y obesidad ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$), acompañados de una variedad de alteraciones metabólicas como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, esteatosis hepática, síndrome metabólico y diabetes. En 1988 la incidencia de sobrepeso u obesidad en mujeres era del 34.8%, en 1999 era de 59.3%⁽²⁶⁾. Para el 2013, la incidencia ha aumentado a un punto en donde más del 70%^{(27),(7)} de las mujeres tiene sobrepeso u obesidad. Esto afecta incluso a la población pediátrica, conformando un problema de salud pública de gran magnitud, trascendencia y vulnerabilidad. Este incremento en incidencia se debe en gran parte, a un cambio en el estilo de vida en México asumiendo una dieta con una mayor proporción de carbohidratos y lípidos y una marcada disminución en la actividad física⁽²⁸⁾.

Se ha observado que el sobrepeso y, más aún, la obesidad, son elementos de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama con un sesgo particular en las mujeres hispanas^{(16),(29)}. Adicionalmente, hay un aumento en la frecuencia de pacientes con formas triples

negativas en las mujeres obesas. Se reconoce que la obesidad ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$) se asocia a un estado de inflamación crónica el cual promueve la generación de neoplasias^{(30),(31),(32)}. El incremento de niveles circulantes de insulina incrementa, a su vez, receptores insulínicos en las células mamarias provocando crecimiento autónomo en estas células. Así mismo, se ha demostrado que los niveles de aromatasa tisular se incrementan en el tejido mamario de mujeres con obesidad, debido al incremento de tejido graso. Todas estas observaciones sugieren que la biología del cáncer de mama, que se desarrolla en pacientes con obesidad mórbida, puede ser diferente al que se desarrolla en individuos con $IMCs < 25 \text{ Kg/m}^2$. El contar con células de cáncer de mama derivadas de pacientes obesas, representa un modelo para estudiar estas posibles diferencias.

En México solamente se ha realizado un estudio en el Instituto Nacional de Cancerología en el cual se observó que el factor de riesgo más importante involucrado en la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama es el sobrepeso y la obesidad, en comparación con factores como la menopausia, diabetes, receptores estrogénicos positivos, tipo inmunohistoquímico triple negativo, presencia del receptor Her2, estadio clínico, grado nuclear y respuesta patológica completa⁽³³⁾.

4.4. MODELOS EXPERIMENTALES EN EL ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA

La investigación básica, clínica y translacional en el campo del cáncer de mama, revela continuamente una variedad de marcadores moleculares con potencial valor pronóstico^{(5),(34)}. Algo semejante ocurre con la identificación y/o síntesis de nuevas estrategias de quimio- e inmunoterapia. Sin embargo, estos desarrollos requieren de modelos experimentales de células cultivadas in vitro y crecimientos tumorales, en modelos animales, que permitan su validación y determinen su posible eficacia en el pronóstico, en la clasificación, estadificación, y/o su valor terapéutico⁽³⁵⁾.

Las alteraciones micro-ambientales, metabólicas y endócrinas, como las que se presentan en los individuos con obesidad, dejan marcas persistentes en el funcionamiento celular; esta información queda impresa en la cromatina en forma de cambios epigenéticos de la expresión génica. Estos cambios se manifiestan como cambios en el patrón de metilación de islas CpG, en la acetilación de histonas y la asociación de proteínas que controlan la estructura de la cromatina como CTCF (CCCTC-binding factor (zinc finger protein)). El contar con células de cáncer de mama que se generó en una paciente obesa, permite verificar este tipo de cambios epigenéticos y su asociación al sesgo en el desarrollo de cáncer de mama triple negativo, comparar si estas células tienen el mismo sistema de apagamiento transcripcional en promotores como el del receptor de estrógenos y valorar si presentan una susceptibilidad diferencial al tratamiento convencional con antraciclenos.

Por tanto, contar con estos modelos experimentales puede apoyar en el desarrollo de nuevas herramientas aplicables a la prevención, detección temprana, identificación de los subgrupos de pacientes que responden a los esquemas de quimioterapia, así como de estrategias de tratamiento que resulten costo-eficientes. Existen estudios en donde, líneas celulares de cáncer de mama en distintos modelos tumorales, reflejan los subtipos histológicos de cáncer; sin embargo, estos no contienen características importantes para poderse aplicar en nuestra población, al diferir tanto en cuestiones genéticas, como de importantes factores como el sobrepeso u obesidad⁽³⁶⁾.

4.5. REPRODUCIBILIDAD DEL MODELO BIOLÓGICO EN RATONES ATÓMICOS

Actualmente, los modelos experimentales de cáncer, se basan en el uso de las más de 50 líneas celulares de cáncer de mama establecidas a lo largo de los últimos 50 años. Las líneas de adenocarcinomas ductales MCF7 o la MDA MB 231 son, por ejemplo, las que

más se han empleado en estudios in vitro⁽³⁷⁾. Estas líneas celulares se usan para estudiar el efecto de mutaciones y modificaciones en la regulación de la proliferación, motilidad, invasión y apoptosis, así como en estudios que prueban nuevos compuestos o combinaciones de quimio o inmunoterapia.

No obstante, es necesario observar el comportamiento biológico de estas células para poder valorar su reproducibilidad en modelos animales y que no rechacen las células implantadas de origen humano. Para tal fin, se han seleccionado ratones atímicos(nu/nu) que permiten este tipo de trasplante sin rechazo⁽³⁸⁾. Se conoce que el uso de animales inmuno-suprimidos representa un modelo limitado, al eliminar la respuesta humoral del huésped. Existen modelos animales inmuno-competentes, pero sólo para un pequeño grupo de modelos tumorales generados en cepas de ratones singénicos⁽¹⁹⁾. El rechazo inmunológico en estos animales limitan el estudio de tumores experimentales de las diversas formas de cáncer de mama humano.

4.6. CULTIVOS PRIMARIOS EN EL ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA

La primer línea celular de cáncer de mama se estableció en 1958⁽³⁹⁾. Hasta 1973, MD Anderson logró cultivar células de carcinomas mamarios que se utilizan hoy en día⁽⁴⁰⁾. Dicha contribución provocó numerosos avances en términos de diagnóstico, tratamiento y comprensión del cáncer de mama. Actualmente existen 52 líneas celulares de cáncer de mama disponibles a la venta para investigadores en el campo. Estas líneas se obtuvieron sin incluir en el registro y el establecimiento propio del cultivo, criterios relacionados a sobrepeso u obesidad. Es por ende que se discute que las celulares de cáncer de mama no reflejan actualmente los fenotipos tumorales que se llegan a encontrar en la población.

Las líneas celulares son, en la mayoría de los casos, tomados de poblaciones con un fondo genético muy homogéneo. En otras ocasiones son el resultado de un proceso de clonación, a partir de un cultivo primario derivado de una masa tumoral selecta. A los estudios con líneas celulares de cáncer de mama ya establecidos, se suma el uso de cultivos primarios que aportan los fondos genéticos particulares, de diferentes población humanas, así como las posibles variaciones asociadas a condiciones fisiopatológicas, como la obesidad o diabetes, factores de gran prevalencia en nuestro país. Al desarrollar un banco de cultivos primarios con características específicas para la población mexicana, se desarrollará un modelo reproducible para identificar estrategias con blancos terapéuticos establecidos y procedimientos individualizados⁽⁴¹⁾.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad representa una enfermedad mayoritaria en México, considerándose una epidemia emergente por la Organización Mundial de la Salud⁽⁴²⁾. La obesidad se encuentra entre los factores principales relacionados con el desarrollo de cáncer de mama⁽⁴³⁾, e incluso se le atribuyen más del 20% de las muertes registradas por cáncer en el mundo, junto con otros factores de riesgo identificables⁽⁴⁴⁾, lo cual crea un problema de alto costo social y de salud en nuestro país⁽⁴⁵⁾. En México solamente se ha realizado un estudio en el cual se relaciona el sobrepeso y la obesidad como factores de mal pronóstico en cáncer de mama^{(46),(33)}.

La obesidad se ha relacionado con múltiples tipos de cáncer debido al estado de inflamación crónica que contiene el tejido adiposo, el incremento de niveles circulantes de insulina y el aumento en receptores insulínicos que favorecen crecimiento autónomo y las alteraciones en hormonas, adipocinas y metabolitos asociados a cambios epigenéticos. Los cambios sistémicos inducidos por la obesidad ejercen un efecto diferente en el proceso neoplásico al promover el desarrollo de tumores y la proliferación celular, su progresión y posteriormente resistencia a drogas y recurrencia⁽⁴⁷⁾.

En relación al cáncer de mama, la obesidad se ha visto ligada a un riesgo incrementado de padecerla en formas biológicamente agresivas, notablemente de tipo triple negativo, con dependencia a estrógenos. Además, promueve invasión y metástasis por mecanismos relacionados a adipocinas, insulina y citocinas secretadas por macrófagos⁽⁴⁸⁾. Las mujeres con obesidad tienen tumores frecuentemente diagnosticados en estadios tardíos de la enfermedad⁽⁴⁹⁾. El índice de cáncer de mama en mujeres obesas es hasta tres veces mayor que las mujeres delgadas⁽⁸⁾ y cuenta con características biológicas particulares. Por lo

que, además de diferencia por inmunofenotipo y estadio, cuentan con un pronóstico distinto y distinta respuesta a tratamiento.

En la actualidad no existen líneas celulares de cáncer de mama en mujeres con obesidad las cuales se hayan caracterizado por su ambiente metabólico y hormonal. Al realizarlas, se busca investigar las diferencias entre la biología celular y los perfiles moleculares entre células tumorales de cáncer de mama en mujeres con y sin obesidad. De esta manera se intenta comprender la relación de la obesidad y el cáncer de mama desde el punto de vista molecular, de manera específica su agresividad, capacidad de invasión y metástasis. Al desarrollar estos cultivos primarios se podrían establecer líneas celulares para la mujer obesa en México, donde se podrán probar terapias blancas e individualizar tratamientos dependiendo de las características de las pacientes.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en el comportamiento celular y el perfil molecular de las células de cáncer de mama originadas en pacientes con obesidad (índice de masa corporal mayor a 30 kg/m^2) con respecto a células de cáncer de mama que se originan en pacientes sin obesidad (índice de masa corporal menores 30 kg/m^2)?

7. HIPÓTESIS METODOLÓGICA DE INVESTIGACIÓN

Existen diferencias en la biología celular y los perfiles moleculares entre el cáncer de mama que se desarrolla en mujeres obesas y el que se desarrolla en mujeres sin obesidad.

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar la biología celular y perfiles moleculares de cultivos de cáncer de mama generados en mujeres obesas con aquellos obtenidos en mujeres sin obesidad.

8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

8.2.1 Establecer una base de datos de mujeres con cáncer de mama y obesidad, en relación a la clasificación de inmunofenotipo para determinar la muestra poblacional de pacientes con cáncer de mama que se presentan al Centro Médico ABC.

8.2.2. Estandarizar la metodología de cultivo y tipificación celular para células tumorales de cáncer de mama extraídas de muestras de tejido fresco.

8.2.3. Establecer las tasas de proliferación in vitro de los cultivos primarios.

8.2.4. Establecer las tasas de motilidad in vitro de los cultivos primarios.

8.2.5. Establecer la IC50 del medicamento quimioterapéutico doxorubicina en los cultivos primarios.

8.2.6. Establecer la IC50 del medicamento quimioterápico paclitaxel en los cultivos primarios.

8.2.7. Establecer los índices de tumorigenicidad y las tasas de crecimiento tumoral de los cultivos primarios en modelos de trasplantes alogénicos en ratones atímicos de la cepa nu/nu.

8.2.8. Obtener la genotipificación de los cultivos primarios.

8.2.9. Analizar las diferencias encontradas en los cultivos celulares establecidos y así comparar los datos obtenidos de las mujeres con cáncer de mama y obesidad con las mujeres con cáncer de mama sin obesidad.

9. METODOLOGÍA

9.1. TIPO Y DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudio es una prueba de concepto, por lo que se considera experimental, transversal y longitudinal en donde se busca caracterizar cultivos primarios establecidos de cáncer de mama en tumores generados en un ambiente de obesidad comparadas con aquellas generadas en un ambiente sin obesidad.

9.2. GRUPO DE ESTUDIO

Mujeres con cáncer de mama quienes serán sometidas a intervención quirúrgica en el Centro Médico ABC de las que se cuente con una muestra del tejido tumoral de al menos 5 mm³. Se dividirán pacientes con IMC mayor o menor a 30 kg/m², siendo el grupo principal de estudio pacientes con obesidad o IMC mayor a 30 kg/m².

9.3. GRUPO DE CONTROLES

Pacientes con cáncer de mama con índices de masa corporal menor a 30 kg/m² que serán sometidas a intervención quirúrgica en el Centro Médico ABC, de las que se cuente con un explante del tejido tumoral de al menos 5 mm³.

9.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Nombre de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumento de medición	Fuente	Uso
---------------------------	------------------------------	-------------------------------	--------------------------------	---------------	------------

Nombre de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumento de medición	Fuente	Uso
Explante de cáncer de mama	Sección del tejido derivado de una biopsia de la masa tumoral de 2 a 3 mm ³ que se fija a la superficie plástica de las cajas de cultivo por deshidratación.	Valoración del cáncer de mama por tipo histológico y subtipo molecular para determinar particularidades entre el cáncer de mama en grupos específicos. Siembra del explante para poder realizar cultivos primarios.	Valoración del explante por patología con subtipo histológico y molecular confirmado con reporte.	Sección de tejido de mastectomía en pacientes con cáncer de mama confirmado por patología con biopsia previa.	Variable que se emplea para poder expandir células inmortales y favorecer su crecimiento para lograr desarrollar un cultivo celular.
Obesidad	Índice de masa corporal mayor a 30 kg/m ² .	Valoración de cada paciente de acuerdo a su índice de masa corporal para poder categorizarla y al explante que se cultivará.	Medición de peso y talla al ingreso de la paciente y cálculo de IMC con la siguiente fórmula: peso/talla ² .	Pacientes que acuden al Centro Médico ABC programadas para mastectomía por cáncer de mama confirmado por patología que pertenezcan al grupo control (no obesas) o al grupo experimental (obesidad).	Variable independiente que se analizará y correlacionará con los explantes para identificar diferencias entre cáncer de mama con y sin obesidad.
Cultivo celular	Siembra de células provenientes de un	Caracterización de la metodología para la creación	Ensayos de proliferación y tumorigénesis con expansión	Explantes de cáncer de mama.	Variable que se probará en diferentes condiciones

Nombre de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumento de medición	Fuente	Uso
	explante de cáncer de mama en donde se seleccionan únicamente células tumorales y éstas son capaces de proliferar in vitro y ser tumorigénicas en vivo.	del cultivo celular y determinación de las características entre cultivos.	célular y creación de tumores in vivo.		para determinar capacidad de replicación infinita propia de cultivos celulares.
Caracterización celular	Caracterización de los cultivos primarios de cáncer de mama establecidos con precisión en morfología, motilidad y tumorigénesis.	Observación de células in vitro y realización de ensayos de tumorigénesis con ratones atímicos y ensayos de cierre de herida.	Ensayo de tumorigénesis en ratones atímicos/nu/nu y caracterización por patología del tumor resultante, caracterización de morfología por observación y patología, ensayo de cierre de herida con medición de tiempo de cierre en velocidad y tiempo.	Cultivos primarios de cáncer de mama establecidos y probados en placas Petri y ratones atímicos en ensayos controlados para su caracterización celular.	Variable que dependerá de cada cultivo, la cual se analizará para encontrar diferencias entre cultivos de cáncer de mama establecidos en ambientes de obesidad y ambientes sin obesidad.
Caracterización molecular	Caracterización de los cultivos primarios de	Realización de ensayos a cada cultivo primario establecido para	Ensayos de proliferación en tripletes por cinco días,	Cultivos primarios de cáncer de mama	Variable dependiente de las caracterís-

Nombre de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumento de medición	Fuente	Uso
	cáncer de mama establecidos con precisión en ensayos de proliferación, citotoxicidad con dos agentes quimioterapéuticos, medio condicionado y adhesión.	realizar su caracterización molecular.	ensayos de citotoxicidad con doxorubicina y paclitaxel para determinar IC50, aislamiento de medio condicionado celular y realización de ensayos de adhesión en xCelligence y contador de centelleo.	establecidos y probados en placas con pozos de 48, aislamiento de medio condicionado.	tics de cada cultivo primario, buscando diferencias entre cultivos de cáncer de mama establecidos en ambientes de obesidad y ambientes sin obesidad.

Tabla 1.- Operacionalización de variables

Se considera como variable dependiente el cáncer de mama e independiente la obesidad ya que postulamos que las características del cáncer de mama en pacientes mexicanas con obesidad es diferente en términos de pronóstico y tratamiento, de otros cánceres de mama.

9.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Inclusión: Mujeres con cáncer de mama documentado por estudio de patología en cualquier estadio, quienes serán sometidas a cirugía para resección de masa tumoral, que hayan dado su consentimiento para participar en el estudio. Éstas se dividirán de acuerdo a su índice de masa corporal (mayor o menor a 30 kg/m²) como grupo de estudio y grupo control.

Exclusión:

- Reincidencia de cáncer de mama
- Relativo a glándula mamaria
 - Procesos inflamatorios, neoplasias inflamatorias, traumatismo, cirugía previa no incluyendo biopsia, cirugía plástica, tratamiento médico previo de cualquier índole con respecto a neoplasia en mama.

9.6. UNIVERSO DE ESTUDIO, SELECCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA, UNIDAD DE ANÁLISIS Y OBSERVACIÓN

Para poder elegir el universo de estudio fue necesario establecer un protocolo de cooperación entre la dirección médica y dirección quirúrgica, cirujanos, patólogos, oncólogos y enfermeras. La dirección médica y quirúrgica mandaban una lista prácticamente a diario en donde se incluían todas las cirugías de mama que se realizarían ese día. Se seleccionó de manera inicial a pacientes que sería sometidas a mastectomía para poder hablar con su médico tratante y que éste autorizara el involucro del la paciente en la investigación. Posteriormente se acudía a una valoración inicial de la paciente en donde se corroboraban los criterios de inclusión y exclusión, se firmaba el consentimiento informado y se completaba la base de datos. Con la información recaudada se realizó un banco de datos en el cual se valoraron a las pacientes que participaron en el estudio. Los datos que se anotaron fueron nombre, edad, origen, peso, talla, tipo de cáncer de mama, si recibió algún tratamiento previo, cirugía programada y fecha de realización, edad de menarca, uso de anticonceptivos, si utilizó o no terapia hormonal durante menopausia.

Como consiguiente se alertaba al patólogo sobre la recepción de la pieza y se le brindaban 2 tubos cónicos de 50 ml con 15 ml de medio RPMI 1640 para ser refrigerados. Al entrar a la sala quirúrgica lo primero que realizamos fue alertar a

enfermería para que tengan el material estéril listo para recibir la pieza quirúrgica y que esta sea transportada por nosotros a patología. Ya en cirugía, en tres ocasiones el cirujano recordó detalles importantes que excluían a la paciente del estudio. Cuando ya era próxima la extracción de la mama, se volvía a alertar a enfermería para que al salir la pieza, la envolvieran en dos campos estériles y nos brindaran un par de guantes estériles. Con guantes desechables se tomaba la pieza por medio del segundo campo externo y se llevaba a patología. En patología, con guantes estériles se colocaba a la pieza sobre el campo interno que mantenía su esterilidad y se seccionaba un explante de entre 2-5 milímetros. En tres ocasiones fue necesario realizar una tinción de bordes para verificar la extracción completa de la neoplasia y la ‘limpieza’ de los bordes. Posterior a la toma del explante del tumor resecado, se transportó en el tubo cónico con RPMI 1640 al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en donde fue sembrado en medio de cultivo celular de acuerdo al protocolo de tejidos del laboratorio del. Las células aisladas de los cultivos fueron categorizadas por el departamento de investigación.

Inicialmente se había calculado un tamaño de muestra de treinta y dos mujeres en el estudio: Ocho mujeres quienes padezcan cáncer de mama de cada estadio participarán, cuatro con subtipo Luminal A y cuatro con subtipo triple negativo por estadio. Se estimó que cuatro pacientes por grupo sería necesarias, considerando que hasta un 25% de los cultivos primarios se pierden por contaminación o por que las células tumorales no son capaces de crecer en cultivo. De acuerdo al protocolo de cooperación establecido entre los servicios participantes, fue posible llenar el grupo control sin embargo no se completó el grupo experimental por problemas de logística con la dirección médica y la escasez de pacientes con cáncer de mama e IMC > 30 kg/m² quienes fueron sometidas a mastectomías en el centro médico ABC.

9.7. CÁLCULO DE LA MUESTRA

Esta muestra se calculó de acuerdo a la probabilidad de éxito y fracaso, datos que reflejan un ensayo de tipo Bernoulli. Para establecer la muestra y que ésta sea estadísticamente representativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$p \pm z_{\alpha/2} \sqrt{pq/n}$$

p se comprende como la probabilidad de éxito, el cual sería 0.75, tomando en cuenta que 0.25 de los cultivos no se desarrollarían, lo cual correspondería a q. $z_{\alpha/2}$ se comprende como la probabilidad de que el intervalo de confianza contenga a μ , el cual se decidió será del 95%, o $z_{0.025}$. Para n o el número de pacientes, se resolvió con distintos valores, determinando que con 32 pacientes correspondería a un intervalo de confianza de (0.60, 0.90), visto de manera práctica que se puedan realizar de 60 a 90% de los cultivos. Este tamaño de muestra refleja los cultivos celulares que se podrán realizar del universo de pacientes estudiadas, tanto las pacientes con obesidad como las pacientes sin ella. Contiene las siguientes características indispensables para la determinación del tamaño de muestra: accesibilidad y representabilidad.

El estudio es categórico, dado que se espera que las células crezcan in vitro o no lo hagan y que de las células que puedan crecer in vitro solo se conserven las que continúen creciendo por mas de 2 meses y que por tanto sean inmortales. Es un estudio de investigación aplicada, descriptivo y a la vez explicativo, dependiendo de la fase del mismo. Al inicio, en términos del establecimiento del cultivo primario se busca únicamente favorecer el crecimiento de las células tumorales, a lo cual alocamos el término de estudio descriptivo. Posterior al establecimiento de los cultivos, se busca correlacionar a los cultivos primarios de células de cáncer de mama generados en un ambiente con obesidad y aquellos que no fueron generados en este ambiente, por lo cual se vuelve un estudio explicativo, en el cual se buscan similitudes y diferencias entre dos poblaciones. Se podrá considerar no probabilístico ya que realizó por conveniencia en términos de las pacientes en un hospital en particular quienes serían sujetas a una operación en momentos específicos.

Es importante mencionar que al ser una prueba de concepto además de un estudio experimental, no existen antecedentes para poder establecer un posible tamaño de muestra. El cálculo que se mostró anteriormente se hizo con la premisa de un intervalo de confianza y una probabilidad de éxito determinada por el establecimiento de cultivos celulares sin características específicas de ningún tipo.

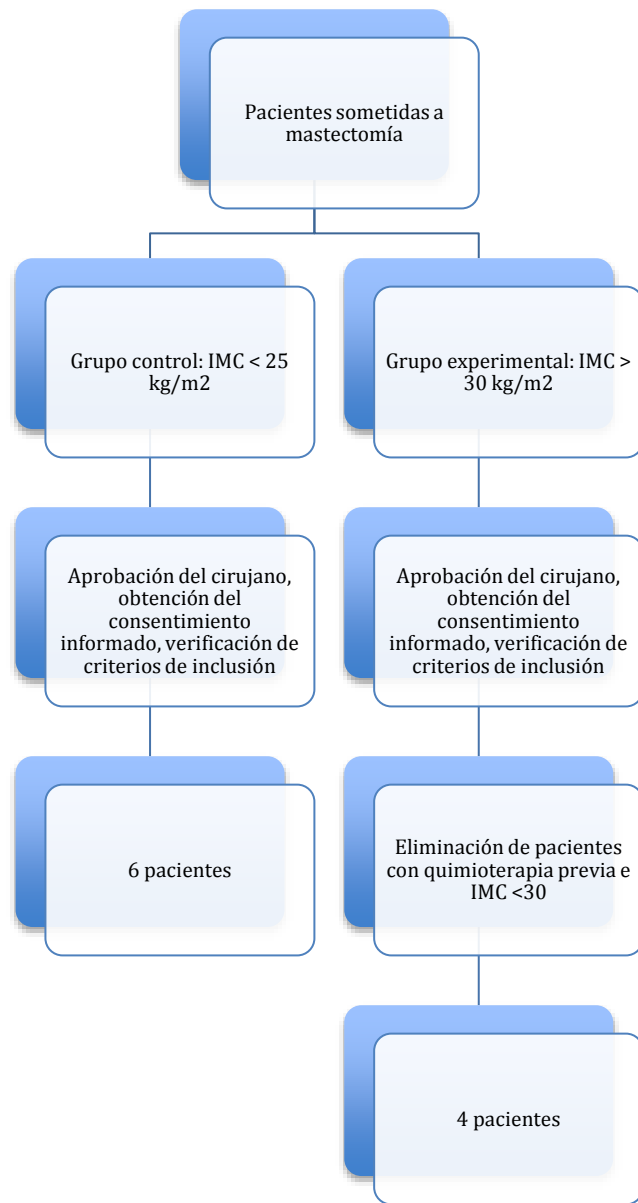


Imagen 1.- Pacientes sometidas a mastectomía

Posteriormente se capacitó a nuevos investigadores para asistir con la creación de cultivos celulares, quienes lograron la toma de 8 explantes adicionales y la creación de 1 cultivo celular. Al tener la técnica completamente establecida y la metodología para este sub-protocolo dentro del estudio, se lograron obtener 14 explantes más y los cuales aún siguen en crecimiento, obteniendo la cantidad total de 32 explantes, cumpliendo el tamaño de muestra.

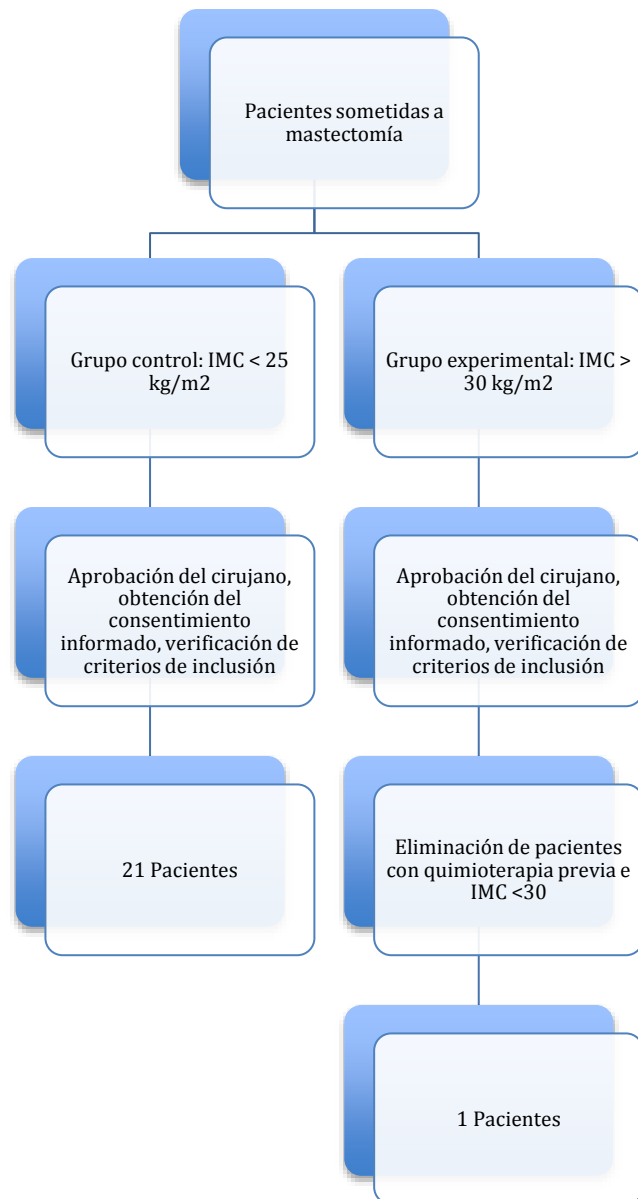


Imagen 2.- Pacientes sometidas a mastectomía posterior al establecimiento de la metodología de toma de explantes

9.8. CREACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS

Los explantes fueron sembrados en la Unidad de Bioquímica, en medio de cultivo celular de acuerdo al protocolo de tejidos del laboratorio del INCMNSZ. Fueron necesarias pinzas finas, un bisturí, gasas, cajas Petri, pipetas Pasteur, guantes, todo estéril, además de una manguera de aspiración, campana, marcador indeleble. Se aspiró el contenido de los tubos cónicos en donde se encontraba el explante y con pinzas finas se removió el explante y se colocó sobre una gasa para poder secar a la pieza. Con las pinzas, se transfirió a una caja Petri en donde se realizaron cortes de aproximadamente 1 mm x 1 mm. Después de 5 minutos se transfirieron a una caja Petri en donde se untaron sobre la superficie, asegurándose de rayar la base para poder identificar la base de la caja al momento de observarla. Se aseguró que quedaron pegados a la base de la placa y se dejaron secar 5 minutos adicionales. Posterior a esto se colocó 3 ml de medio completo (RPMI-1640 + 10%SFB) y se marcó a la caja de acuerdo al número de explante. Se observaron con el microscopio para poder tomar fotografías y establecer valores basales y se colocaron en el incubador. Cabe notar que el procedimiento seguido fue empírico, mediante ensayo y error, encontrando la mejor manera de lograr establecer cultivos primarios en base a los cultivos exitosos.

9.9. INOCULACIÓN EN RATONES ATÍMICOS

Se cultivaron 12 millones de células de uno de los cultivos celulares establecidos, las necesarias para inocular al ratón atímico y probar tumorigénesis. Se colocaron 10 millones de células en un tubo eppendorf adicionado con RPMI-1640 sin rojo fenol y 2 millones en otro. Se marcaron debidamente los ratones a inocular con marcas circulares en las orejas. Fue necesario proveer de material estéril para poder realizar la inyección de células tumorales, al igual que un ambiente especial para ratones atímicos, en el bioterio del INCMNSZ. Como sugerencia del veterinario encargado de los animales en el

bioterio, es importante establecer adecuado rapport con el animal para que sienta menos miedo y se pueda realizar la intervención sin complicaciones. Posterior a su inoculación, los ratones han permanecido en monitorización diaria para poder determinar cambios en peso y/o tamaño tumoral. Aproximadamente 10 días posteriores a la inoculación, se observó el crecimiento de un tumor de 0.3 – 0.7 cms, lo que demuestra que son células con potencial tumorigénico un vivo.

Posterior a esto fue necesario probar curvas de tumorigénesis, para poder monitorizar el tiempo en el que proliferan las células tumorales y cuantas son necesarias para poder desarrollar un tumor in vivo. Se realizaron ensayos en 5 ratones con 20 millones, 10 millones, 5 millones, 2.5 millones, 1.25 millones y 0.65 millones, respectivamente.



Imagen 3.- Ensayos de tumorigénesis



Imagen 4.- Ensayos de tumorigénesis



Imagen 5.- Ensayos de tumorigénesis

Ensayos de tumorigénesis: Imagen 3 – 4: Identificación de ratones atímicos nu-nu. Imagen 5.- Valoración del peso de los ratones

9.10. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA (MOTILIDAD)

Se descongelaron viales de cáncer de mama 5 (DSG – BC1) de manera inicial ya que este mostró tener mayor tasa proliferativa y menor afección posterior al congelamiento. Se sembraron células en dos cajas de Petri de 100 x 15 mm suplementado con RPMI 1640 y 10% de suero fetal bovino. Cuando estas alcanzaron su máxima confluencia, se trazó una línea con una pipeta estéril (herida) a través de la superficie celular, quitando a cualquier célula que estuviese en su camino. Se documentó la confluencia de las células antes de realizar las líneas, y posterior a su realización, al igual que cada 24 horas después. Posterior a la realización de la “herida” se suplementó el medio únicamente con RPMI 1640. Fue posible ver como existe separación de las células del área de la línea, observándose a su vez largos filopodios en las células del borde, dado su gran confluencia y éstas al recibir pocos nutrientes de manera individual y naturaleza migratoria.

9.11. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Con respecto a la curvas de proliferación celular se sembró en una caja Petri de pozos de 48, 12,000 células en cada pozo adicionadas con RPMI 1640 + 10% SFB. A las 24 horas posterior a su sembrío, se fijó un triplete de pozos con 250 ml de glutaraldehido, para poder preservar la actividad que mostraban las células en este momento. Esto se repitió a las 48, 72 y 96 horas. Posteriormente se tiñeron las células con 250 ml de cristal violeta y al secarse se les aplicó 250 ml de ácido acético al 10%. El cristal violeta se adhiere a las células por lo que a mayor cristal violeta, mayor contenido celular en el pozo. Con ácido acético se volatiliza la tinción y se mide la concentración de color en un espectrofotómetro, el cual muestra valores de cantidad de color, interpretado como entre mayor densidad de color, mayor número de células. De esta manera se llevó a cabo un análisis en donde se calculó la cantidad de células que existían cada día y las tasas de proliferación de los cultivos primarios.



Imagen 6.- Proliferación celular

Proliferación celular: 1.- En estas placas de 48 pozos se sembraron 12,000 células por pozo y se determinó por triplicados el estudio que se realizaría. Se obtuvieron 7 placas distintas en donde se realizaron ensayos de proliferación y citotoxicidad con doxorubicina y paclitaxel con sus respectivos controles. Posterior a una monitorización a diario, al quinto día del experimento se fijan todas las células

y se tiñe la placa para ser leída en el espectrofotómetro, el cual capta densidad de color, el cual es mayor dependiendo de la cantidad de células en el pozo respectivo.

9.12. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

En la caja Petri utilizada para el ensayo de proliferación se realizaron también los ensayos de citotoxicidad. Esto sirvió además como un control para valorar a mismo tiempo la proliferación y muerte de los cultivos primarios. Las curvas de quimioterapia se realizaron con dos agentes distintos, doxorubicina y paclitaxel. Para ambos se utilizaron concentraciones de 10 μM , 1 μM , 0.1 μM y 0.01 μM . Fue necesario repetir estos ensayos con respecto a la doxorubicina con concentraciones intermedias entre los valores de 0.01 y 1 para demostrar con mayor exactitud el punto en donde se observa la mayor muerte celular. Se repitió con concentraciones de 1 μM , 0.3 μM , 0.1 μM , 0.03 μM y 0.01 μM . Cada concentración de fármaco se aplica por tripletes y se realiza un promedio al concluir el ensayo, ya que si se aplicaría a un solo pozo los resultados podrán deberse al azar o error humano y ser menos confiables. Para poder analizar la citotoxicidad fue necesario fijar las células con 250 ml de glutaraldehído y posteriormente teñirlas con 250 ml de cristal violeta en el mismo procedimiento que el ensayo de proliferación. Por medio de espectrofotometría se lee la concentración de cristal violeta en cada pozo y se determina la concentración celular del mismo, denotando su tasa de citotoxicidad o muerte celular por quimioterapia.

9.13. MEDIO CONDICIONADO

El medio condicionado fue elaborado a partir de 20 cajas Petri confluentes con 1,560,000 células de DSG – BC1 y DSG – BC2, respectivamente. Después de adquirir la confluencia, se lavaron las placas 5 veces con 5 ml de medio RPMI 1640 y suero salino (500 ml con dilución 1:1). Posteriormente se colocaron 10 ml de RPMI sin rojo fenol y se incubaron por 48 horas. Al término de las 48 horas se recuperó únicamente el medio (RPMI sin rojo fenol) en tubos cónicos de 50 y se congelaron a 4°C. Se recolectaron 6

tubos cónicos con 30 ml cada uno y un tubo cónico con aproximadamente 15 ml. 48 horas después, se liofilizaron, quedando un remanente del medio condicionado en forma de polvo el cual contiene a los factores tumorales de interés. Se reconstituyó en 10% del volumen inicial (3 ml en caso de 30 ml y 1.5 ml en caso de 15ml) y se realizó una diálisis para poder remover al exceso de sales y homogeneizar el medio y los factores solubles tumorales. Para realizar la diálisis se colocó el medio condicionado dentro de tres membranas de plástico y se cerraron con ‘cinchos.’ Se colocaron las membranas dentro de un matríz con 2 litros de medio PBS. Fue necesario que las membranas estén en constante movimiento para poder seguir adecuadamente el procedimiento dialítico por lo que se colocó el matríz sobre un centrifugador y se amarraron las membranas a un imán. Al finalizar el procedimiento dialítico se separó el medio en alícuotas y se realizó una cuantificación de proteína por Bradford.

El medio condicionado es suero nutricio que contiene los nutrientes y proteínas específicas que secretan las células tumorales que se quieren caracterizar. Fue importante observar qué factores son los que producen estas células tumorales para poder realizar estudios subsecuentes para determinar si son específicos a su condición de obesidad.



Imagen 7.- Ensayos con medio condicionado



Imagen 8.- Ensayos con medio condicionado



Imagen 9.- Ensayos con medio condicionado

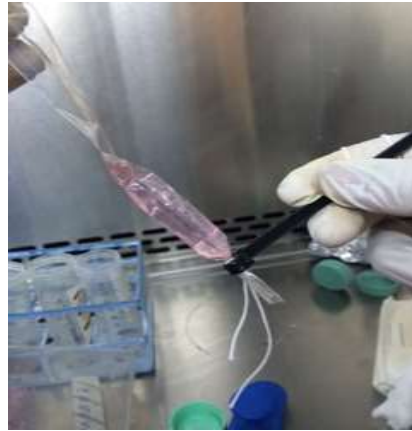


Imagen 10.- Ensayos con medio condicionado



Imagen 11.- Ensayos con medio condicionado



Imagen 12.- Ensayos con medio condicionado

Ensayos con medio condicionado: Imagen 7.- Preparación de medio condicionado mediante RPMI aplicado a células en proliferación. Se utilizó el medio de 20 cajas, elaborado con RPMI 1640 sin rojo fenol. Este medio se congela a -72°C por 48 horas. Imagen 8 - 9.- Liofilización del medio condicionado Imagen 10, 11, 12.- Resustitución de medio condicionado en 10% del volumen inicial y dialización. Se coloca en una membrana de diálisis la cual se amarra firmemente para evitar la salida de cualquier componente interno. Se colocan en un matríz de 2 litros de PBS y se mantiene en agitación por 48 horas.

9.14. OBTENCIÓN DE CÉLULAS HUVEC

Se obtuvieron cordones umbilicales de bebés de menos de 48 horas de vida, idealmente menos de 24 horas. Es importante refrigerar los cordones hasta el momento en que se utilizarán. Se obtuvieron materiales estériles y un espacio estéril en el cual se lavaron los

cordones con solución salina y alcohol. Se canuló la vena y se pinzó la cánula para permitir que se lave todo el trayecto de la vena y se puedan sacar coágulos de sangre remanente. Ya que la vena estaba completamente limpia, se perfundió la vena con colagenasa para deshacer el revestimiento de las venas y se colocaron ‘cinchos’ en los extremos del cordón para sellarla. Se metieron los cordones en un vaso de precipitado con solución salina a 37°C por 10 minutos. Al término, se recuperó la colagenasa con las células endoteliales en tubos cónicos de 50 ml. Se realizaron 5 lavados a la venas con PBS para asegurarse que todas las células habían sido extraídas. Se centrifugaron las células endoteliales con colagenasa y se reconstituyó el pellet en RPMI 1640 + 10% SFB, el cual fue sembrado en placas Petri. Las células endoteliales extraídas fueron utilizadas para los ensayos de adhesión y lectura por contador de centelleo y xCelligence.



Imagen 13.- Obtener materiales estériles



Imagen 14.- Lavar cordones



Imagen 15.- Canalizar la vena, sacar coágulos



Imagen 16.- Poner "cinchos" en los extremos del cordón

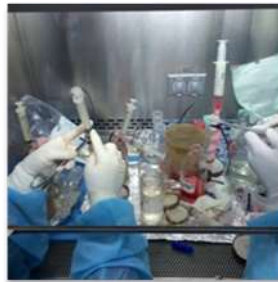


Imagen 17.- Perfundir con colagenasa

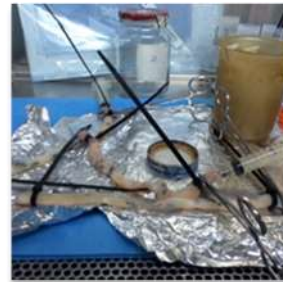


Imagen 18.- Verificar perfusión y sello



Imagen 19.- Incubar en agua tibia 10 minutos, homogeneizar y sacar líquido



Imagen 20.- Lavar con PBS

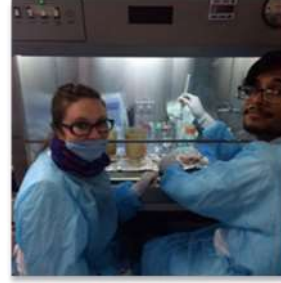


Imagen 21.- Sembrar en placas

9.15. ENSAYO DE ADHESIÓN Y LECTURA POR CONTADOR DE CENTELLEO

Se sembraron 100,000 células HUVEC en 27 pozos y se adicionó 500 ml de medio RPMI 1640 + 10% SFB . Cuando las células se encontraban a confluencia se realizó el ensayo por tripletes en los que se mantuvieron diez condiciones, un control y se aplicó TNF, el medio condicionado de DSG –BC1 y este medio con polimixina, el medio condicionado de DSG – BC2 y este medio con polimixina, polimixina sola, lipopolisacáridos y polimixina, lipopolisacáridos solos y UT. Se mantuvieron estos estímulos durante tres horas y al término se removió el medio y se lavó. Posteriormente se agregaron 13,200,000 monocitos U937 (400,000 por pozo) con timidinatriada, un compuesto radioactivo. Se mantuvieron los monocitos radioactivos por tres horas y al término se lavó y se liso con hidróxido de sodio. Cada condición se colocó en un frasco de cristal del contador del centelleo y se agregó líquido de centelleo (tolueno). Se colocaron los frascos en el contador de centelleo y se dio una lectura de radioactividad. Entre más se pegaron los monocitos a las células endoteliales, mayor fue la radiactividad expresada. La condición aplicada modificó la cantidad de radioactividad y por ende, la capacidad de adhesión de las células endoteliales.

9.16. ENSAYO DE ADHESIÓN Y LECTURA POR XCELLIGENCE

Se sembraron células HUVEC en una placa de xCelligence de 16 pozos. La placa está hecha de oro, ya que es considerado el mejor conductor. Cuando las células están a confluencia se realiza una lectura inicial de 24 horas para establecer una impedancia base. Posterior a esto se adicionó el medio condicionado para valorar modificaciones en la resistencia eléctrica de las células y sus cambios morfológicos. Las células actúan como biosensores y al adicionar un medio condicionado se modifica su adhesión, lo cual habla de permeabilidad vascular in vitro.

9.17. PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN, INSTRUMENTOS A UTILIZAR Y MÉTODOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS DATOS

Posterior a la toma de explantes, estos se almacenaron en un tubos cónicos de 50 ml con 15 ml de suero nutricio RPMI para transportarse al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en donde se seccionaron en fragmentos, aproximadamente 8 por explante y se sembraron en una caja Petri con 10 ml de RPMI + 10% de suero fetal bovino (SFB). Posterior a esta estaba se valorará su crecimiento y actividad metabólica.

9.18. PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: MÉTODOS Y MODELOS DE ANÁLISIS DE LOS DATOS SEGÚN TIPO DE VARIABLES

Estudio descriptivo en donde el crecimiento de células tumorales considera una variable cualitativa (habrá o no crecimiento). Por lo anterior no se aplicó ningún análisis estadístico y simplemente se reportó la eficiencia en el establecimiento de cultivos primarios y la eficiencia con la que se obtengan cultivos primarios que proliferen por más

de dos meses y medio. Se valoró el estado de los explantes diariamente, revisando el estado del medio de cultivo, fragmentos del explante y capacidad de expansión y proliferación celular. Esto se llevó a cabo mediante microscopio, en la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ con un registro escrito y por medio de fotografiado.

9.19. PROGRAMAS A UTILIZAR PARA ANÁLISIS DE DATOS

Tomando en cuenta que no se contaron con datos estadísticos para el estudio, no fue necesario la utilización de un programa para su análisis. El programa Microsoft Excel ® se utilizó solamente para establecer el banco de datos de las pacientes involucradas en el estudio. El programa GraphPadPrism 6 ® fue utilizado para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC50) de los quimioterapúticosdoxorubicina y paclitaxel posterior a su valoración por espectrofotómetro.

10. ASPECTOS ÉTICOS

10.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Dado a que la biopsia de tejido maligno utilizada fue tomada de piezas quirúrgicas ya extirpadas, no se incidió en la paciente ni sufrió algún inconveniente por parte del estudio. De igual manera, se solicitó que las pacientes firmen un consentimiento informado en donde la paciente permitió la toma de un explante de la neoplasia extirpada y se explicó su uso subsecuente. La directora del Centro Médico ABC permitió la elaboración de este proyecto de investigación.

Se sometió a una revisión del comité de investigación y el comité de ética Centro Médico ABC el cual aprobó la realización del presente estudio por medio de una carta de aprobación del protocolo en donde se permitió su realización con número de registro ABC 14.04. Dado a que los cultivos y su monitorización y vigilancia se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), se solicitó además una carta de aprobación del comité de investigación y el comité de ética con número de aprobación 1549 (clave interna 377).

Para la realización de cultivos primarios, las primeras muestras de tejido neoplásico fueron donadas a la unidad de bioquímica del INCMNSZ de cirugía del instituto. Su único uso fue de práctica inicial para poder estandarizar la metodología de los cultivos primarios.

Tanto el protocolo como la base de datos y el consentimiento informado fueron

elaborados de acuerdo a la Declaración de Helsinki, las Normas de Buenas Prácticas Clínicas de la Conferencia Internacional de Armonización, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, la Norma Técnica 313 para la presentación de proyectos e informes técnicos de investigación en las instituciones de atención para la salud y el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos. De manera más específica, de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, artículo 17, se cuenta con un riesgo mínimo para la salud en los pacientes participantes.

10.2. PROCEDIMIENTOS PARA GARANTIZAR ASPECTOS ÉTICOS EN LAS INVESTIGACIONES CON SUJETOS HUMANOS O ANIMALES.

Se elaboró un consentimiento informado en el cual se precisan los objetivos del proyecto, se describe el mismo y se explica el involucro de la paciente, además de que la paciente autoriza la extirpación de un fragmento de la neoplasia extirpada y su utilización en el estudio. En cualquier momento del proyecto la paciente pudo decidir detener su participación en el estudio. En caso de que ya se haya utilizado el tejido para establecer una línea celular, este se retira del medio y se desecharía de manera apropiada. Al participar en el estudio la paciente permitió establecer una línea celular para pacientes con obesidad, fomentando así la investigación del cáncer de mama de manera más individualizada al tomar variables importantes como raza e índice de masa corporal.

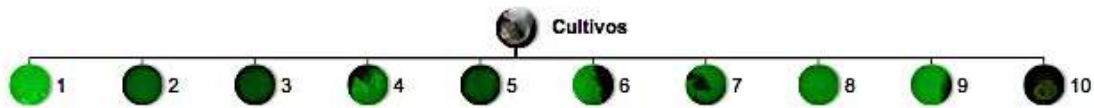
Para cuestiones de la realización del estudio, el nombre de la paciente solamente lo supo Daniela Shveid Gerson, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa y el Dr. Cesar Lara. Las personas quienes estuvieron involucradas en el proyecto ya sea en el establecimiento cultivo o en la elección de pacientes solamente supieron la clave del paciente y las

características del tumor que son pertinentes para la realización de la línea celular. No se hará mal uso de los datos de identificación de los pacientes por parte de ninguno de los investigadores involucrados.

11. RESULTADOS

11.1. CULTIVOS CELULARES

Al inicio, se estudiaron a 10 explantes de pacientes de entre 37 a 73 años de edad con un promedio de 55 años. Se incluyeron 4 pacientes del grupo experimental con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ y 6 pacientes del grupo control con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$. El número reducido de pacientes del grupo experimental se debe a la baja incidencia de pacientes que cumplían los criterios de inclusión en el Centro Médico ABC. Todas las pacientes mostraron tener cáncer de mama ductal, una de ellas in situ, el resto infiltrante. Entre la morfología perteneciente a su estratificación pronóstica, todas las pacientes contaban con biopsia previa y solamente una con metástasis a distancia. Entre las comorbilidades se incluyen enfermedad por reflujo gastroesofágico, hernia hiatal, hipotiroidismo, resistencia a la insulina, diabetes mellitus e hipertensión arterial sistémica.



Paciente	Cultivo	Edad	IMC	Tipo de cáncer
MUESTRAS PILOTO INCMNSZ				
1	5	59	31.5	Ductal infiltrante
2	6 y 7	52	22	Ductal in situ
3	8 y 9	73	35.6	Ductal infiltrante
4	10 y 11	37	27.6	Ductal infiltrante
5	12 y 13	55	21.9	Ductal infiltrante
6	14	69	31.2	Ductal infiltrante
7	15	50	29	Ductal infiltrante
8	16	41	21	Ductal infiltrante
9	17	50	27	Ductal infiltrante
10	18	72	36	Ductal infiltrante

Cultivo	Receptores	Comorbilidades	Otros
1 a 4			
5	RE, RP +, Her2 -		
6 y 7	RE -, RP +, Her2 -		
8 y 9	RE, RP +, Her2 -	DM2, hipotiroidismo, ERGE, hernia hiatal	Metastásico a ganglios
10 y 11	RE, RP +		
12 y 13	RE, RP -, Her2 +		
14			
15			
16	RE+, RP -, Her2 +	ERGE	
17	RE, RP +, Her2 -	HAS, Hipotiroidismo, resistencia a la insulina	
18			

Imagen 22.- Base de datos

Base de datos: Imagen 22: Se observan los explantes sembrados de las 10 pacientes que participaron en el estudio y las características de cada una.

Al estandarizar la metodología para la toma de explantes y la realización de cultivos celulares, se capacitó a nuevos investigadores para asistir con la creación de cultivos celulares, quienes lograron la toma de 8 explantes adicionales y la creación de 1 cultivo celular adicional. Al tener la técnica completamente establecida y la metodología para este sub-protocolo dentro del estudio, se lograron obtener 14 explantes más los cuales se encuentran aún en crecimiento, obteniendo la cantidad total de 32 explantes. La cifra final se resume a 2 líneas celulares y 3 cultivos celulares de cáncer de mama de 32 explantes mamarios, 3 de ellos provenientes de pacientes con obesidad.

Cultivo	Edad	IMC	Tipo de Cáncer	Receptores	Comorbilidades	Otros
Cáncer de mama 11	64	28.08	Ductal infiltrante	RE, RP, Her2 -		Metástasis a ganglios
Cáncer de mama 12	61	29.27	Ductal infiltrante	RE, RP +		Metástasis a ganglios
Cáncer de mama 13	69	23.22	Ductal infiltrante	RE, RP +		Luminal A
Cáncer de mama 14	67	19.47	Ductal infiltrante	RE +, RP +		Luminal B
Cáncer de mama 15	54	19.47	Ductal infiltrante	RE, RP, Her2+		
Cáncer de mama 16	60	21.45	Ductal infiltrante	RE, RP, Her2 -		Asociado a derrame pleural
Cáncer de mama 17	59	28.13	Carcinoma lobulillar	RE, RP, Her2 -		Asociado a derrame pleural
Cáncer de mama 18	57	29.05	Ductal infiltrante	RE, RP, Her2+		Asociado a derrame pleural
Cáncer de mama 19	67	27.9	Ductal infiltrante	RE, RP +	Hipotiroidismo, DM2	Luminal A
Cáncer de mama 20	76	29.7	Carcinoma Lobulillar	RE +, RP +	HTA, enfermedad de Paget cutánea	Luminal B
Cáncer de mama 21	59	25.5	Ductal infiltrante		Hipercolesterolemia	
Cáncer de mama 22	43	23.4	Carcinoma lobulillar	RE, RP +		Luminal A
Cáncer de mama 23	49	23.2	Pb Linfoma			
Cáncer de mama 24	19	20.1	Ductal infiltrante			
Cáncer de mama 25	56	24.2	Ductal infiltrante			
Cáncer de mama 26	64	22.3	Ductal infiltrante			
Cáncer de mama 27	43	25.4	Ductal infiltrante			
Cáncer de mama 28	46	25.3	Ductal infiltrante		Hipotiroidismo, fibromiálgia, pre DM2	
Cáncer de mama 29	44	23.2	Ductal infiltrante	RE, RP +		Luminal A
Cáncer de mama 30	60	28.3	Ductal infiltrante	RE +, RP +		Luminal B
Cáncer de mama 31	75	31.3	Lobulillar pleomórfico	RE +, RP +		Luminal B
Cáncer de mama 32	32	23.8	Ductal infiltrante	RE, RP +		Luminal A

Imagen 23.- Base de datos posterior a la estandarización de la metodología de toma de cultivos

Base de datos: Imagen 23: Se observan los explantes sembrados de las 22 pacientes que participaron en el estudio posterior al establecimiento y estandarización de la metodología para la obtención de explantes y la realización de cultivos celulares y las características de cada una de las pacientes involucradas.

Los primeros explantes, al ser una prueba de concepto y un estudio que nunca se había hecho por parte del investigador se realizó con mayor tiempo, con obtención de más detalles que determinamos a lo largo del proceso carecer que la importancia que originalmente se les atribuyó. Los primeros cultivos primarios surgieron de los cultivos 5 y 7. Es relevante mencionar que el cultivo 5, DSG- BC1 provino de una paciente de 59 años con cáncer de mama izquierdo ductal infiltrante. Tuvo inicio de menstruación a los 14 años y reglaba cada 28 días con una duración de tres días con fecha de última menstruación 01.01.06 (postmenopausica). Tuvo cuatro embarazos culminados en 4 partos de hijos vivos. Negó la utilización de anticonceptivos y su único antecedente fue la extirpación de un lipoma en el 2000. El porcentaje de receptores de estrógenos que tenía fue de receptor de estrógeno 92%, receptor de progesterona 95% y Her2 negativo (luminal A).

Con respecto al cultivo 7, DSG – BC2, provino de una paciente de 52 años con carcinoma ductal in situ izquierdo. Tuvo inicio de menstruación a los 11 años con ciclo regular con una duración 4 días cada 30 días y fecha de última menstruación 10.10.14 (perimenopausica). Tuvo dos embarazos, ambos culminados en abortos. Sin presencia de comorbilidades. Su estado de receptores hormonales fue negativo para receptores de estrógeno y Her2 y receptores de progesterona en 2.9% (triple negativo).

Para mantener a los explantes fue necesario aprender a expandir, sembrar y mantener líneas celulares de cáncer de mama ya determinadas. Esto se realizó con tres diferentes tipos de líneas celulares de cáncer de mama, MDA MB 231, MCF7 y D5, una línea originada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Un vial de cada línea fue descongelado y expandido. El proceso de expansión se mantiene para poder contar con múltiples clonas de las células de interés, sin embargo podrá ser que nada más se necesite contar con una caja Petri acarreadora en la que a pesar de realizar el procedimiento de expansión celular, solamente se divide la muestra homogeneizada para mantener una caja y el resto del contenido celular se desecha.

Para poder realizar dichas actividades fue necesario acudir diario al laboratorio para poder valorar el estado de las células. Dependiendo de su densidad es que se decidía si se tripsinizaban (depegaran y expandieran) o no, sin embargo debido al alto índice de proliferación y mitosis, en ocasiones se acidificaba el medio que contenían por lo que era necesario hacer un cambio de medio sin tripsinización. Normalmente el medio completo que se utiliza es de color rosado – violáceo, sin embargo si comienza a acidificarse se torna rosa claro, naranja, naranja – amarillento, amarillo claro y finalmente prácticamente transparente. Idealmente el medio se debe de cambiar cuando se torna naranja ya que si se espera que se comience a tornar amarillo las células se comienzan a despegar de la placa y entrar en apoptosis. En ocasiones en las cuales esta conducta se repite, las células se acostumbran a un ambiente de estrés metabólico en la que proliferan adecuadamente

en un medio ácido, por lo que podrán generar una clona de tumor más agresivo o simplemente distinto del de origen. Es necesario valorar su capacidad de adhesión, densidad, formación de conglomerados, porcentaje de mitosis y homogeneidad celular y en ocupación de la placa.

Se hizo un enfoque en todos los niveles de la caja en donde se encuentran los cultivos, para determinar el estado de los fragmentos de tejido, los detritus celulares y sobrenadante graso, el fondo de la caja. Se realizó mayor énfasis en la periferia de los fragmentos ya que de ahí es donde se desprenden las células tumorales.

Con respecto al tejido mamario normal que provino de los explantes, se observó desde el inicio mayor densidad en los fragmentos con respecto a adipocitos y pocas áreas de expansión. La manera en la que comenzó la desintegración del fragmento dio como resultado múltiples áreas de detritus celulares, adipocitos y estructuras grasas cristalizadas. La adhesión de los fragmentos fue limitada, ya que pierden esta capacidad con el paso del tiempo. Si se agita la caja todos los fragmentos son desplazados y aún así conservan su arquitectura.

Los explantes de pacientes con obesidad y sin obesidad siguen los mismos patrones de proliferación neoplásica. A la semana de la siembra comenzaron a hacerse visibles múltiples zonas de detritus celulares y adipocitos en el interior de los fragmentos. Aproximadamente 3 semanas posterior a la siembra comienzan a proliferar fibroblastos, los cuales son generalmente los primeros que salen de los fragmentos. Los fibroblastos se distinguen por su forma alargada y fusiforme característica. En ocasiones, la proliferación de células tumorales ocurre de manera simultánea con los fibroblastos. En la mayoría de los casos, estas crecen 1 o 2 semanas posterior a la aparición de fibroblastos. Las células tumorales son ovoideas, algunas cuboides, todas con núcleo aparente. En ocasiones, llegan a contar con escasos lamelipodios o prolongaciones celulares.

Se realizaron distintos ensayos para valorar el mejor método de sembrío y cultivación celular. Se intentó un nuevo método de sembrado del explante utilizando colagenasa y dejándolo reposar 20 horas. Se centrifugó el homogenado con medio de cultivo DMEM y se sembró en cajas de 12 pozos mediante centrifugación diferencial del sobrenadante a 45, 100 y 200 gravedades respectivamente. Se utilizó colagenasa para poder deshacer a los fragmentos tumorales y poder únicamente sembrar células. Este método no mostró fructífero ya que al deshacer a los fragmentos tumorales, el contenido celular entero de fragmento proliferaba, incluidos fibroblastos y células adiposas. Los fibroblastos proliferan inicialmente más rápido que las células tumorales, por lo que a cabo de pocos días existían prácticamente puros fibroblastos. Las pocas células tumorales que lograron crecer y proliferar existían de manera aislada, por lo que realizaron técnicas de separación de fibroblastos. Esta manera no mostró ser superior a la previamente establecida ya que además utilizaba mayor material y tiempo del personal.

Todos los cultivos fueron sometidos a valoración con técnicas de separación de fibroblastos ya que prácticamente todas estaban contaminadas por este otro tipo de célula. La primer estrategia consistía en una separación manual de los fibroblastos utilizando una espátula especializada. Se marcó previamente el área son donde mayor concentración de fibroblastos se observaba y posteriormente se raspó con la espátula. Como consiguiente se aplicó PBS para efectuar un lavado y se deshechó, removiendo consigo el exceso de fibroblastos. La segunda manera de realización consistió en una adhesión diferencial en donde después de expandir una caja Petri con más de 80% de confluencia celular se removió el contenido entero y se resembró el sobrenadante tras 20 y 40 minutos de incubación del cultivo. La tercera manera en la que se llevó esto a cabo fue mediante sedimentación diferencial del cultivo, en donde de 15 ml de RPMI-1640 + 10% de SFB mezclado con el contenido de una caja Petri de cultivo celular se separó en 5 partes, cada una consistiendo de 3 ml, sembrándose cada parte en una caja diferente. Las estrategias que demostraron tener la mayor utilidad fueron la primera y la segunda, por lo que se empleó una combinación de estas en todos los cultivos.

Al realizar las técnicas previamente establecidas de observaron además áreas con crecimiento exclusivo de células tumorales, las cuales diferían de la morfología de los fibroblastos, adipocitos y escasas células epiteliales que se lograron observar en el cultivo. Para mantener esta área sin infiltrados externos ni contaminaciones celulares, se empleó un aro de clonación.



Imagen 24.- Periodo de capacitación



Imagen 25.- Periodo de capacitación

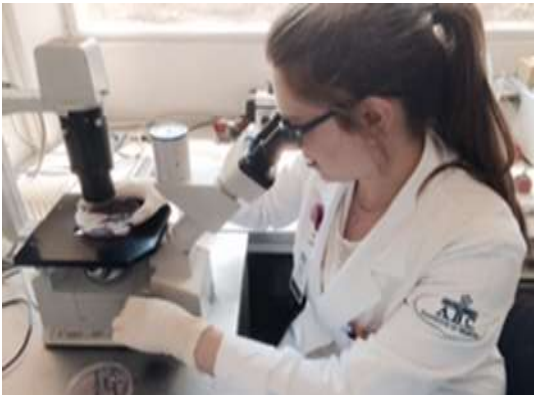


Imagen 26.- Periodo de capacitación



Imagen 27.- Periodo de capacitación

Periodo de capacitación: Imagen 24.- Diario de trabajo y procedimientos. Imagen 25.- Aspiración de medio de cultivo dentro de caja Petri. Imagen 26.- Observación de cultivo celular bajo microscopio. Imagen 27.- Incubación de cultivos.

Metodología cultivos celulares



Imagen 28.- Metodología cultivos celulares

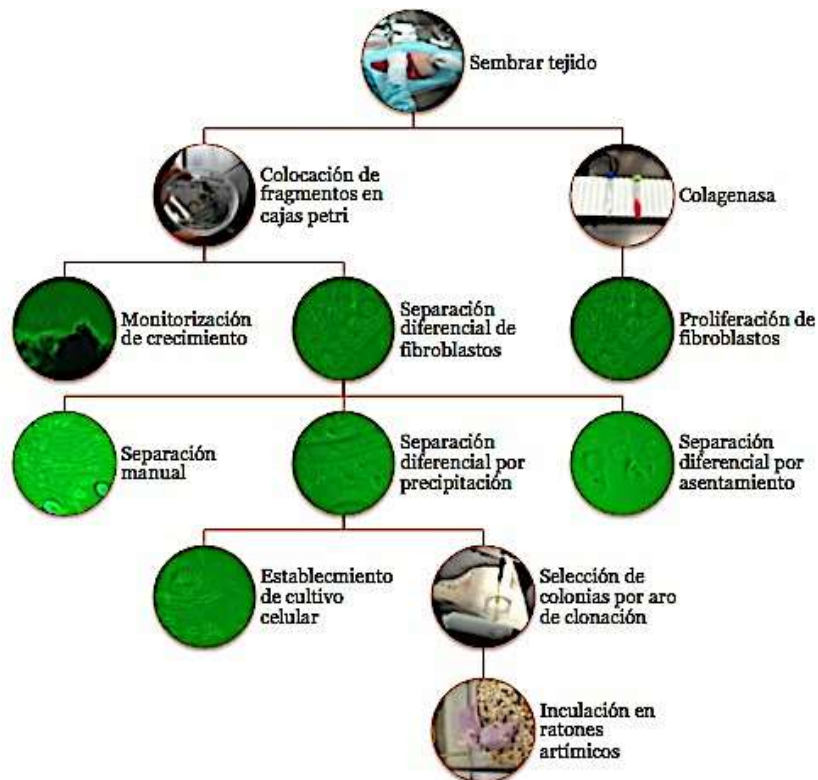


Imagen 29.- Separación celular

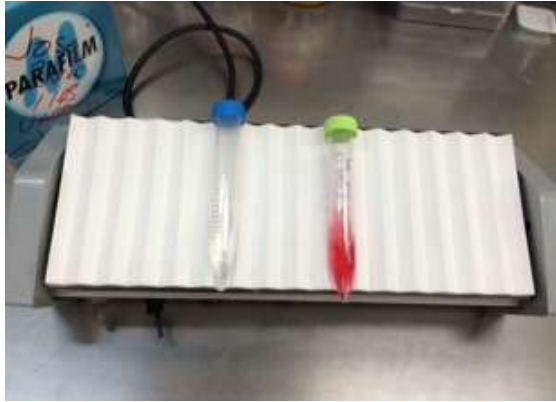


Imagen 30.- Utilización de colagenasa

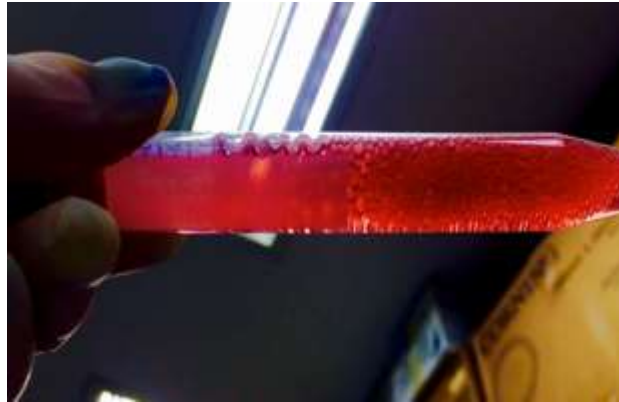


Imagen 31.- Utilización de colagenasa

Utilización de colagenasa: *Imagen 30:* El fragmento tumoral se coloca en solución con colagenasa para su disolución. Se coloca en balance con tubo cónico que contiene la misma cantidad para poderse agitar durante 20 horas continuas. *Imagen 31:* Tubo cónico con solución de colagenasa, sin fragmentos tumorales .

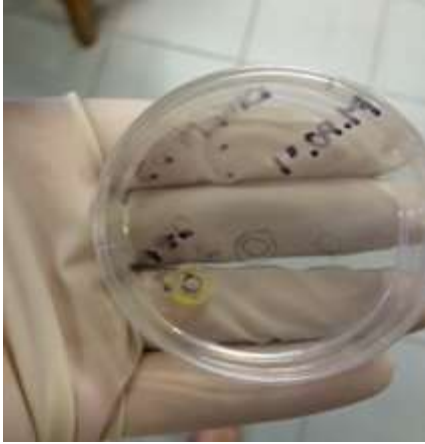


Imagen 32.- Aros de clonación



Imagen 33.- Aros de clonación

Aros de clonación: *Imagen 32: Colocación de aro de clonación encima de ara delimitada que contiene únicamente células tumorales. Imagen 33: Colocación de tripsina y aspiración.*



Imagen 34.- Congelación de viales

Congelación de viales: *Imagen 34.- Viales de congelación que contienen cultivos celulares marcados con tipo de cultivo, nombre y fecha de congelación.*



Imagen 35.- Toma de explantes



Imagen 36.- Toma de explantes



Imagen 37.- Toma de explantes



Imagen 38.- Toma de explantes



Imagen 39.- Toma de explantes

Toma de explantes: Imagen 35.- Diseción de la mama, separación de parrilla costal. Imagen 36.- Liberación de mama del tejido circundante. Imagen 37.- Pieza quirúrgica completa colocada en riñón estéril para ser transportado a patología. Imagen 38.- Localización de tumor dentro de pieza quirúrgica. Imagen 39.- Aislamiento del tumor y toma de explante.



Imagen 40.- Marcaje de bordes



Imagen 41.- Marcaje de bordes



Imagen 42.- Marcaje de bordes

Marcaje de bordes: Esta técnica es utilizada únicamente con tumorectomías o lumpectomías para valorar que los bordes quedan libres de neoplasia. Los criterios definen que un “borde libre” es cuando la neoplasia no está en contacto con los bordes de la pieza quirúrgica, sin importar la distancia en milímetros. *Imagen 40.- Marcaje de bordes de pieza quirúrgica: naranja – lecho, amarillo - lateral izquierdo, rojo – lateral derecho, verde superior, negro – inferior. Imagen 41.- Sección de la pieza quirúrgica y corte de seda quirúrgica. Imagen 42.- Visualización directa de la neoplasia (interior, decoloración del tejido) y sección.*



Imagen 43.- Cuidado general de cultivos



Imagen 44.- Cuidado general de cultivos



Imagen 45.- Cuidado general de cultivos



Imagen 46.- Cuidado general de cultivos



Imagen 47.- Cuidado general de cultivos

Cuidado general de cultivos: Imagen 43 y 44.- Fragmentos del explante tumoral adicionados con RPMI 1640 + 10% de suero fetal bovino (medio completo). Imagen 45, 46 47.- Cambio de color de medio completo. Entre más violeta se vea, menos contaminación y menos ácido está el medio. Entre más claro y amarillento, necesario de cambiar.

CULTIVOS INDIVIDUALES

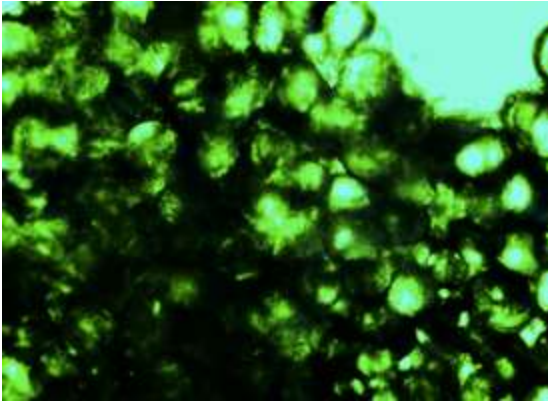


Imagen 48.- Tejido mamario normal 1

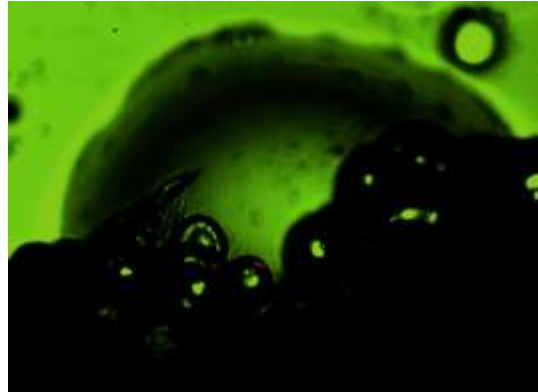


Imagen 49.- Tejido mamario normal 1

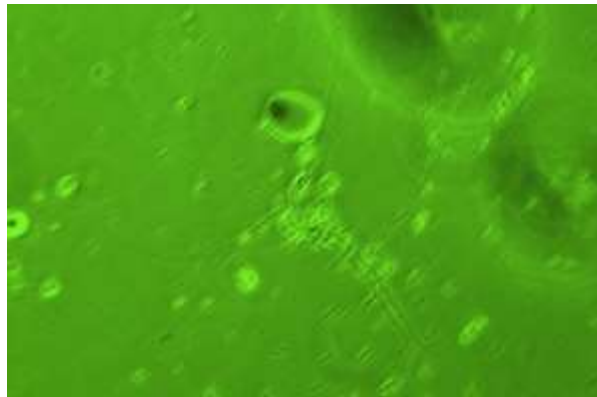


Imagen 50.- Tejido mamario normal 1

Tejido mamario normal 1: Imagen 48.- Fragmento de tejido compuesto por adipocitos. Se distinguen ya que las células carecen de núcleo, son grandes y circulares y se puede visualizar su interior lipídico. (10x) Imagen 49.- Fragmento de tejido compuesto por adipocitos con grandes inclusiones lipídicas y micelas de grasa (10x). Imagen 50.- 2 semanas posteriores al sembrío, se visualiza un fibroblasto flotando entre las micelas de grasa. No se puede enfocar ya que se encuentra en constante movimiento, al igual que su adhesión se ve comprometida (20x).

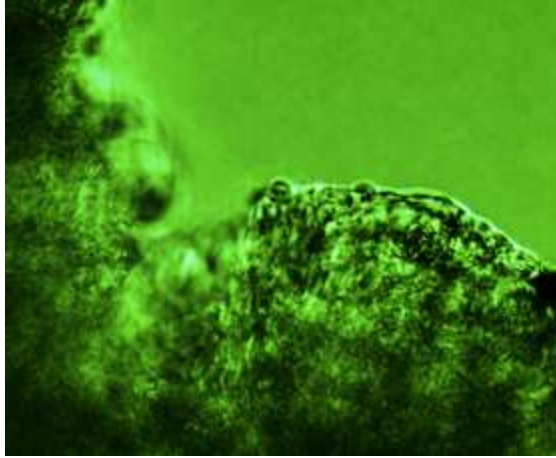


Imagen 51.- Cáncer de mama 2

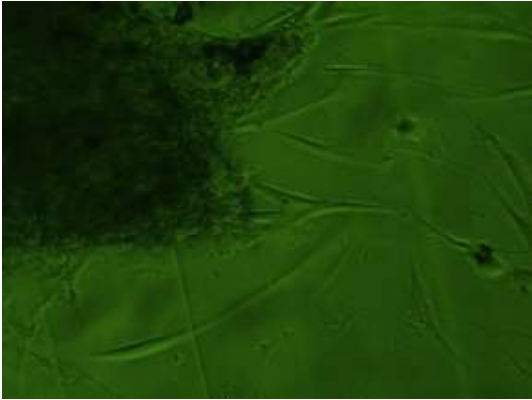


Imagen 52.- Cáncer de mama 2

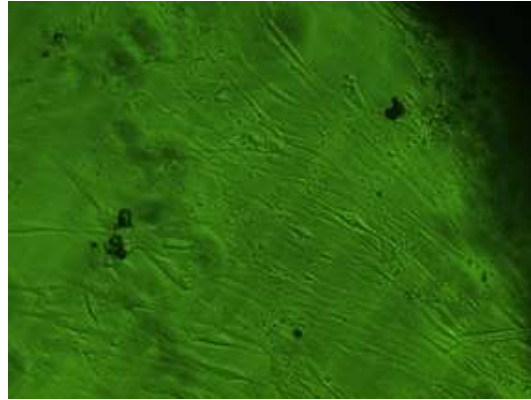


Imagen 53.- Cáncer de mama 2

Cáncer de mama 2: *Imagen51.- Sembrado inicial del fragmento tumoral. Se distinguen los diversos relieves del borde del fragmento, además de que no existen células que traspasan el borde (10x). Imagen52.- 20 días después de ser sembrado se aprecian fibroblastos que comienzan a salir del tejido (20x). Imagen53.- Una semana después de observar áreas con redes interconectadas de fibroblastos en >40% de la superficie de la placa (10x).*

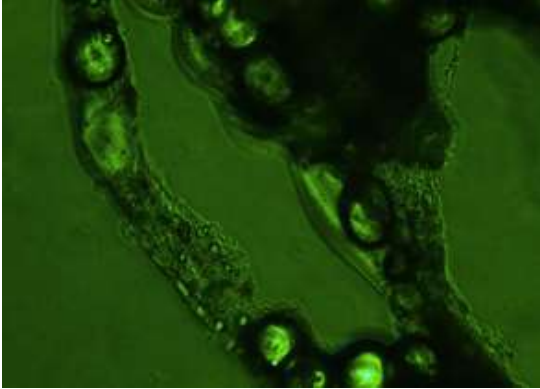


Imagen 54.- Tejido mamario normal 3

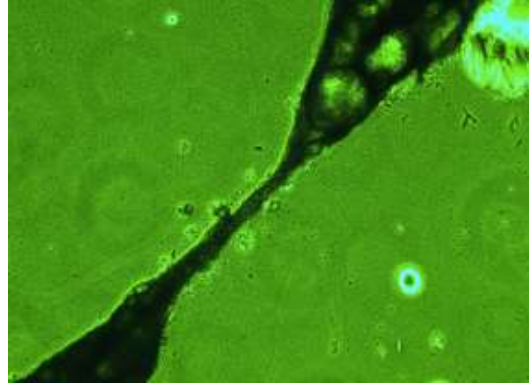


Imagen 55.- Tejido mamario normal 3

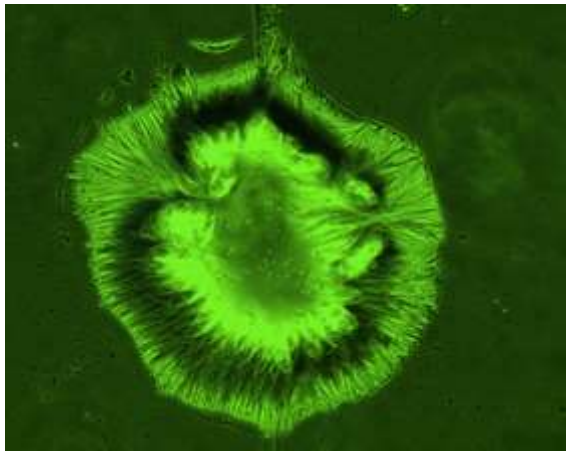


Imagen 56.- Tejido mamario normal 3

Tejido mamario normal 3: Imagen 54 y 55.- Un fragmento de tejido mamario normal en donde se aprecian distintos componentes celulares: células epiteliales (pequeñas, centrales a la imagen) y células adiposas (grandes, distales a la imagen, redondas, sin núcleo) (10x). Imagen 56.- Se observaron este tipo de grasas que adquirieron una forma de cristalización (40x).

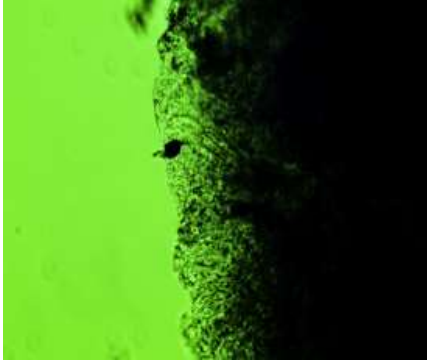


Imagen 57.- Cáncer de mama 4

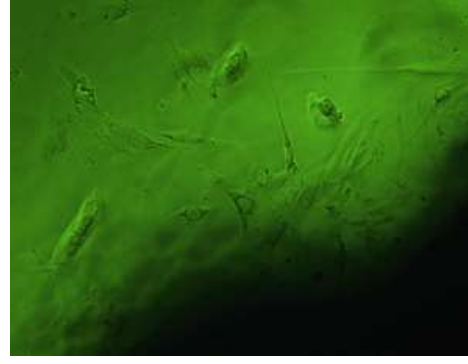


Imagen 58.- Cáncer de mama 4

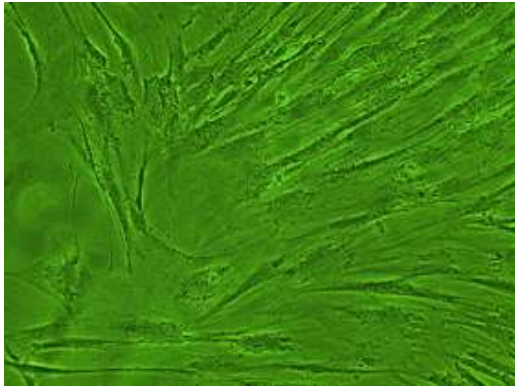


Imagen 59.- Cáncer de mama 4

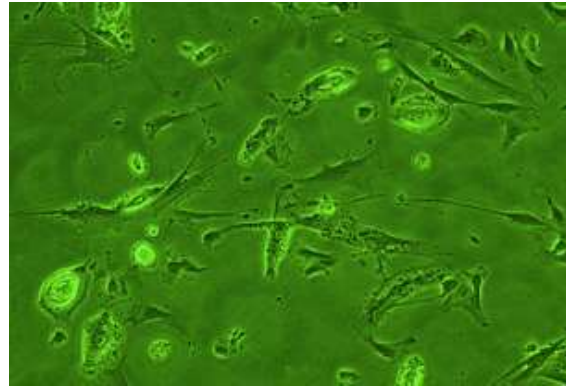


Imagen 60.- Cáncer de mama 4

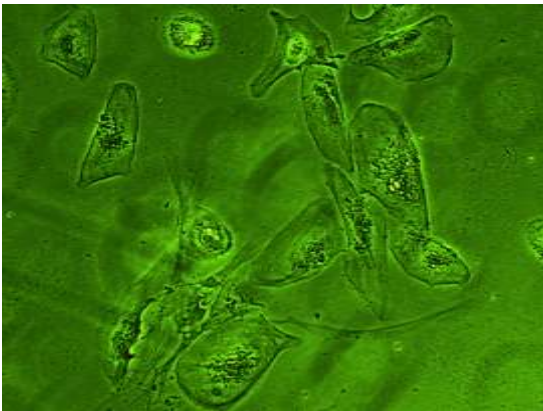


Imagen 61.- Cáncer de mama 4

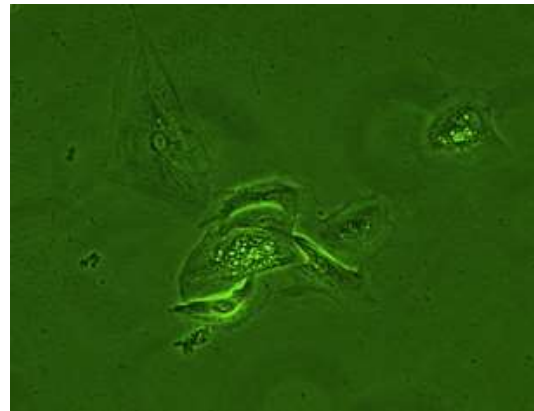


Imagen 62.- Cáncer de mama 4

Cáncer de mama 4: Imagen 57.- Fragmento en los primeros días de sembrado. No protruyen células del fragmento ni se puede observar expansión celular (10x). Imagen 58.- Expansión inicial de fibroblastos y células tumorales 25 días después de sembrado (20x). Imagen 59.- Red de fibroblastos. Dada la intensidad y la tasa de proliferación de los mismos, no se encuentran células tumorales entremezcladas (20x). Imagen 60.- Zonas de coexistencia de fibroblastos y células tumorales (20x). Imagen 61 y 62.- Células tumorales (40x).

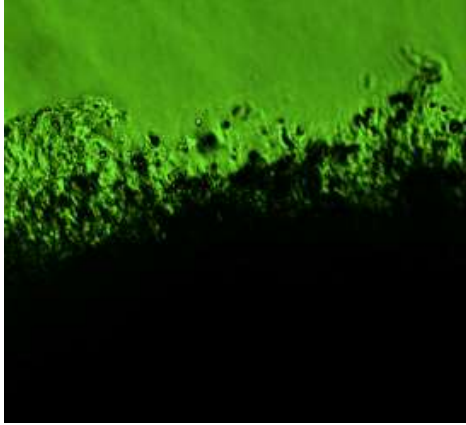


Imagen 63.- Cáncer de mama 5

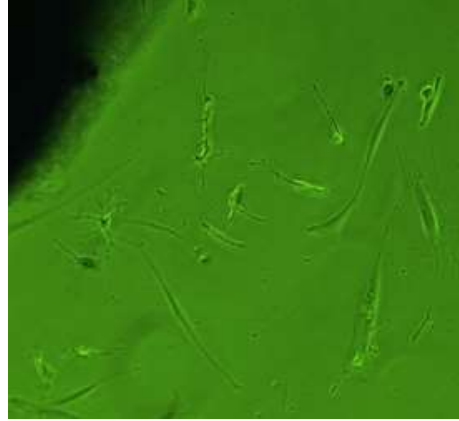


Imagen 64.- Cáncer de mama 5

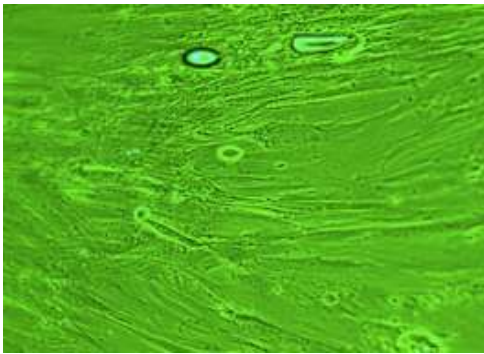


Imagen 65.- Cáncer de mama 5

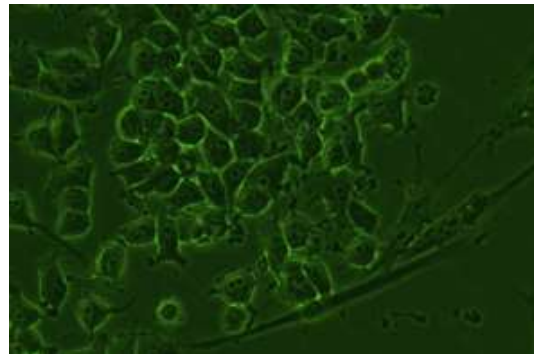


Imagen 66.- Cáncer de mama 5

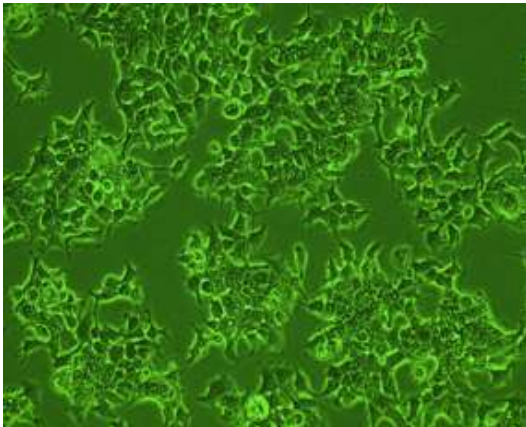


Imagen 67.- Cáncer de mama 5

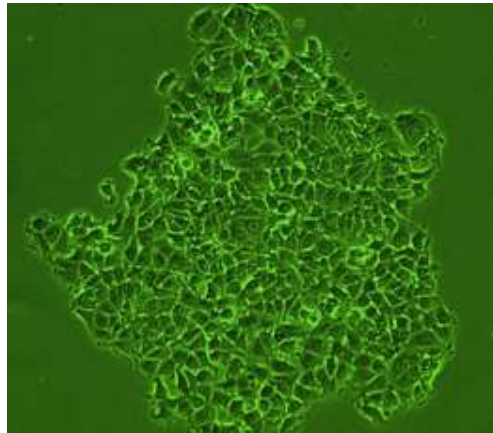


Imagen 68.- Cáncer de mama 5

Cáncer de mama 5: Imagen 63.- Fragmento inicial sin proliferación celular. Bordes limpios (10x). Imagen 64.- Proliferación inicial de fibroblastos 20 días posteriores a sembrado inicial (20x). Imagen 65.- Una semana después: red intensa de fibroblastos con inclusiones grasa (10x). Imagen 66.- Proliferación mixta de células tumorales y fibroblastos (20x). Imagen 67 y 68.- Cultivo primario de células tumorales (20x), DSG – BC1.

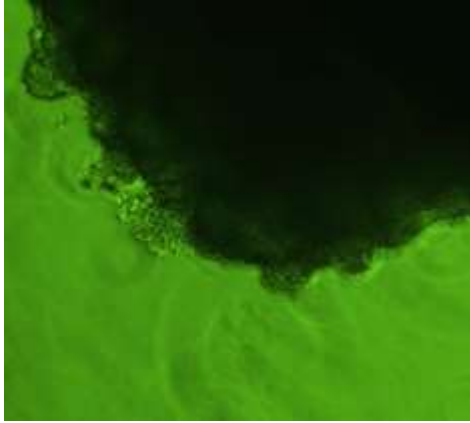


Imagen 69.- Cáncer de mama 6

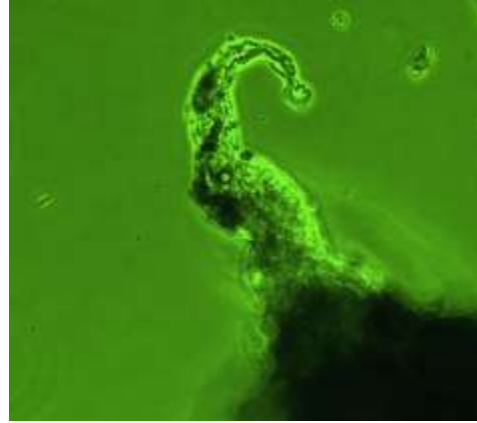


Imagen 70.- Cáncer de mama 6

Cáncer de mama 6: *Imagen 69.- Sembrado inicial de fragmento tumoral (10x). Imagen 70.- Tres semanas después no se observa proliferación celular. Los fragmentos comienzan a perder su capacidad de adhesión y forman proyecciones largas. Se comienza a desintegrar la matriz extracelular (10x).*

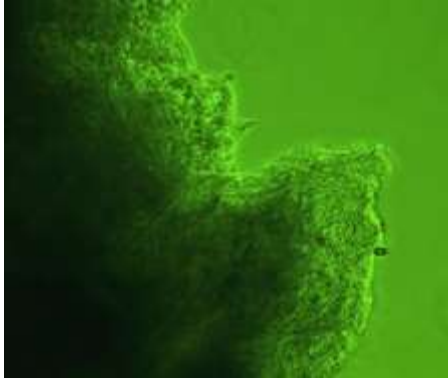


Imagen 71.- Cáncer de mama 7

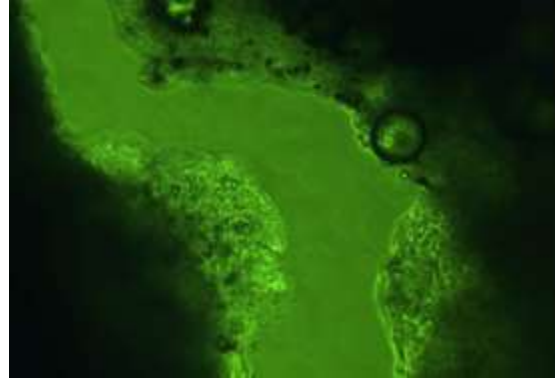


Imagen 72.- Cáncer de mama 7

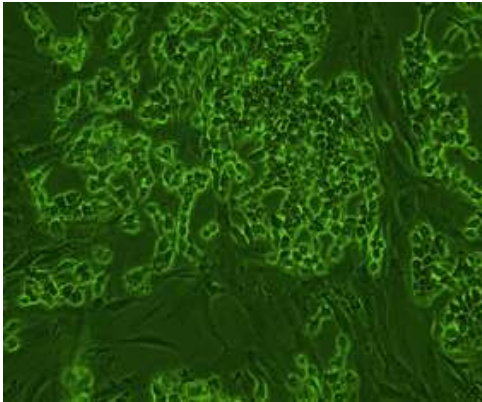


Imagen 73.- Cáncer de mama 7

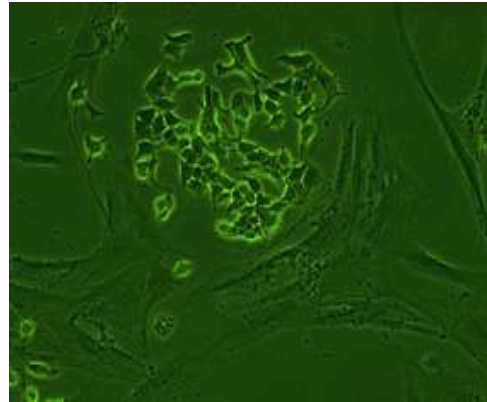


Imagen 74.- Cáncer de mama 7

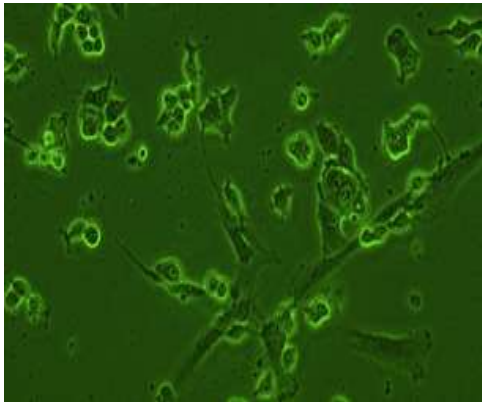


Imagen 75.- Cáncer de mama 7

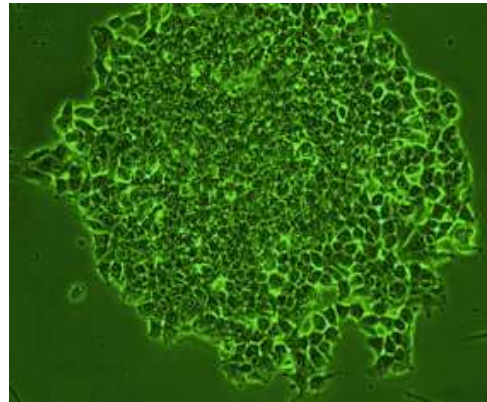


Imagen 76.- Cáncer de mama 7

Cáncer de mama 7: Imagen 71.- Sembrado inicial de fragmento tumoral. A partir de estos fragmentos se intenta hacer una especie de barrido con los bordes para favorecer la visualización de los bordes del fragmento (10x). Imagen 72.- Desintegración de matriz extracelular y separación de fragmentos tumorales. Bordes inter-fragmentarios con adipocitos y células epiteliales (10x). Imagen 73, 64, 75.- Proliferación mixta de fibroblastos y células tumorales (20x). Imagen 76.- Cultivo primario de células tumorales (20x), DSG – BC2.

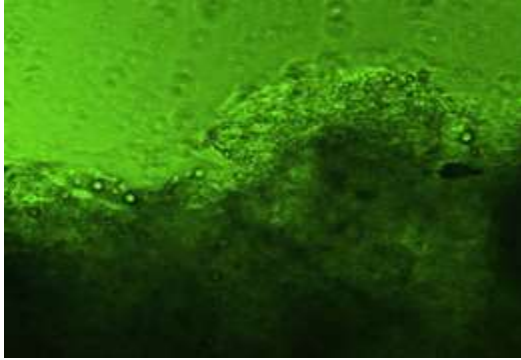


Imagen 77.- Cáncer de mama 8

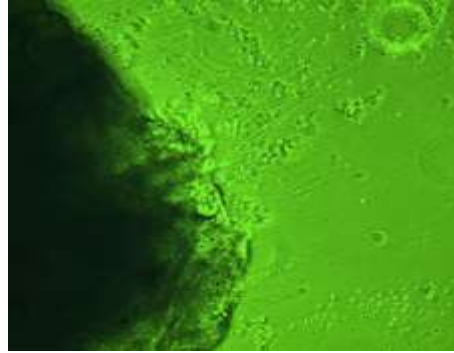


Imagen 78.- Cáncer de mama 8

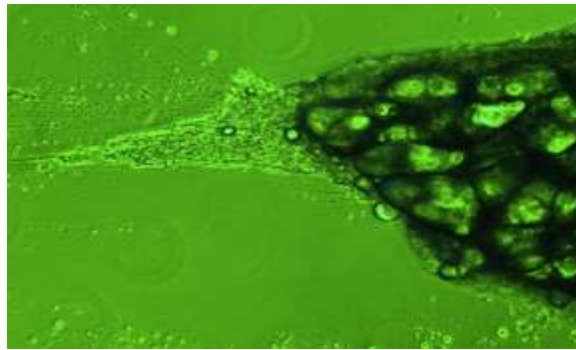


Imagen 79.- Cáncer de mama 8

Cáncer de mama 8: Imagen 77.- Sembrado inicial de fragmento tumoral con técnica de barrido de bordes (10x). Imagen 78.- 2 semanas después se comienza a ver la desintegración de la matriz extracelular. Los bordes ya no aparecen nítidos, se observan detritus a su alrededor (10x). Imagen 79.- Periferia de fragmento lleno de detritus. Numerosas células adiposas al interior de los fragmentos ahora visibles por desintegración de matriz (10x).

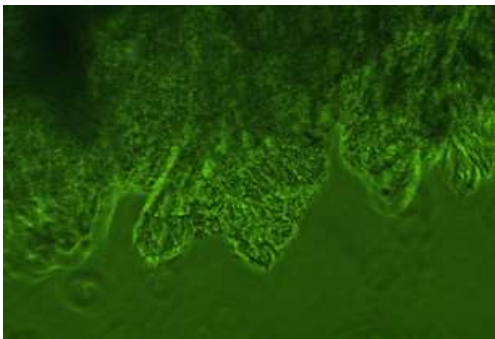


Imagen 80.- Cáncer de mama 9

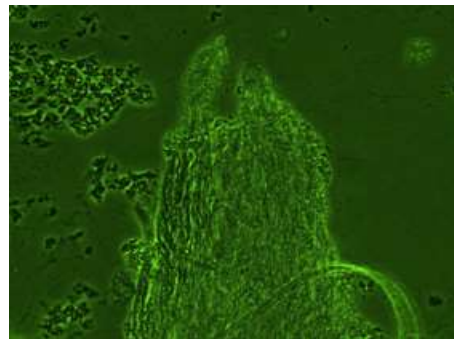


Imagen 81.- Cáncer de mama 9

Cáncer de mama 9: Imagen 80.- Sembrado inicial de fragmento con técnica de barrido de bordes (10x). Imagen 81.- Fragmento tumoral con desintegración de matriz, periferia y medio rodeados de detritus celulares (10x).

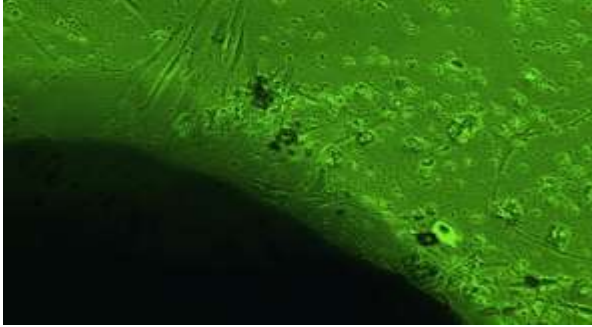


Imagen 82.- Tejido mamario normal

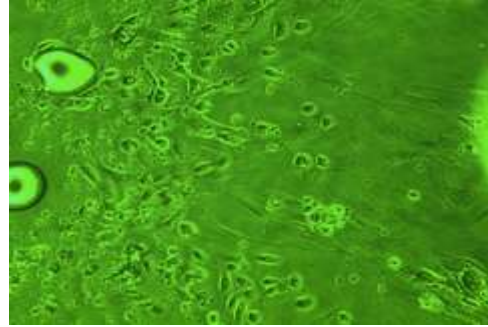


Imagen 83.- Tejido mamario normal

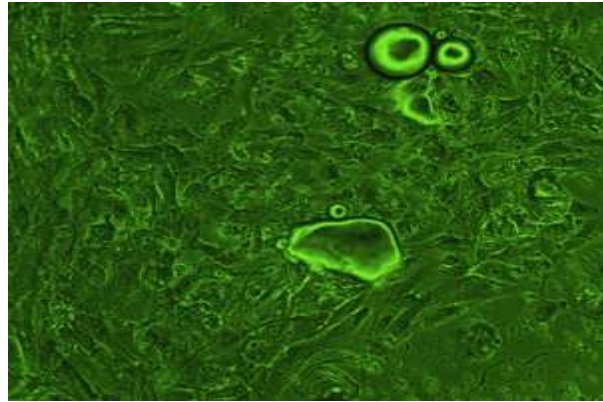


Imagen 84.- Tejido mamario normal

Tejido mamario normal 10: *Imagen 82.- 15 días después de sembrado inicial comienzan a proliferar fibroblastos y células epiteliales normales del fragmento inicial. Se aprecian cuerpos lipídicos y detritus celulares (10x). Imagen 83 y 84.- Área de células epiteliales sin contaminación por fibroblastos, con inclusiones grasa (10x y 20x respectivamente).*

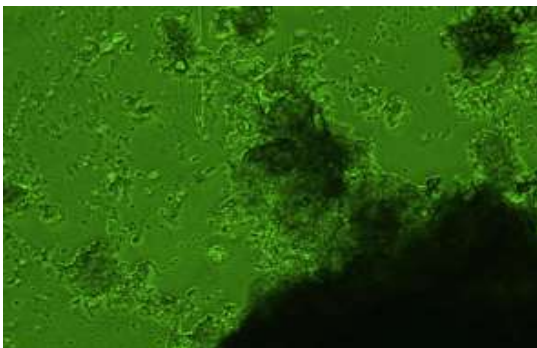


Imagen 85.- Cáncer de mama 11

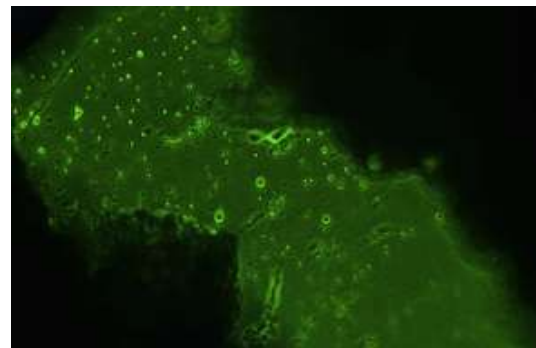


Imagen 86.- Cáncer de mama 11

Cáncer de mama 11: *Imagen 85.- 25 días después de sembrado inicial se observa desintegración masiva de matriz extracelular con aglomerados de detritus celulares y partes del fragmento inicial (10x). Imagen 86.- Separación del fragmento inicial con desintegración de matriz extracelular (10x).*

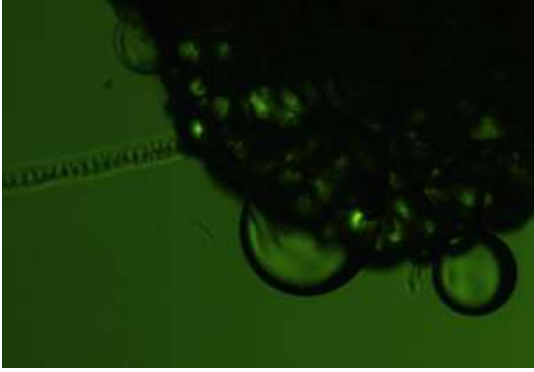


Imagen 87.- Tejido mamario normal 12

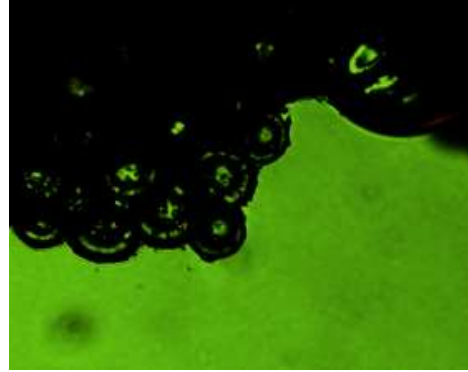


Imagen 88.- Tejido mamario normal 12



Imagen 89.- Tejido mamario normal 12

Tejido mamario normal 12: Imagen 87 y 88.- Sembrado inicial de tejido mamario normal (10x). Imagen 89.- Una semana después de observan grandes inclusiones grasa y cuerpos lipídicos de menor tamaño (20x).

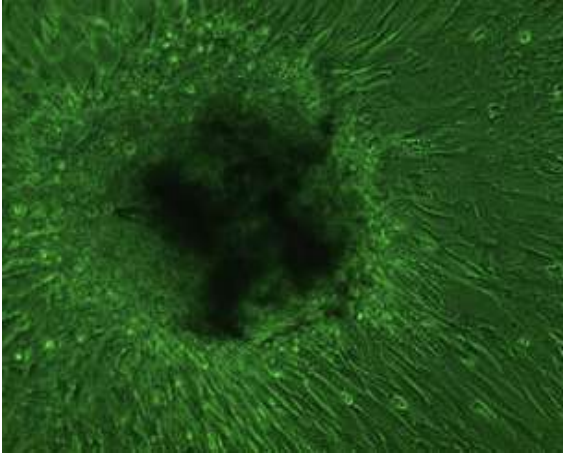


Imagen 90.- Cáncer de mama 13

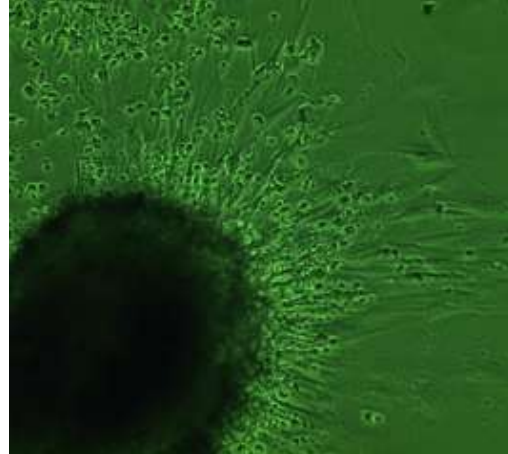


Imagen 91.- Cáncer de mama 13

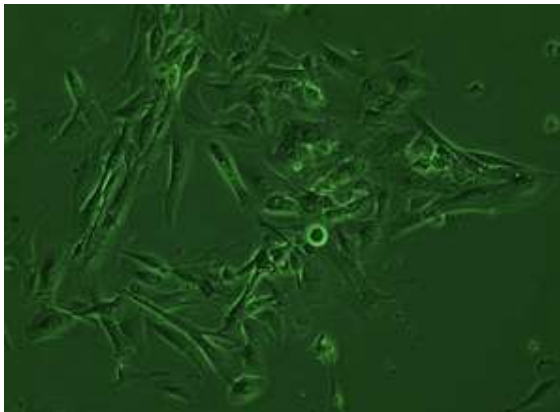


Imagen 92.- Cáncer de mama 13

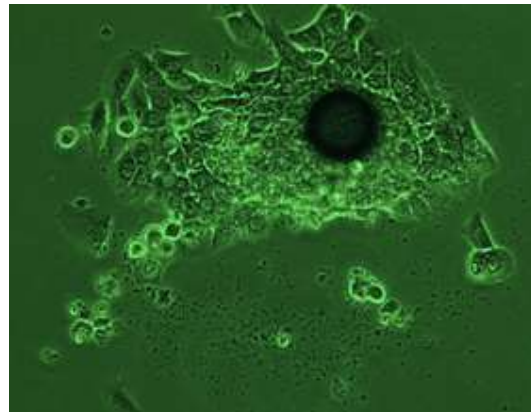


Imagen 93.- Cáncer de mama 13

Cáncer de mama 13: Imagen 90.- Dado a que este ensayo se realizó con colagenasa, no quedaban fragmentos visibles al momento del sembrado. 10 días después de aprecia un conglomerado celular rodeado por un pequeño aro de células tumorales en la periferia del mismo y fibroblastos en todo el exterior (10x). Imagen 91.- Periferia de células tumorales rodeado conglomerado celular con escasos fibroblastos en el exterior (10x). Imagen 92.- Cultivo mixto de fibroblastos y células tumorales (20x). Imagen 93.- Células tumorales con inclusión grasa y detritus celulares (20x).

CÁNCER DE MAMA 14:

Este cultivo sufrió contaminación desde el inicio por lo que fue necesario descartarla

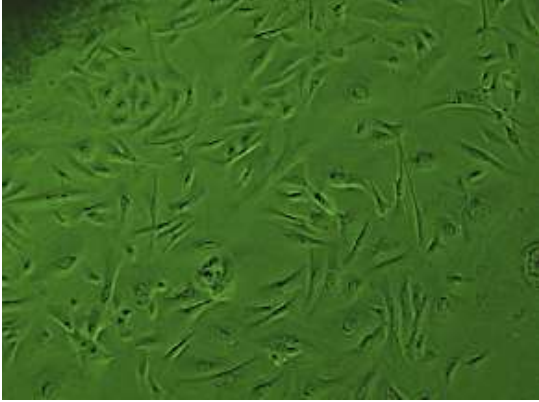


Imagen 94.- Cáncer de mama 15

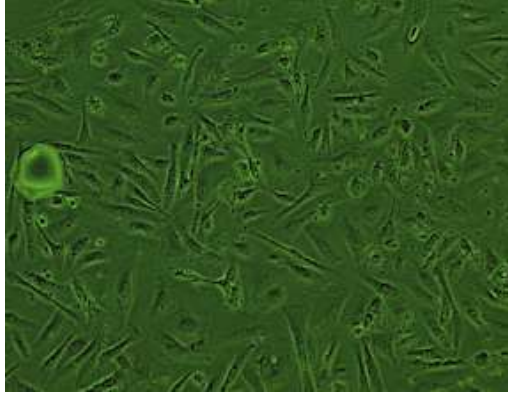


Imagen 95.- Cáncer de mama 15

Cáncer de mama 15: Imagen 94.- Cultivo mixto de fibroblastos y células tumorales dos semanas después de sembrado inicial (10x). Imagen 95.- Área de células tumorales sin contaminación de fibroblastos, con inclusiones grasa (10x).

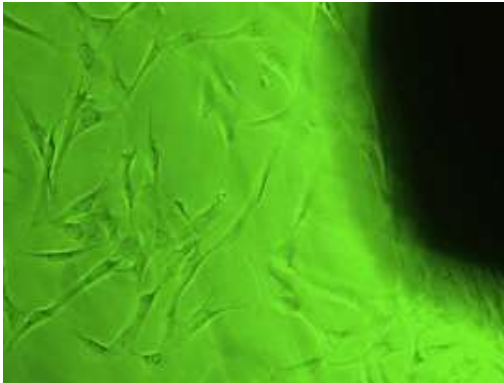


Imagen 96.- Cáncer de mama 16

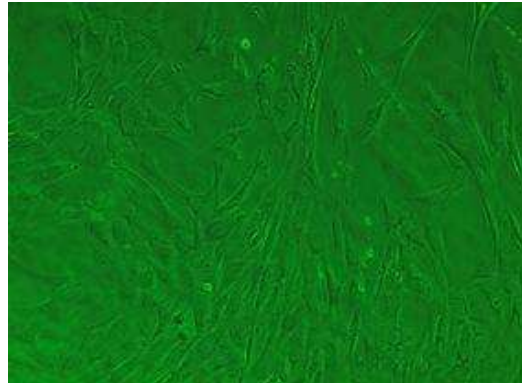


Imagen 97.- Cáncer de mama 16

Cáncer de mama 16: Imagen 96.- Proliferación de fibroblastos 2 semanas después de sembrado inicial (10x). Imagen 97.- Red extensa de fibroblastos sin inclusiones celulares (10x)

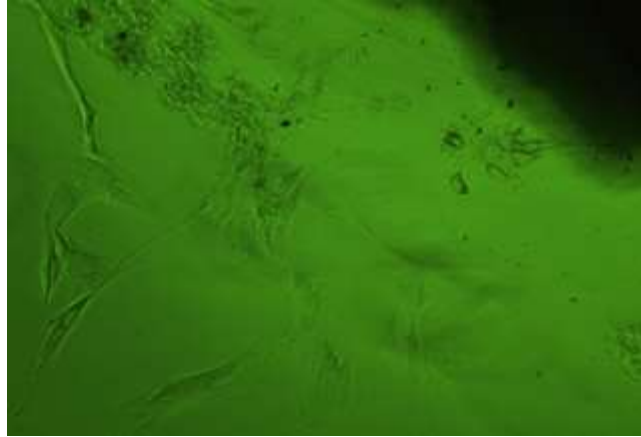


Imagen 98.- Cáncer de mama 17

Cáncer de mama 17: Imagen 98.- Proliferación inicial de fibroblastos 1 semana después de sembrado. Áreas de detritus celulares adyacentes a fragmento tumoral (10x).

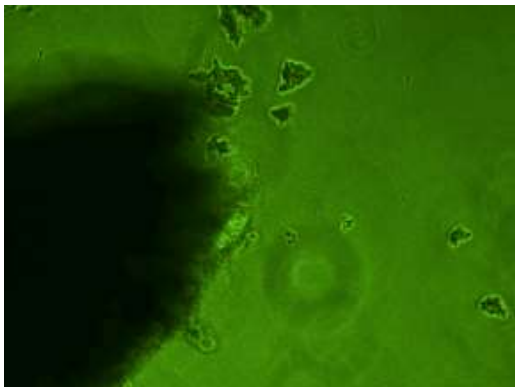


Imagen 99.- Cáncer de mama 18

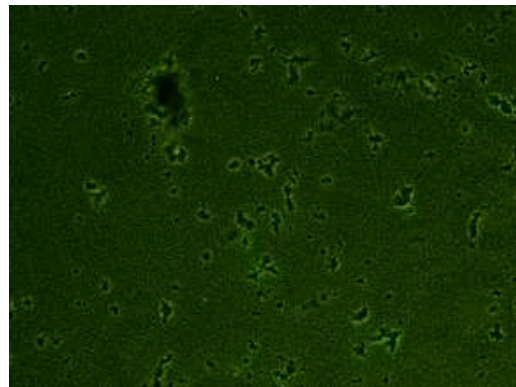


Imagen 100.- Cáncer de mama 18

Cáncer de mama 18: Imagen 99 -100: Detritus celular en explante tumoral en el que no se obtuvo crecimiento *in vitro* (10x).

Al haber estandarizado la metodología de toma de explante, estableciendo a su vez un sub - protocolo para la obtención de tejido y desarrollo de cultivos celulares, existe un parteaguas en el protocolo. Se logra en este tiempo acudir a las cirugías programadas y obtener el tejido con mayor facilidad, logrando sembrar el explante y obtener tejido que al inicio tardaba de 3 - 4 meses poder observar el desarrollo de un cultivo únicamente de células tumorales, reducido a plazos de 2 a 3 semanas. La curva de aprendizaje fue notable, logrando no solamente obtener más explantes, sino que llegando al tamaño de

muestra establecida por la probabilidad de éxito del cultivo. Por ende, a continuación se mostrará la manera distinta de organización de los explantes y los cultivos celulares, incluyendo a la par el tejido obtenido, su siembra y las células que proliferaron posteriormente. Al tener más de un cultivo o explante por paciente, en ocasiones, previo al cambio de metodología, los números correspondientes al paciente se encontraban desfasados. Al haber concluido 10 pacientes en la fase previa, a continuación se verá el progreso de la 11va paciente con cáncer de mama incluida en el estudio y subsecuentemente, llegando a presentar explantes de 32 pacientes en total.

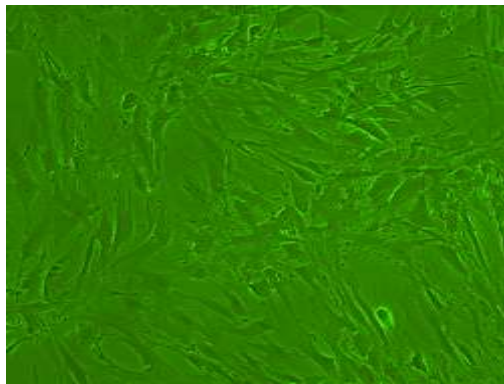


Imagen 101.- Cáncer de mama 11

Cáncer de mama 11: Imagen 101: Crecimiento de fibroblastos de explante mamario. (10x)

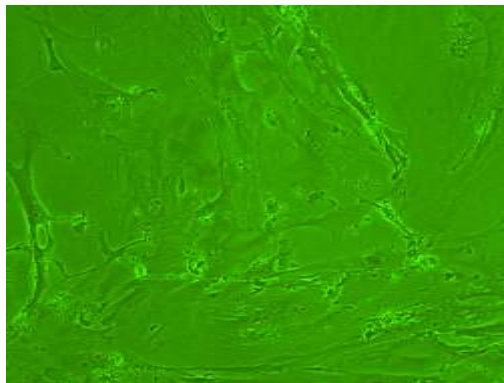


Imagen 102.- Cáncer de mama 12

Cáncer de mama 12: Imagen 102: Crecimiento de fibroblastos y visualización de elementos de matriz extracelular de explante mamario. (10x) (10x)

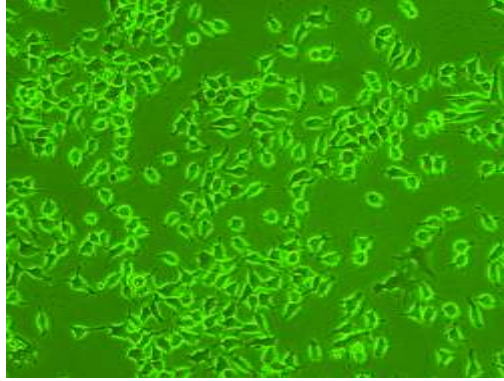


Imagen 103.- Cáncer de mama 13

Cáncer de mama 13: Imagen 103: Visualización de células epiteliales, escasos fibroblastos y células tumorales como productos celulares de un explante mamario.

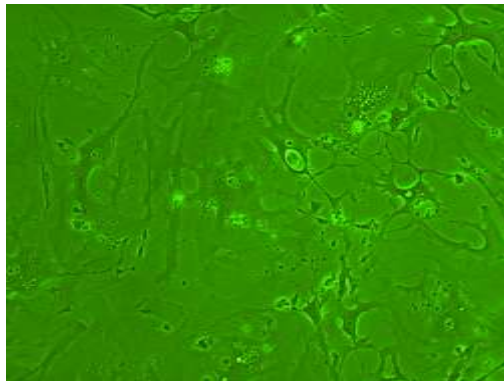


Imagen 104.- Cáncer de mama 14

Cáncer de mama 14: Imagen 104: Crecimiento de fibroblastos de explante mamario. (10x)

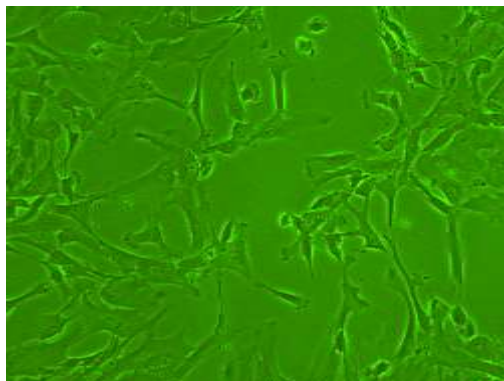


Imagen 105.- Cáncer de mama 15

Cáncer de mama 15: Imagen 105: Crecimiento de fibroblastos de explante mamario. (10x)

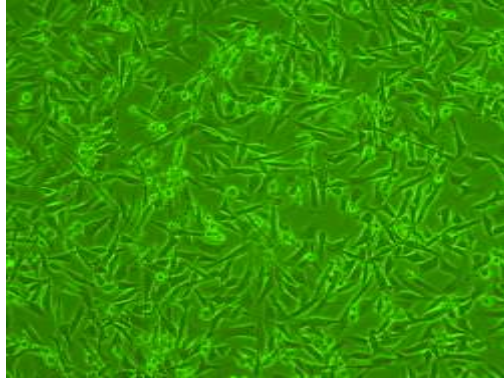


Imagen 106.- Cáncer de mama 16

Cáncer de mama 16: Imagen 106: Visualización de células tumorales y escasos fibroblastos de un cultivo celular establecido de un explante de una paciente con cáncer de mama. (10x)

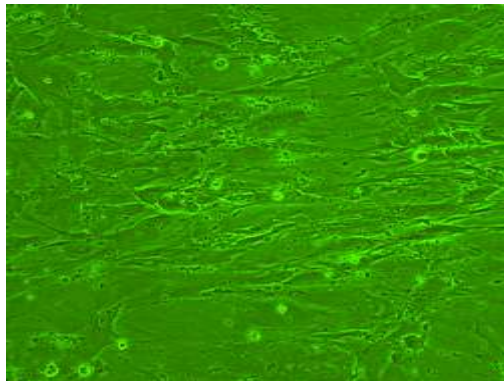


Imagen 107.- Cáncer de mama 17

Cáncer de mama 17: Imagen 107: Crecimiento de fibroblastos de explante mamario. (10x)

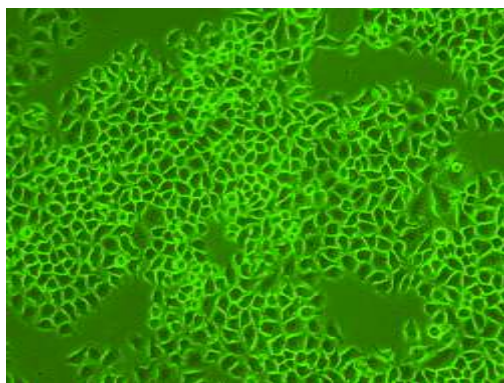


Imagen 108.- Cáncer de mama 18

Cáncer de mama 18: Imagen 108: Visualización de células tumorales de un cultivo celular establecido de un explante de una paciente con cáncer de mama. (10x)

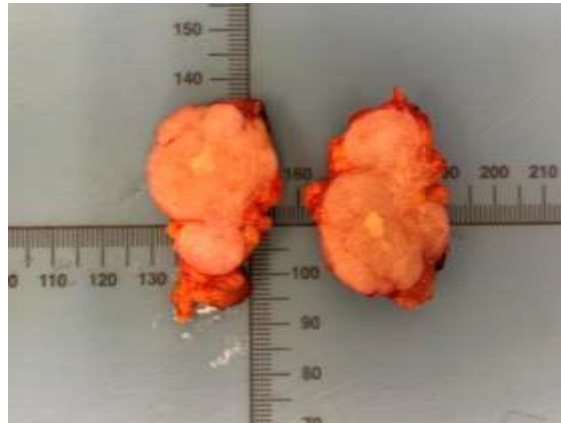


Imagen 109.- Cáncer de mama 19



Imagen 110.- Cáncer de mama 19



Imagen 111.- Cáncer de mama 19

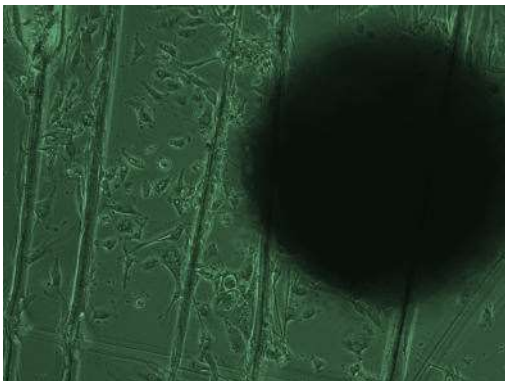


Imagen 112.- Cáncer de mama 19

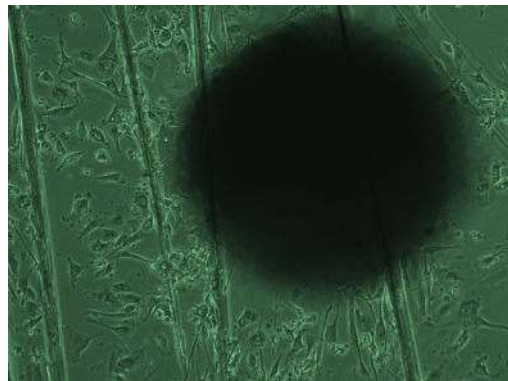


Imagen 113.- Cáncer de mama 19

Cáncer de mama 19: Imagen 109: Visualización macroscópica del tumor mamario con medición de 3.5 x 4 cms. Se observa en el centro un área blanca correspondiente a necrosis. Imágenes 110 y 111: Colocación de explante de 2 – 5 mm en tubo de ensayo con medio de cultivo preparado con RPMI y 10%

de suero fetal bovino (SFB). Imágenes 112 – 113: Crecimiento inicial de fibroblastos y células epiteliales del explante mamario. (10x)



Imagen 114.- Cáncer de mama 20

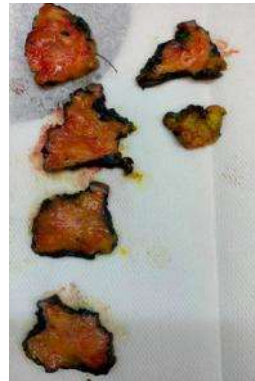


Imagen 115.- Cáncer de mama 20

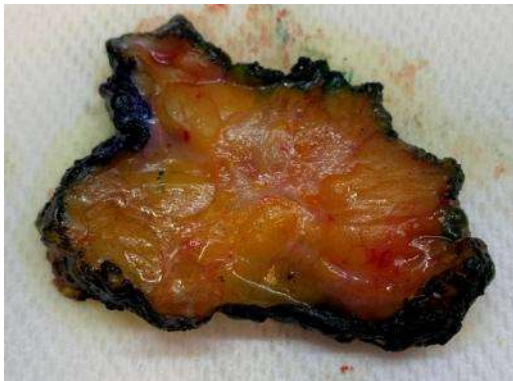


Imagen 116.- Cáncer de mama 20



Imagen 117.- Cáncer de mama 20



Imagen 118.- Cáncer de mama 20



Imagen 119.- Cáncer de mama 20

Cáncer de mama 20: Imagen114: Obtención de pieza mamaria dentro del quirófano con marcaje de bordes con hilos de seda y colocación del tumor para orientación patológica, correspondiendo a los lados lateral, medial, superior e inferior respectivamente. Imágenes 115 – 117: Tinción de bordes y valoración de estudio transoperatorio para valorar bordes quirúrgicos. Se visualiza en el centro un área con mayor dureza, más clara en donde subyace el tumor. Imagen 118: Selección de mm² de tejido para explante. Imagen 119: Colocación de explante en medio de cultivo preparado con RPMI y 10% de suero fetal bovino (SFB).

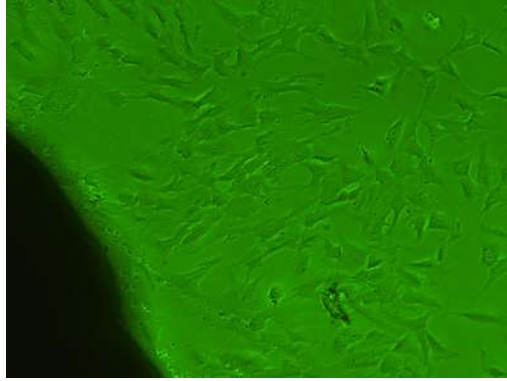


Imagen 120.- Cáncer de mama 21

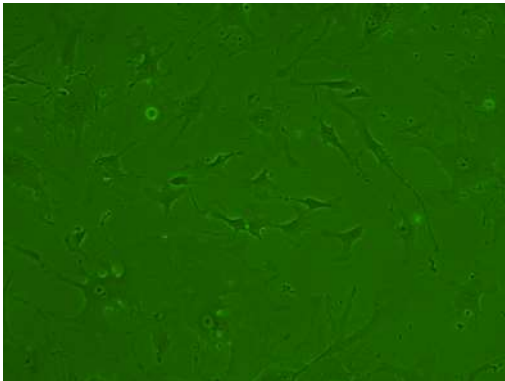


Imagen 121.- Cáncer de mama 21

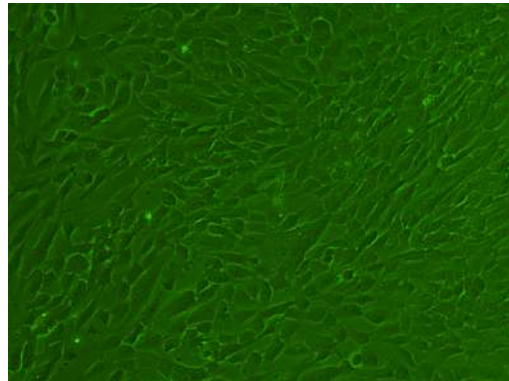


Imagen 122.- Cáncer de mama 21

Cáncer de mama 21: Imagen 120 – 122: Crecimiento de células variadas, incluyendo fibroblastos, células tumorales y células epiteliales de un explante mamario. (10x)



Imagen 123.- Cáncer de mama 22



Imagen 124.- Cáncer de mama 22



Imagen 125.- Cáncer de mama 22

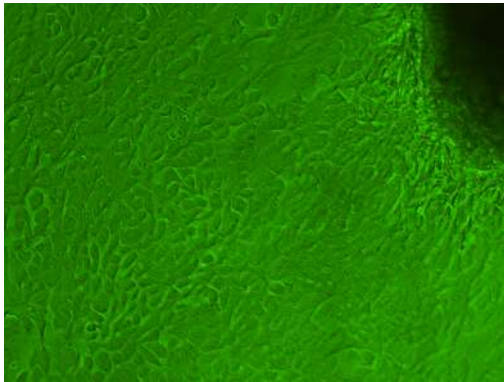


Imagen 126.- Cáncer de mama 22

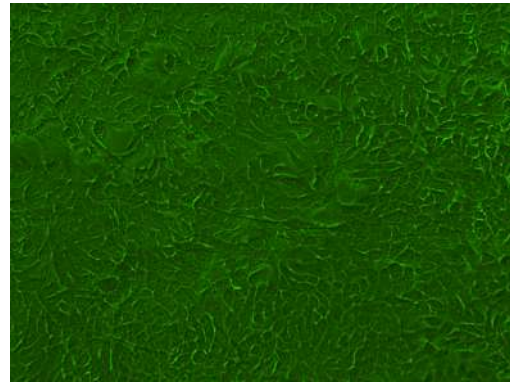


Imagen 127.- Cáncer de mama 22

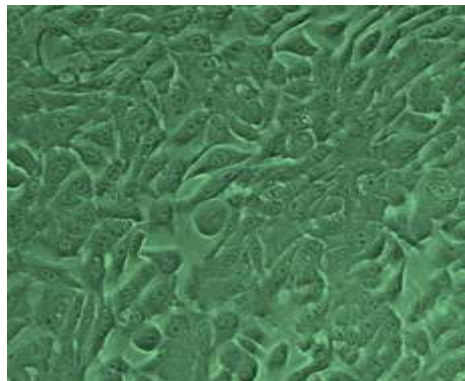


Imagen 128.- Cáncer de mama 22

Cáncer de mama 22: Imagen 123 – 124: Marcaje de bordes es estudio transoperatorio. Imagen 125: : Colocación de explante en medio de cultivo preparado con RPMI y 10% de suero fetal bovino (SFB). Imágenes 126 – 128: Crecimiento de células endoteliales, fibroblastos y sobre todo células tumorales del explante mamario. (10x)



Imagen 129.- Cáncer de mama 23



Imagen 130.- Cáncer de mama 23

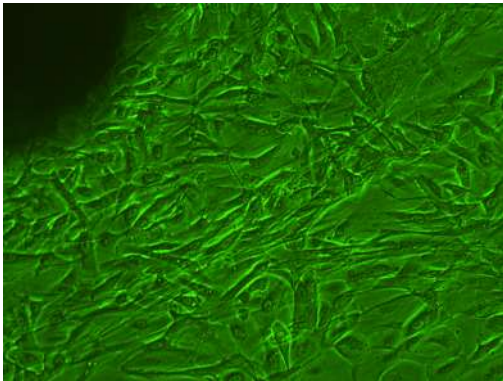


Imagen 131.- Cáncer de mama 23

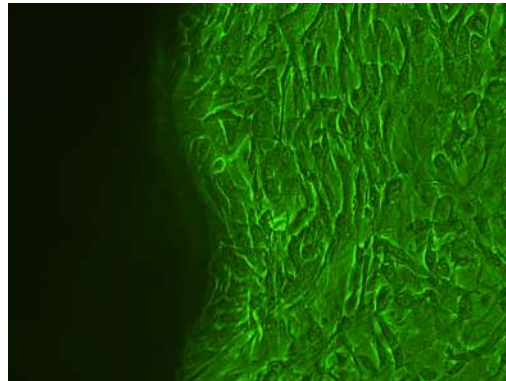


Imagen 132.- Cáncer de mama 23

Cáncer de mama 23: *Imágenes 129 – 130: Obtención de tejido mamario con destrucción tisular, restos hematológicos antiguos. Imágenes 131 -132: crecimiento inicial de fibroblastos en el sembró inicial del explante mamario. (10x)*

CÁNCER DE MAMA 24:

Este cultivo no mostro desarrollo celular de ninguna índole.

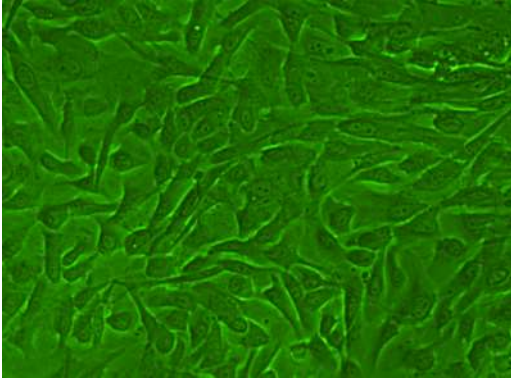


Imagen 133.- Cáncer de mama 25

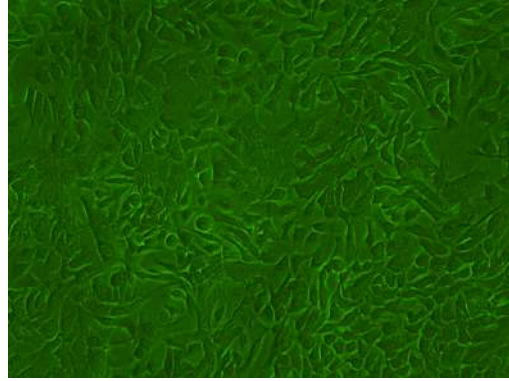


Imagen 134.- Cáncer de mama 25

Cáncer de mama 25: Imágenes 133 y 134:: Crecimiento de células epiteliales, escasos fibroblastos y células tumorales en caja de cultivo Petri. (10x)

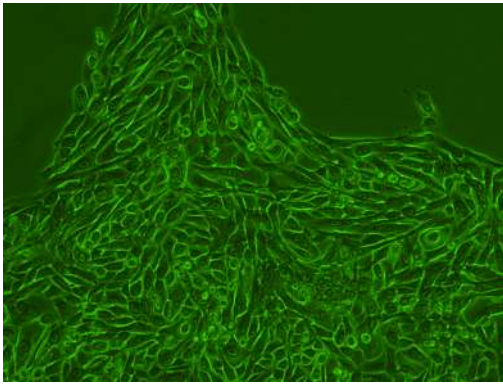


Imagen 135.- Cáncer de mama 26

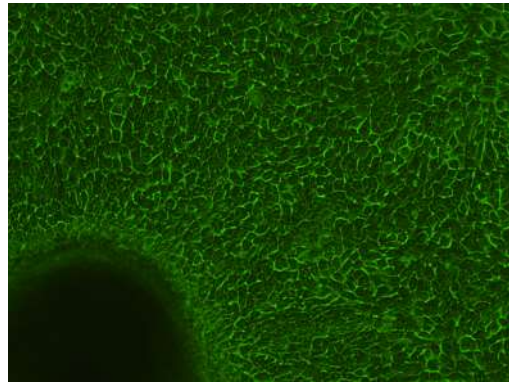


Imagen 136.- Cáncer de mama 26

Cáncer de mama 26: Imagen 135 – 136: Crecimiento y dispersión de células edtoteliales y células neoplásicas del esplante mamario. (10x)



Imagen 137.- Cáncer de mama 27

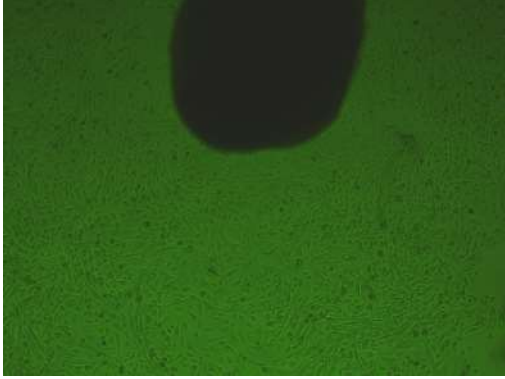


Imagen 138.- Cáncer de mama 27

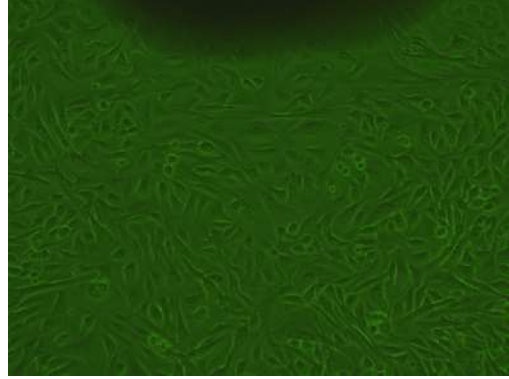


Imagen 139.- Cáncer de mama 27

Cáncer de mama 27: *Imagen 137: Visualización macroscópica del tumor mamario con medición de 2.2 cms x 1.5 cms, inicialmente sospechado como fibroadenoma. Imagen 138 – 139: Células tumorales y epiteliales emergiendo y esparciéndose del explante mamario. (10x)*

CÁNCER DE MAMA 28 - 32:

Cultivos en proceso de crecimiento.

11.2. INOCULACIÓN DE RATONES ATÍMICOS

Solamente mostraron crecimiento tumoral los ratones que fueron inoculados con una cantidad mayor a 10 millones de células, por lo que se realizó un ensayo adicional con tres ratones y 10 millones de células cada uno. El tiempo aproximado de desarrollo de tumor en estos fue de 5 días, no obstante, tras sacrificarlos y valorar al tumor, este no excedía los 10mm. Por esta razón, se inocularon a dos ratones con cáncer de mama 7 con mayor cantidad de células (ratón 1 con 15 millones inoculados por debajo de la escápula derecha y 10 millones por debajo de la izquierda, ratón 2 con 20 millones inoculados debajo de la escápula derecha y 15 millones debajo de la escápula izquierda). 7 días después de la inoculación de los ratones con cáncer de mama 7, se logró observar tumores en cada ratón (ratón 1: 10 mm x 2 mm en escápula izquierda, ratón 2: 4 mm x 5 mm en escápula derecha, 3 mm x 2 mm en escápula izquierda). Desafortunadamente, 5 días después de esta medición se observó involución tumoral, por lo cual los animales fueron sacrificados, encontrando al ratón 1 con un tumor de 2 mm x 1 mm y al ratón 2 con un tumor de 3mm x 1 mm. De acuerdo a diseño de nuestro estudio y a los antecedentes históricos que poseemos, se conoce que el ambiente metabólico en el cual se desarrolla un tumor tiene grandes impactos en su caracterización, comportamiento y diferenciación. Al ser inoculados a un ratón quien posee un ambiente metabólico distinto, es complicado su crecimiento. A la par de la inoculación de los ratones con cultivos primarios de mi protocolo, fueron también inoculados con líneas celulares ya establecidas, como D5, MCF 7 y MDA MB 231. En todos estos casos se observó crecimiento mayor a 1 cm de tumor.

Para realizar el sacrificio de ratones fue importante acudir con la M en C María de la Luz Streber Jiménez, patóloga veterinaria para poder realizarlo de acuerdo a las estipulaciones y reglamento del bioterio del INCMNSZ. El procedimiento es el mismo para todos los ratones, independiente del tamaño de tumor que puedan tener. Es importante tomar al ratón por medio de una pinza para que no pueda moverse y lastimarse la cola. Posterior al tomarlo, se coloca dentro de un fresco con éter, usualmente con una gasa remojada. El

ratón inicialmente se vuelve agitado y pocos segundos después deja de moverse, quedando sobre la gasa remojada. Es habitual que permanezca con ciertos reflejos como estiramiento de miembros inferiores. Como consiguiente se desnuda el ratón y éste deja de moverse completamente. Antes de iniciar los cortes y la disección es importante tomar una foto para documentar el sitio del tumor en cuestión e identificar al ratón. Se realiza un corte con tijeras en la piel superior a la escápula en donde se encuentra el tumor. En ocasiones el tumor muestra poco crecimiento y está adherido a la piel, por lo que es importante no cortar cerca del área en donde se observa el crecimiento del tumor. Se disecciona esta área y se debe de siempre buscar un ganglio axilar típico en el lado en donde se inoculó al ratón, el cual puede mostrar únicamente inflamación o en ocasiones invasión tumoral. Al reparar el/los tumores y el ganglio, se colocaron en un cartón marcado con lápiz referente al sitio de donde provienen, dentro de un tubo cónico lleno de formol.



Imagen 140.- Ensayos de tumorigénesis

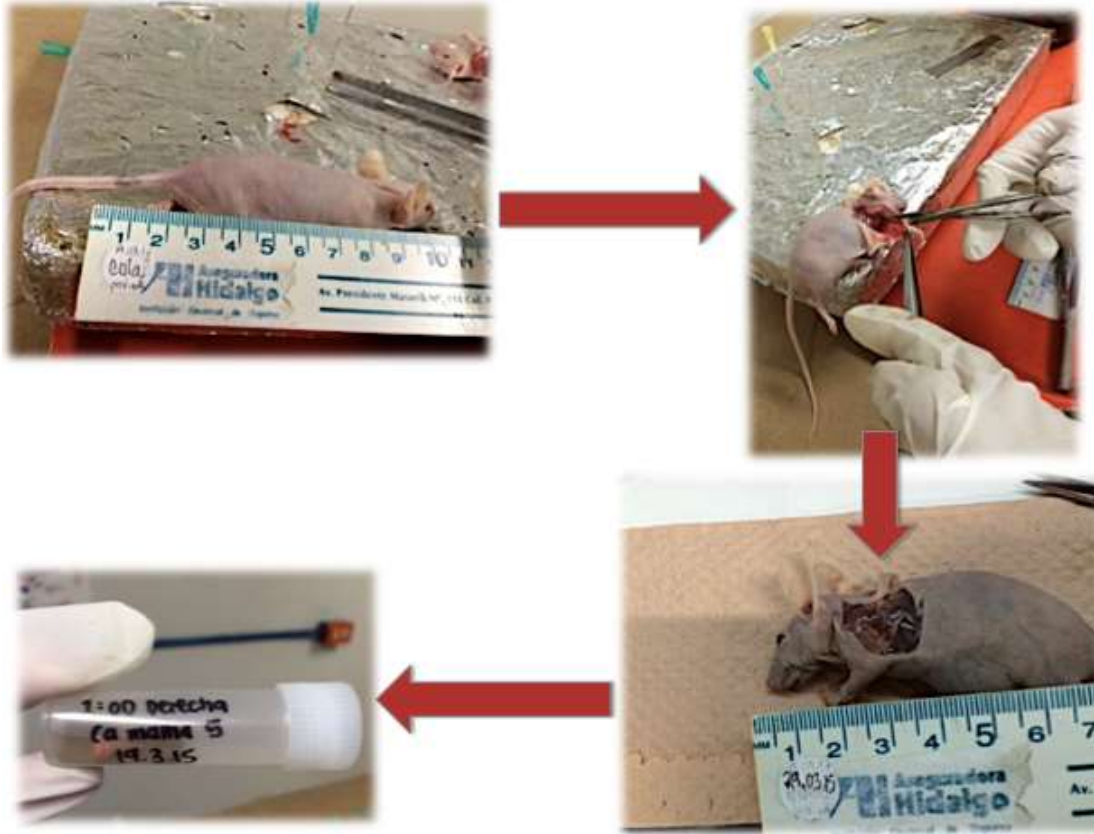


Imagen 141.- Ensayos de tumorigénesis

Ensayos de tumorigénesis: Imagen 141.- Crecimiento inicial de tumor inyectado en área subescapular izquierda con medición de 0.3 x 0.4 cms. Imagen 97. Sacrificio y extirpación de tumores.

11.3. PATOLOGÍA

Posterior al sacrificio de los ratones atómicos, los tumores extirpados fueron transportados al servicio de patología del centro Médico ABC en donde fueron analizados por el Dr. Cesar Lara.

Inicialmente fueron fijados a un cubreobjetos y teñidos con hematoxilina y eosina, para posteriormente ser teñidos con diferentes compuestos y anticuerpos para demostrar presencia de marcadores tumorales. Como control de los cultivos primarios establecidos dentro del protocolo, se analizó un tumor proveniente de células D5, una línea celular

establecida en el INCMNSZ. Esta línea mostro tener gran crecimiento tumoral, incluso mayor a 3 cms. A la visualización microscópica se logró observar transformación sarcomatoide del tejido, confirmando su agresividad. Con respecto a los tumores generados por cáncer de mama 5 (DSG – BC1) y 7 (DSG – BC2), estos fueron verdaderamente pequeños, aproximadamente 1 -2 mm. El tumor generado por DSG – BC1 mostro tener receptores a estrógeno y progesterona positivos y a HER2 negativo, por lo que se confirmó un subtipo inmunológico de Luminal A. El tumor generado por cáncer de mama 7 mostro tener un comportamiento más agresivo, observándose invasión perineural. Este mostro tener receptores negativos para estrógeno, progesterona y HER2, confirmándose un triple negativo. Dichos resultados se correlacionan con la información obtenida por biopsia de la neoplasia original de la paciente.

Dentro de la evaluación del tejido murino, el Dr. Lara encontró evidencia de folículos primordiales que darían lugar a pelo. Esto es complicado de comprender ya que trabajamos con ratones atímicos nu/nu, los cuales son por definición desnudos. Al comentarlo con patólogos veterinarios del INCMNSZ, se creía inicialmente que la sepa de ratones podría estar contaminada con otra productora de pelo y sería de utilidad valorar la presencia o no de timo en subsecuentes sacrificios. De acuerdo al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, se ha observado que existe tejido linfoide asociado a la generación de vello en animales, no como una mutación ni como respuesta inflamatoria sino que meramente una del sistema inmune, por lo cual los ratones no estaban contaminados sino que muestran diversas expresiones del sistema inmune murino.



Imagen 142.- Análisis de patología



Imagen 143.- Análisis de patología

Análisis de patología: Imagen 98 y 99.- Identificación y marcaje de cortes histológicos de los tumores inoculados en ratones atímicos (DSG – BC1, DSG-BC2)

DSG – BC1:

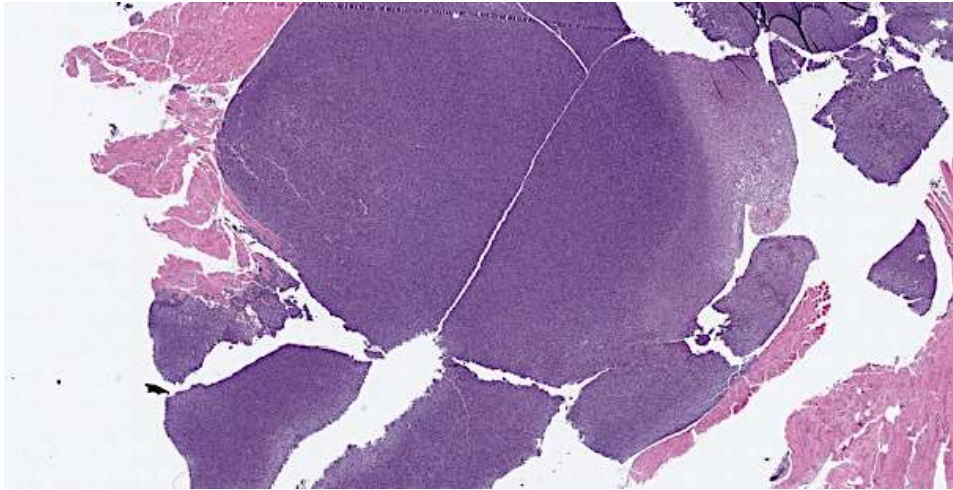


Imagen 144.- Análisis de patología DSG-BC1

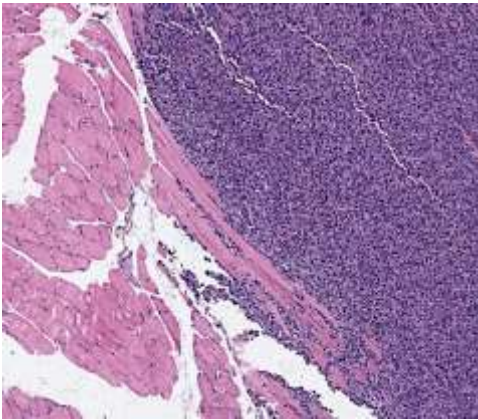


Imagen 145.- Análisis de patología DSG-BC1

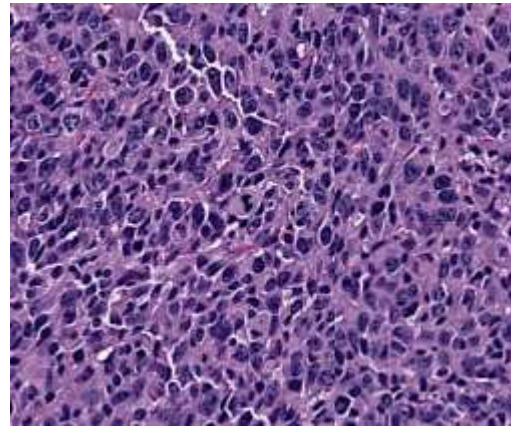


Imagen 146.- Análisis de patología DSG-BC1

Análisis de patología: DSG-BC1:Figura 100.- Tumor extirpado de ratón atímiconu/nu en hematoxilina y eosina (1x). Figura 101.- Invasión muscular del tumor. Se visualizan las fibras musculares por su color rosa (4x). Figura 102.- Matriz de células tumorales con grandes nucleos centrales. Se logran ver vasos sanguíneos escasos en el interior del tumor en puntos rosas (40x).

DSG – BC2:

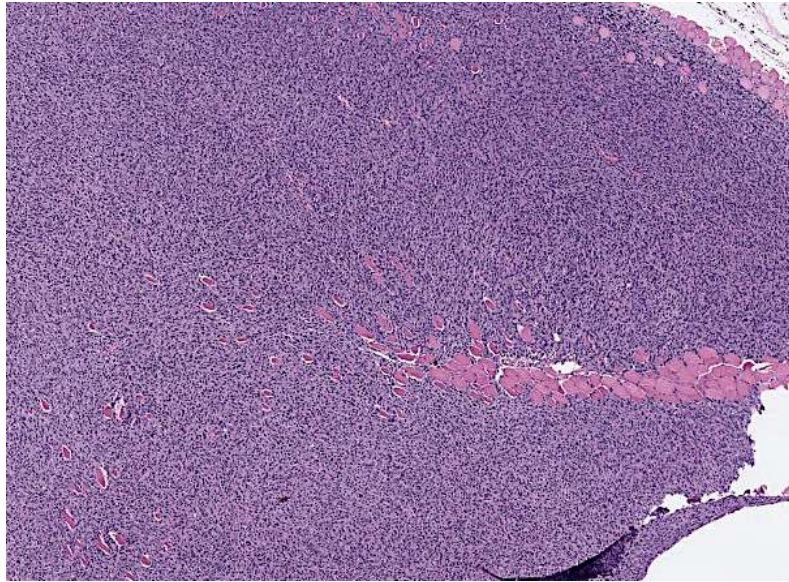


Imagen 147.- Análisis de patología: DSG-BC2

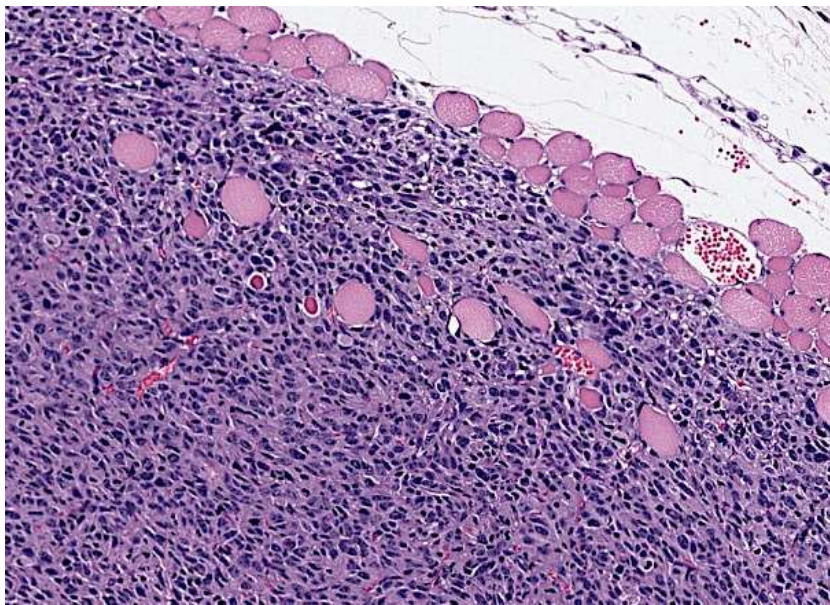


Imagen 148.- Análisis de patología: DSG-BC2

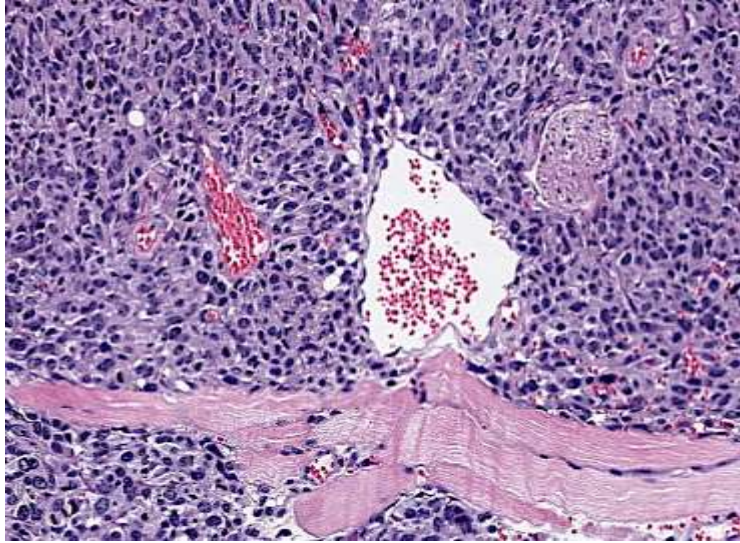


Imagen 149.- Análisis de patología: DSG-BC2

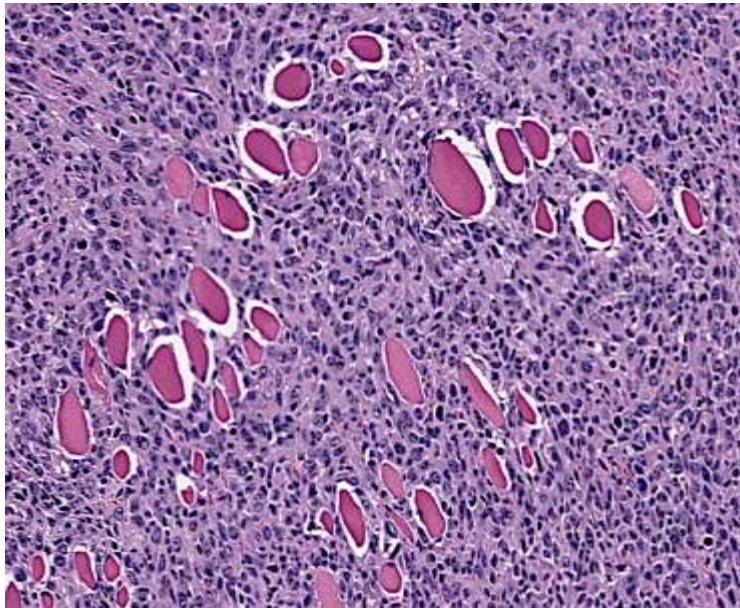
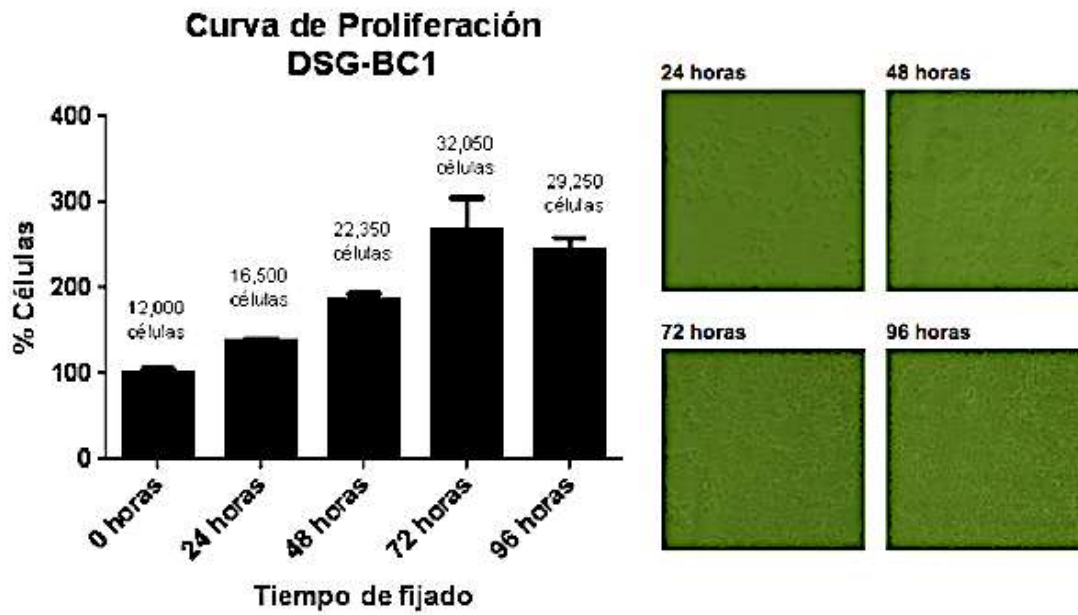


Imagen 150.- Análisis de patología: DSG-BC2

Análisis de patología: DSG-BC2: Imagen 103.- Tumor extirpado de ratón atímiconu/nu en hematoxilina y eosina (1x). Imagen 104.- Invasión muscular del tumor. Se visualizan las fibras musculares por su color rosa (20x). Imagen 105.- Invasión perineural del tumor (40x). Imagen 106.- Invasión muscular. (40x)

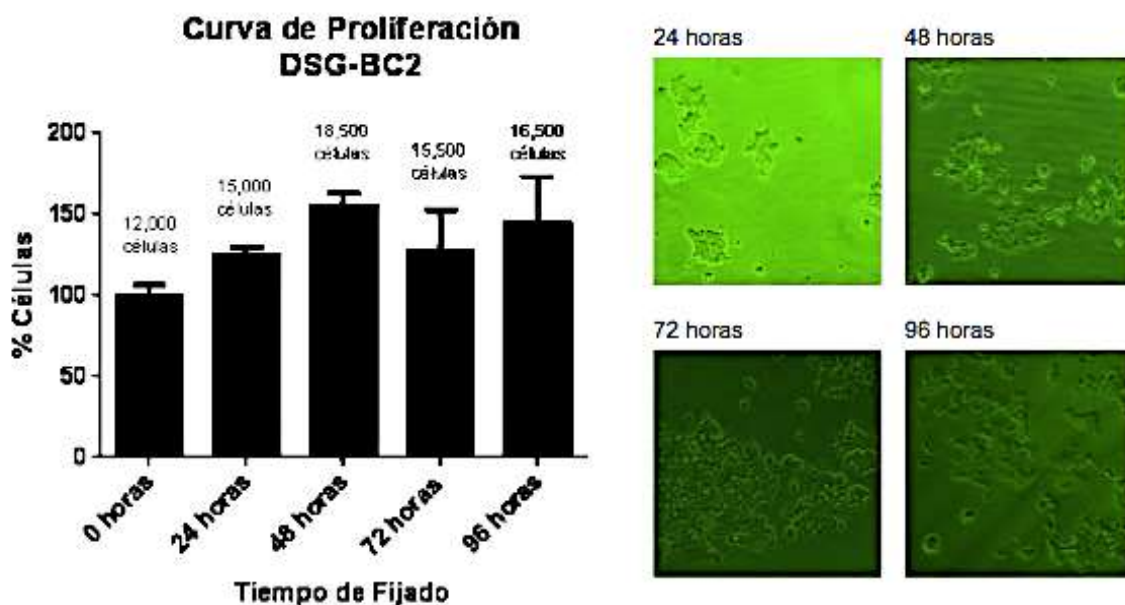
11.4. ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN

Con respecto a al cultivo DSG – BC1, se observó que aproximadamente a las 60 horas existía una duplicación en la cantidad de células presentes en el pozo de experimentación. Entre las 72 y 96 horas se observó un descenso en la proliferación, probablemente debido a que fueron confluentes las células y a falta de espacio y nutrientes comenzaron a morir.



Gráfica 1.- Curva de proliferación de DSG – BC1 e imágenes mostrando crecimiento y expansión celular diaria

Con respecto a al cultivo DSG – BC2, se observó que las células alcanzan un punto de máxima confluencia a las 48 horas, posterior a las cuales comienzan a morir. Esto puede deberse a diferentes factores como cantidad de células sembradas, lenta proliferación celular del cultivo y medio nutricio inadecuado para propiciar proliferación.

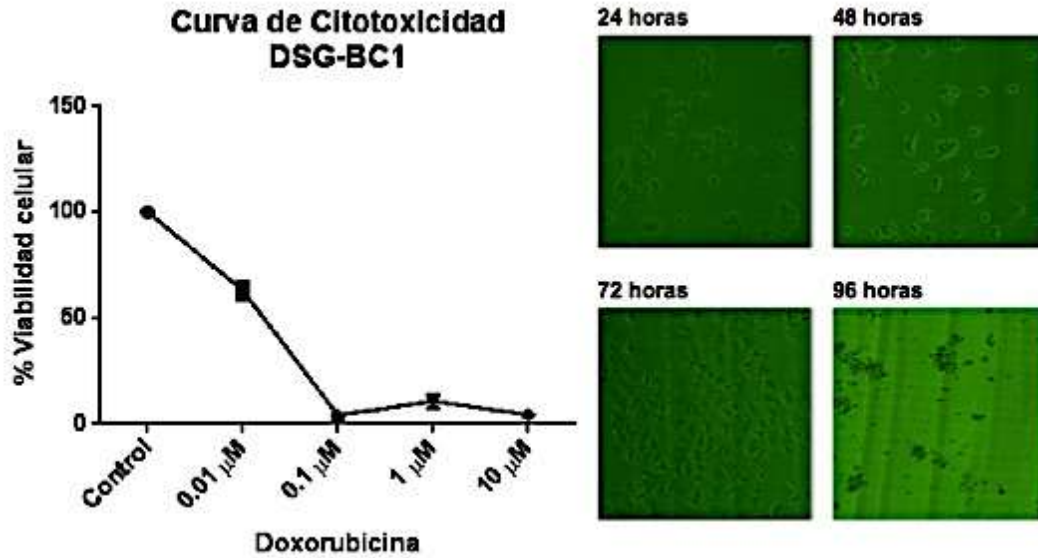


Gráfica 2.- Curva de proliferación de DSG – BC2 e imágenes mostrando crecimiento y expansión celular diaria.

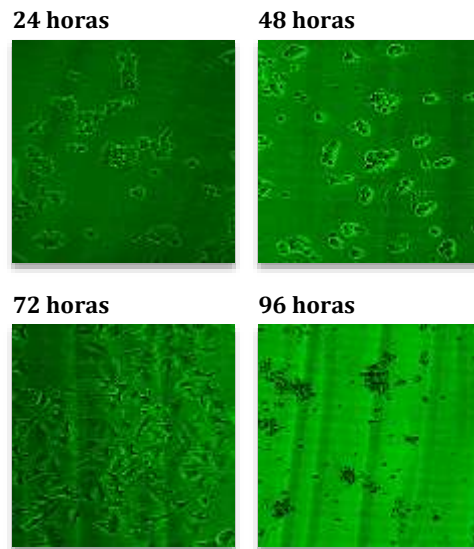
11.5. ÍNDICE DE CITOTOXICIDAD

Las curvas de quimioterapia se realizaron con dos quimioterapéuticos distintos, doxorubicina y paclitaxel. Se decidió estos quimioterapéuticos en el protocolo debido a la accesibilidad, los costos y la información que existe en relación al uso de estos agentes en ensayos de citotoxicidad. Con respecto a la doxorubicina, se observó que con la concentración de 0.1 μM fue suficiente para matar a prácticamente todas las células, dando un IC_{50} de 1.024 μM . Se repitió el ensayo con concentraciones entre 1 y 0.1 μM para conocer con mayor especificidad la concentración inhibitoria 50. Con respecto al paclitaxel, se observó que con la concentración de 0.1 μM fue suficiente para matar a prácticamente todas las células, dando un IC_{50} de 1.294 μM .

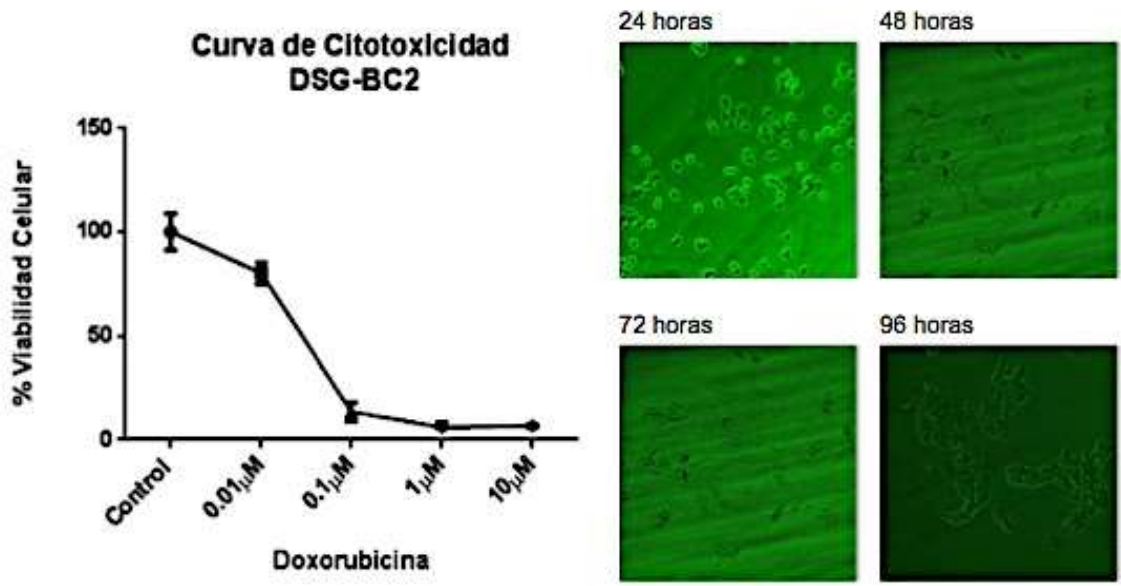
Con respecto a cada línea celular, los ensayos denotaron siguientes concentraciones inhibitorias del fármaco: IC50 DSG – BC1: Doxorubicina (0.03 $\mu\text{g/ml}$) y Paclitaxel (0.2 $\mu\text{g/ml}$) y IC50 DSG – BC2: Doxorubicina (0.04 $\mu\text{g/ml}$) y Paclitaxel (0.07 $\mu\text{g/ml}$).



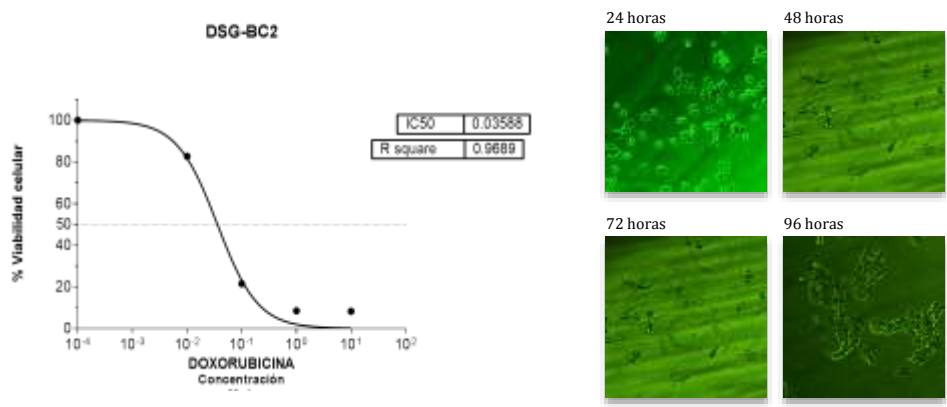
Gráfica 3.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 con doxorubicina e imágenes muerte celular diaria



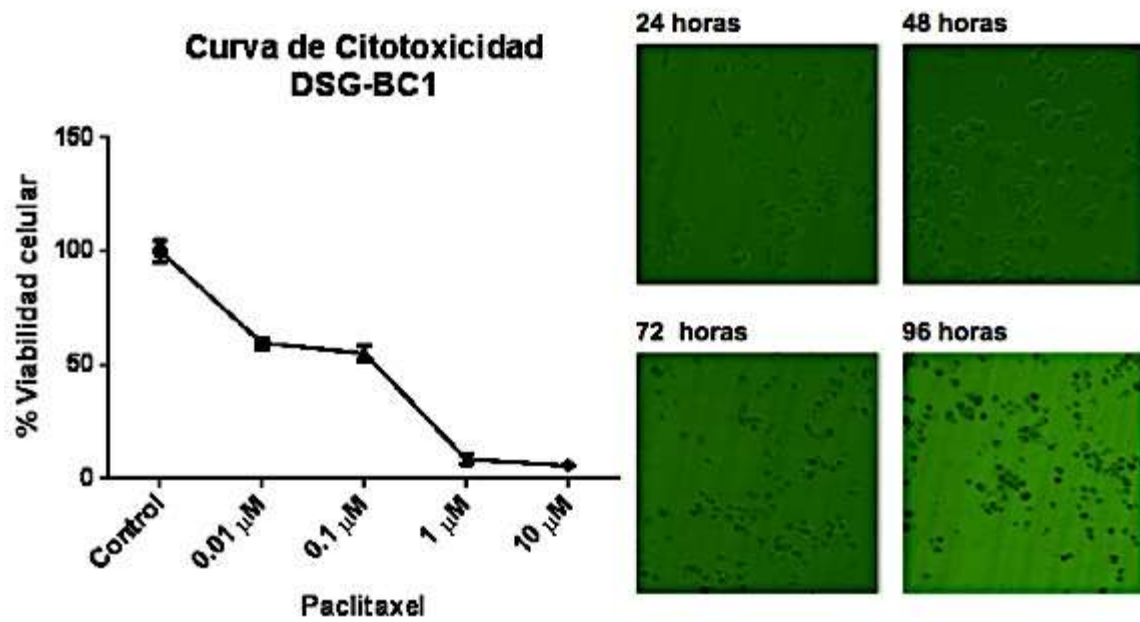
Gráfica 4.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 condoxorubicina e imágenes muerte celular diaria



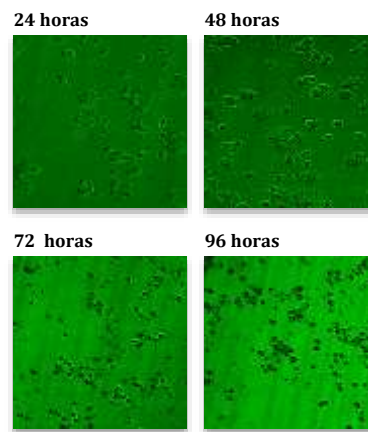
Gráfica 5.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC2 con doxorubicina e imágenes de muerte celular diaria.



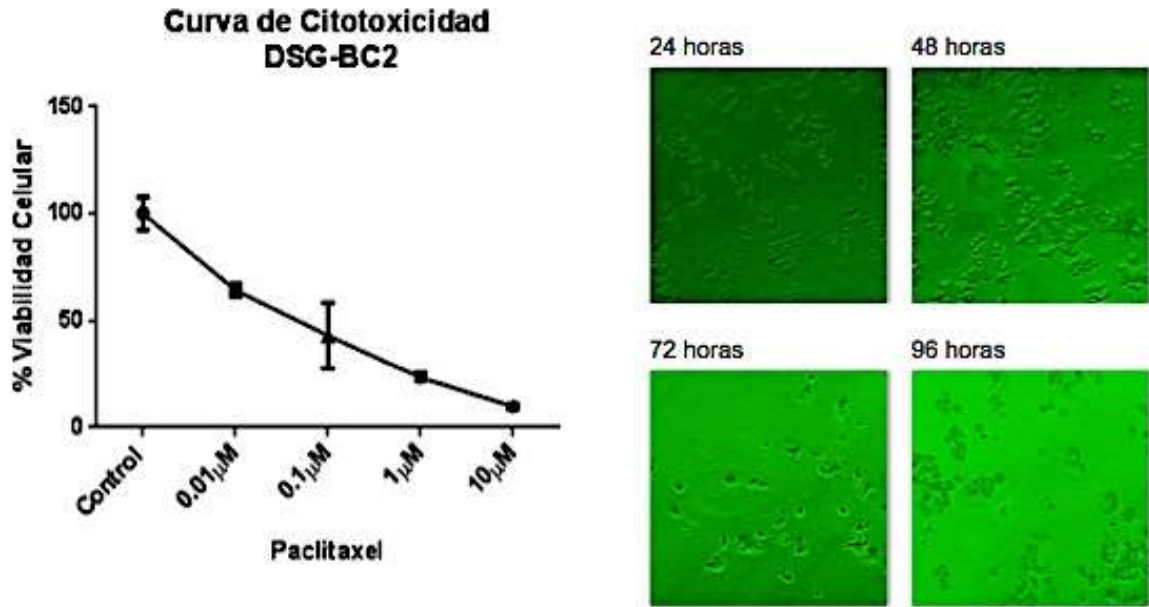
Gráfica 6.- Curva de citotoxicidad de DSG– BC2 con doxorubicina e imágenes de muerte celular diaria



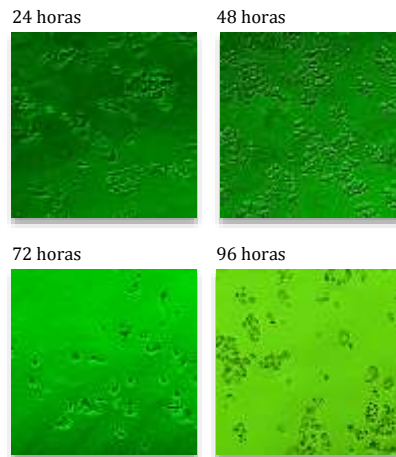
Gráfica 7.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 con paclitaxele imágenes muerte celular diaria.



Gráfica 8.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC1 con paclitaxel e imágenes muerte celular diaria



Gráfica 9.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC2 con paclitaxel e imágenes muerte celular diaria.



Gráfica 10.- Curva de citotoxicidad de DSG – BC2 con paclitaxel e imágenes muerte celular diaria

11.6. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA / MOTILIDAD

Posterior a la realización de la ‘herida,’ se documentó la separación de las células al área vacía de la línea. Desde las 24 horas de su realización se logró observar largos filipodios significando intento de motilidad por parte de la célula. La tasa de cierre de herida se estimó con un cierre total en 72 horas con una velocidad de 46% cada 24 horas para DSG – BC1 un cierre total en 96 horas con una velocidad de 21% cada 24 horas para DSG – BC2. Al lograr ver que las células eran capaces de moverse en los cultivos, se puede comprender de manera indirecta su capacidad de motilidad in vivo, o potencial metastásico.

DSG - BC1

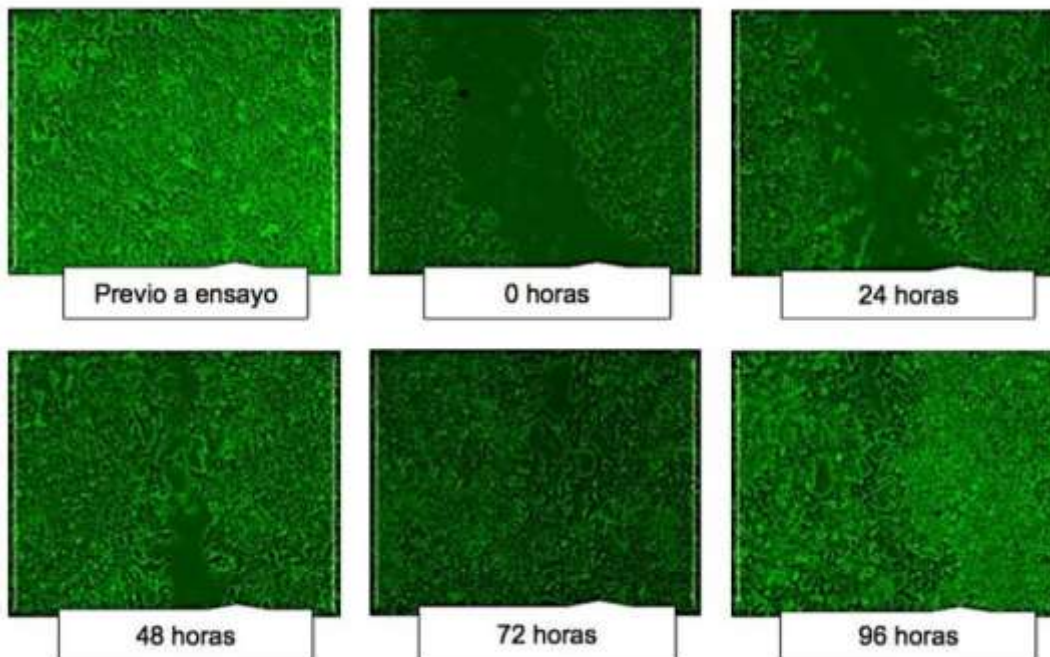


Imagen 151.- Ensayo de motilidad DSG - BC1

DSG – BC2

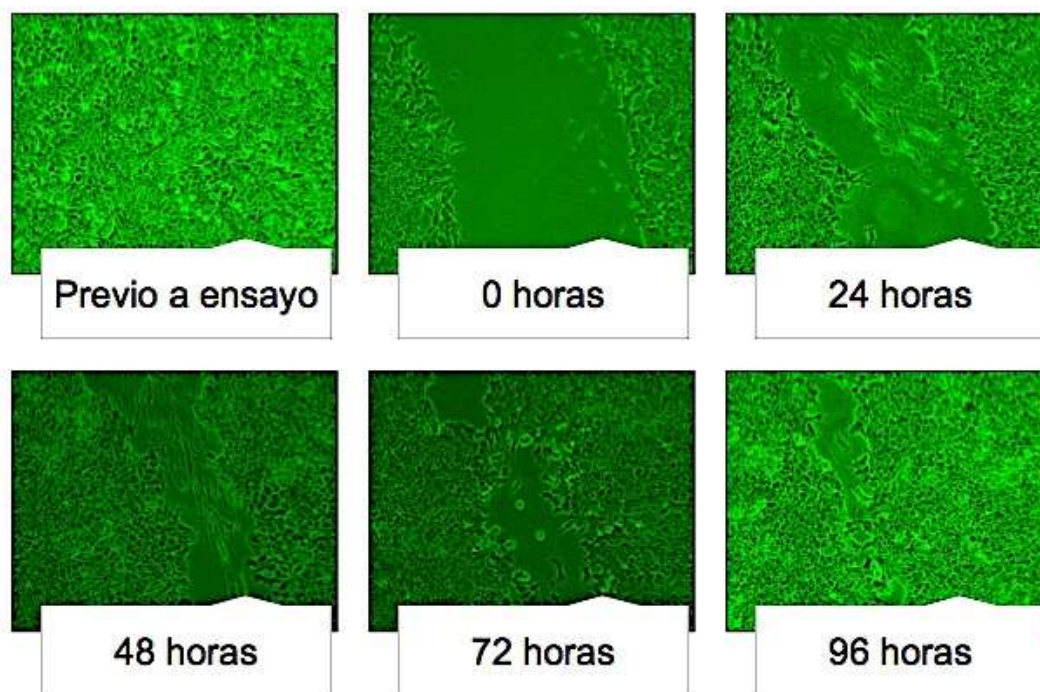


Imagen 152.- Ensayo de motilidad DSG – BC2

11.7. MEDIO CONDICIONADO

11.7.1. CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR BRADFORD

Lectura por espectrofotómetro a λ 595:

DSG – BC1: 2.585 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$

$$\frac{1}{4} = 0.536\mu\text{m}/\mu\text{l}, \frac{1}{8} = 0.292\mu\text{m}/\mu\text{l}$$

DSG – BC2: 539 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$

$$\frac{1}{4} = 0.298\mu\text{m}/\mu\text{l}, \frac{1}{8} = 0.162 \mu\text{m}/\mu\text{l}$$

curva de albumina

Archivo: HUVEC5min-3hMCZR27mar15

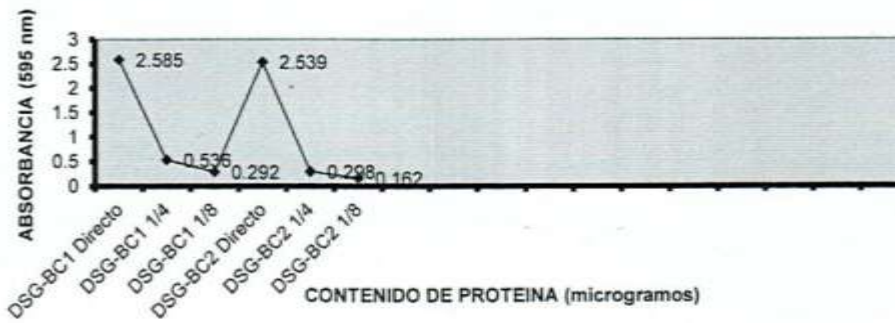
2	0.131
4	0.242
8	0.496
16	0.868

r	0.997266	0.99454	
b		0.0225	y=mx+b
m		0.05415	x=(y-b)/m

ExtractoTotal5ul	proteína						
	Abs	ecuación	ug/ul dilución	ul 30ugAjus	10ug ajus	20ug ajus	500ul
DSG-BC1 Directo	2.585	47.32225	0.059153	633.9512	211.3170732	422.6341	29.57641
DSG-BC1 1/4	0.536	9.482918	0.047415	790.8958	263.6319377	527.2639	23.70729
DSG-BC1 1/8	0.292	4.976916	0.049769	753.4787	251.1595547	502.3191	24.88458
DSG-BC2 Directo	2.539	46.47276	0.058091	645.5394	215.1798132	430.3596	29.04548
DSG-BC2 1/4	0.298	5.087719	0.025439	1474.138	491.3793103	982.7586	12.7193
DSG-BC2 1/8	0.162	2.576177	0.025762	1455.645	485.2150538	970.4301	12.88089

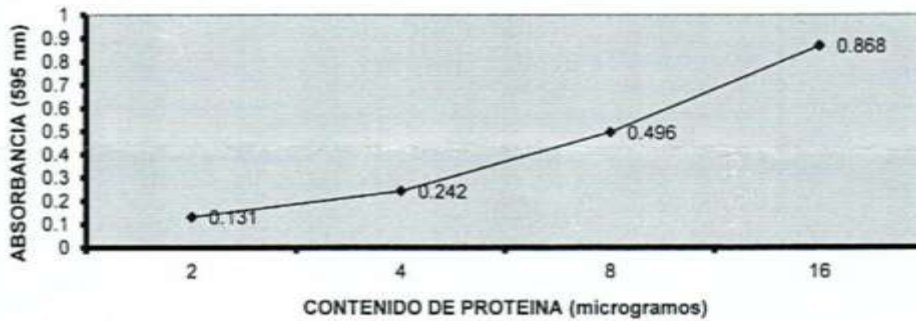
Tabla 2.- Cuantificación de proteína

CUANTIFICACION DE PROTEINA EN MEDIOS CONDICIONADOS



Gráfica 11.- Cuantificación de proteínas en medios condicionados

CUANTIFICACION DE PROTEINA POR BRADFORD



Gráfica 12.- Cuantificación de proteínas por Bradford

33	1.00	10.00	24.075	
34	1.00	8081.00	12.578	
35	1.00	8588.00	12.604	TMF ← L ⊕
36	1.00	8176.00	12.802	✓✓✓✓
37	1.00	5314.00	12.770	
38	1.00	4867.00	12.897	MC1
39	1.00	5992.00	12.915	
40	1.00	4284.00	12.732	
41	1.00	5186.00	12.890	MC2
42	1.00	4877.00	12.617	
43	1.00	7518.00	12.578	
44	1.00	6589.00	12.316	MC1'IP
45	1.00	6855.00	12.722	
46	1.00	5195.00	12.666	
47	1.00	5249.00	13.041	MC2'IP
48	1.00	4006.00	12.719	
49	1.00	3595.00	12.944	
50	1.00	4515.00	12.810	LPS ← L ⊕

S#	TIME	CPMA	SIS	FLAG
51	1.00	3797.00	13.056	
52	1.00	5651.00	12.781	
53	1.00	5263.00	12.778	LPS'IP
54	1.00	5394.00	12.988	
55	1.00	2076.00	12.759	
56	1.00	2496.00	12.612	P
57	1.00	1722.00	12.461	
58	1.00	29584.0	12.307	UT
59	1.00	29692.0	12.535	
60	1.00	31130.0	12.542	
61	1.00	6424.00	12.694	
62	1.00	7838.00	12.700	
63	1.00	7076.00	12.518	
64	1.00	7613.00	12.594	
65	1.00	8415.00	12.581	
66	1.00	8148.00	12.803	
67	1.00	5225.00	12.631	
68	1.00	4793.00	12.773	
69	1.00	5841.00	12.864	
70	1.00	4148.00	12.790	
71	1.00	5079.00	12.725	
72	1.00	4957.00	12.709	
73	1.00	7432.00	12.657	
74	1.00	6524.00	12.507	
75	1.00	6792.00	12.798	
76	1.00	4990.00	12.421	
CAN'T DROP VIAL				
77	1.00	5067.00	12.747	
78	1.00	3920.00	12.652	
79	1.00	3672.00	12.816	
80	1.00	4493.00	12.848	
81	1.00	3826.00	12.968	
82	1.00	5617.00	12.626	
83	1.00	5204.00	12.748	
84	1.00	11.00	24.805	
85	1.00	1863.00	13.044	
86	1.00	15.00	21.935	
87	1.00	1387.00	12.774	
88	1.00	29071.0	12.252	
89	1.00	29058.0	12.457	
90	1.00	30250.0	12.519	

Tabla 3.- Ensayo de adhesión y lectura; por contador de centelleo

Las muestras 31 - 33 corresponden al control, mientras que 37 – 39 a DSG – BC1, 43-45 a DSG – BC1 con polimixina, un mitógeno endotelial, 40 – 42 a DSG – BC2 y 46 – 48 a DSG – BC2 con polimixina. Se observó que DSG – BC1 tiene: 2.02 veces más adhesión que el control y DSG – BC2: 1.99 veces más adhesión que el control.

11.9. ENSAYO DE ADHESIÓN Y LECTURA: XCELLIGENCE

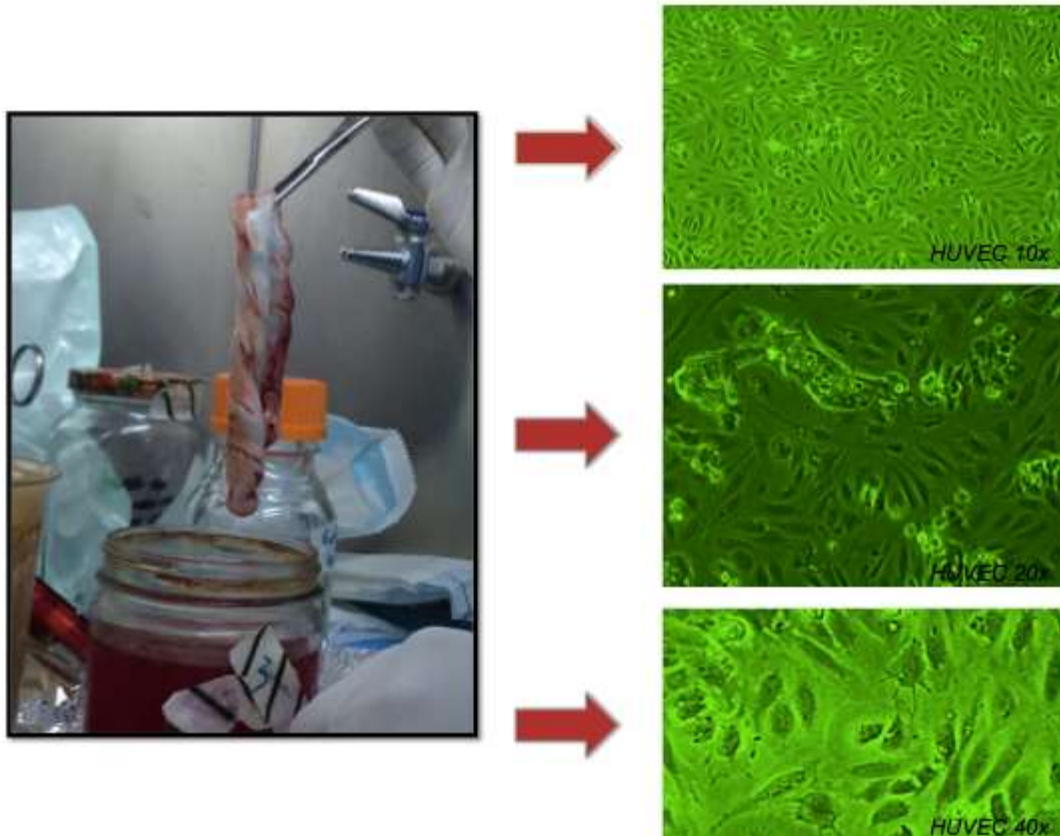
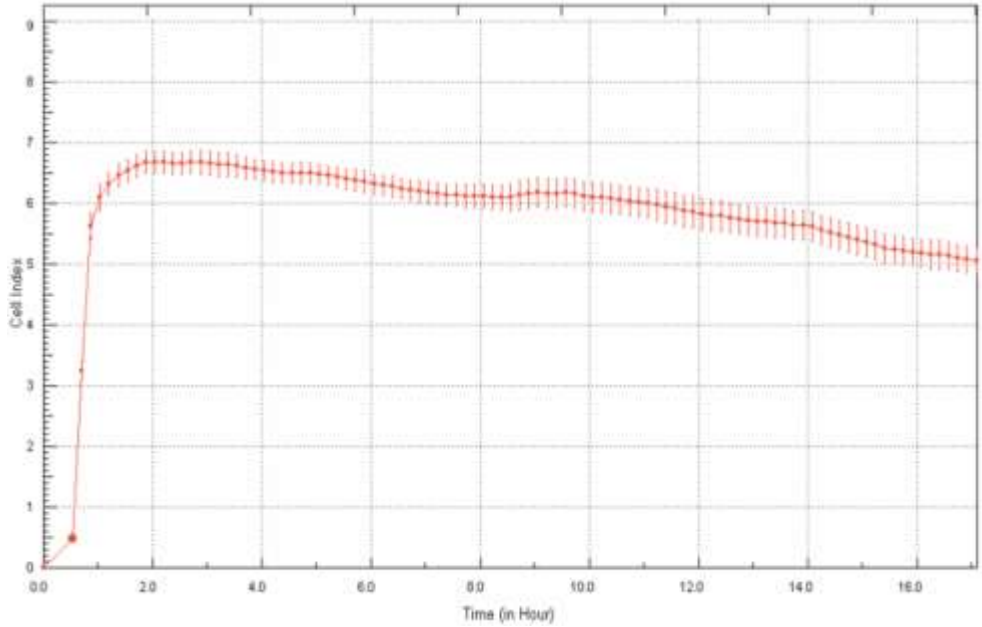
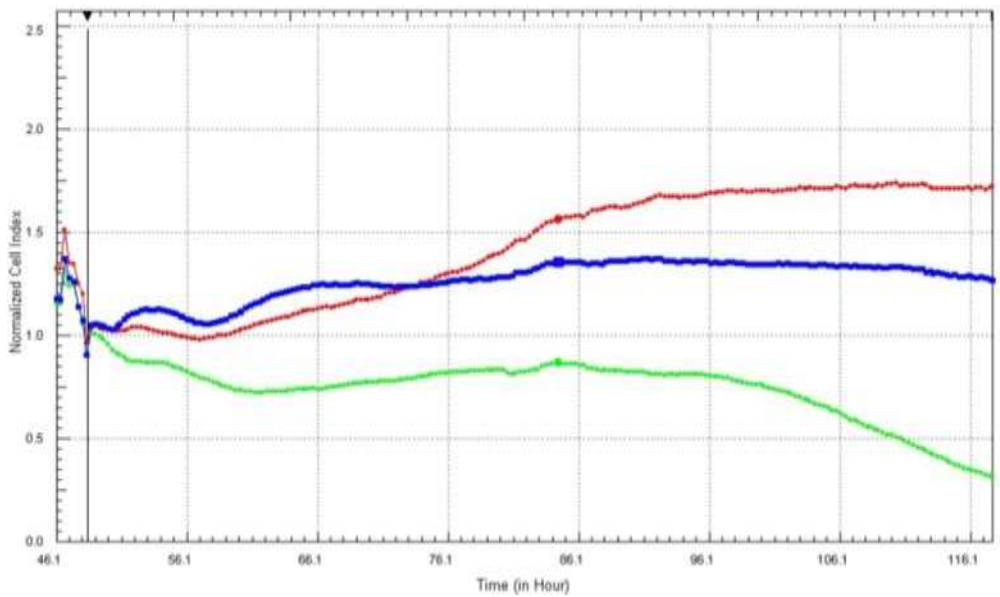


Imagen 153.- Células HUVEC: Obtención de células endoteliales HUVEC de cordones umbilicales.



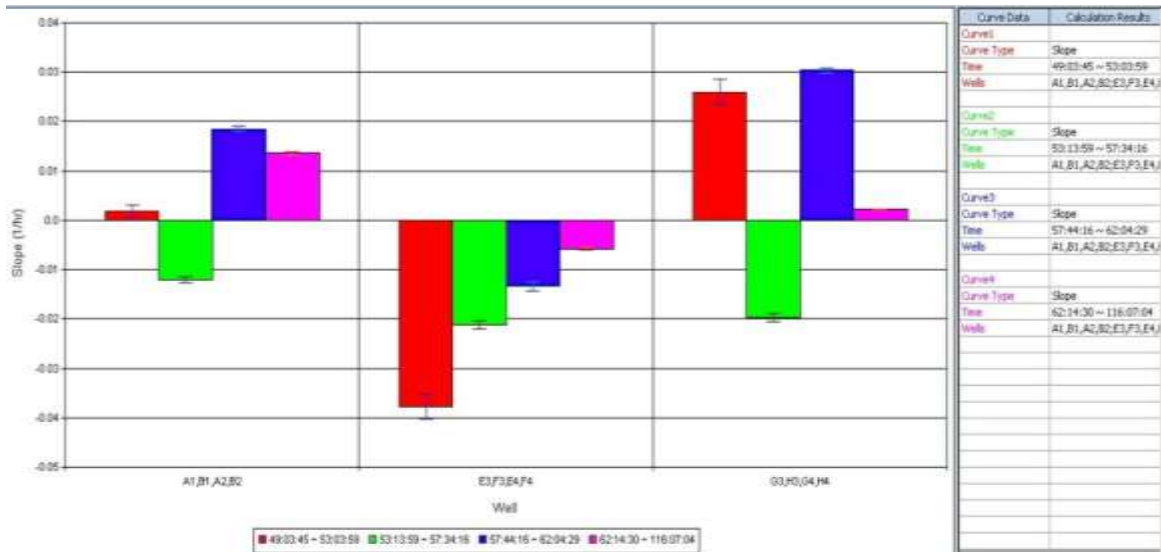
Gráfica 13.- Impedancia monocapa de células HUVEC

En esta primera lectura se observa la impedancia de la monocapa de células HUVEC durante 24 horas. Se tabulan 60,000 células en 500 μ l.



Gráfica 14.- Índice celular por xCelligence

Se etiqueta el control (rojo), el medio condicionado de DSG – BC1 (verde) y el medio condicionado de DSG – BC2 (azul). Se observa que la diferencia en índice celular por impedancia posterior a la aplicación del medio condicionado. Además puede distinguir cómo es que el medio DSG – BC1, el cual provino de una paciente obesa muestra menor índice celular, por ende menor confluencia en la capa de células endoteliales HUVEC y así, mayor permeabilidad vascular y adhesión celular.



Gráfica 15.- Control, DSG – BC1 vs DSG – BC2 en ensayo de adhesión por xCelligence

La primera gráfica corresponde al control, la segunda a la adición de medio condicionado DSG – BC1 y la tercera a la adición de medio condicionado DSG – BC2. En cada gráfica existen cuatro barras. La roja corresponde el tiempo entre 49 – 53 horas, la verde al tiempo entre 53 – 57 horas, la azul al tiempo entre 57 y 62 horas y finalmente la rosa el tiempo restante (+ 62 horas o hasta muerte celular) El ensayo finalizó a las 117 horas. En la gráfica del medio correspondiente a E3, F3, E4 y F4 se logra observar cómo existe una disminución en la impedancia para las células en esas condiciones. En otras palabras, corresponde a menor cantidad celular, mayor permeabilidad vascular y mayor adhesión valorado por disminución en la resistencia eléctrica que generan las células contra la placa conductora.

11.10.GENOTIPIFICACIÓN

Se llevaron los cultivos celulares establecidos al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para la caracterización de su DNA. Se incluyó una muestra del tumor de la paciente en el caso de DSG –BC1 y saliva y un hisopado bucal para DSG –BC2 para poder hacer la comparación del cultivo y determinar la similitud con el huésped de origen.



INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
Laboratorio de Diagnóstico Genómico

Perfil Genético de STR para Verificar la Autenticidad de Línea Celular Humana

Investigador: Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
PRESENTE

Fecha de recepción de las muestras: 05 de Noviembre del 2015, 11:56 horas Resultado emitido el: 12 de Noviembre del 2015, 16:15 horas

Metodología: Reacción en cadena de la polimerasa tipo multiplex y electroforesis capilar en el Analizador Genético 3500 de AB, análisis de fragmentos en Gene Mapper ID v5.
Marcadores genéticos analizados: Pecuñas repeticiones en tandem (STR) autosómicos: CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA y el gen de amelogenina.
Tecnología utilizada: ND-1000 Spectrophotometer, Quantifier™ Human DNA Quantification Kit, AmpFISTR® Identifier™ PCR Amplification.

Resultado:

Identificación del vial	Ca mama 5 células del paciente	Ca mama 5 DNA del paciente	Ca mama 5 RNA del paciente	Ca mama 5 Proteínas del paciente	Saliva de la paciente	Hisopo
Tipo de Muestra:	Células	Células	Células	Células	Saliva	Hisopado Bucal
Identificación LDG:	842-1C	842-1LC1	842-1LC2	842-1LC3	842-1S	842-1
Marcador						
D8S1179	10 14	10 14	10 14	10 14	10 14	10 14
D21S11	30	30	30	30	29 32.2	29 32.2
D7S820	8 9	8 9	8 9	8 9	11 12	11 12
CSF1PO	10	10	10	10	11	11
D3S1358	16	16	16	16	15	15
TH01	6	6	6	6	7	7
D13S317	11	11	11	11	8 12	8 12
D16S539	11 12	11 12	11 12	11 12	10 12	10 12
D2S1338	21 23	21 23	21 23	21 23	17 19	17 19
D19S433	13 14	13 14	13 14	13 14	13 15.2	13 15.2
vWA	15	15	15	15	16 18	16 18
TPOX	9 12	9 12	9 12	9 12	8 9	8 9
D18S51	14	14	14	14	13 19	13 19
D5S818	11 12	11 12	11 12	11 12	11 12	11 12
FGA	23 25	23 25	23 25	23 25	22 24	22 24
Amelogenina	X	X	X	X	X	X
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino

Perfil Genético de STR para Verificar la Autenticidad de Línea Celular Humana

Investigador: Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
PRESENTE

Fecha de recepción de las muestras: 05 de Noviembre del 2015, 11:56 horas Resultado emitido el: 12 de Noviembre del 2015, 16:15 horas

Metodología: Reacción en cadena de la polimerasa tipo multiplex y electroforesis capilar en el Analizador Genético 3500 de AB, análisis de fragmentos en Gene Mapper ID v5

Marcadores genéticos analizados: Pequeñas repeticiones en tandem (STR) autosómicos: CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D16S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA y el gen de amelogenina.

Tecnología utilizada: ND-1000 Spectrophotometer,
Quantifier™ Human DNA Quantification Kit,
AmpFISTR® Identifier™ PCR Amplification.

Identificación del vial	Ca mama 5 células del paciente	Ca mama 5 DNA del paciente
Tipo de Muestra:	Células	Células
Identificación LDG:	842-2C	842-2t
Marcador		
D8S1179	10 13 14	no se obtuvo DNA para obtener un perfil genético de STR
D21S11	28 30 32.2	
D7S820	8 9 11	
CSF1PO	10 11 12	
D3S1358	13 16 17	
TH01	6 7 9	
D13S317	11 12	
D16S539	10 11 12	
D2S1338	17 21 23	
D19S433	13 14 15 16	
vWA	15 16 18	
TPOX	8 9 12	
D16S51	14 15 17	
D5S818	11 12 13	
FGA	20 23 25	
Amelogenina	X	
Sexo	Femenino	

INTERPRETACIÓN. A partir de las muestras entregadas (ID LDG: 842), se realizó una extracción del DNA. El DNA fue cuantificado y se obtuvo un electroferograma de buena calidad (relación fragmento/ruido), que detectó y nombró automáticamente solo los alelos que se reportan, excepto del bloque de parafina que fue identificado en el Laboratorio como la muestra 842-2t. No se detectaron, ni se observaron señales adicionales o diferentes a las reportadas.

Los perfiles genéticos obtenidos de los cultivos celulares identificada como: DSG-BC1 (ID LDG: 842-1C, 842-1LC1, 842-1LC2 y 842-1LC3), poseen el mismo perfil genético pero no corresponden a la muestra de saliva e hisapado bucal que fue identificado como: 842-1S y 842-1.

La muestra DSG-BC2 (ID LDG-2C) presenta una contaminación con las células del cultivos DSG-BC1 y no pudo ser comparado con el bloque de parafina 842-2t debido a que no fue posible obtener DNA para obtener un perfil genético de STR.

Imagen 154.- Perfil genético

Result of STR matching analysis by your data.

- DSMZ Profile Database -

A graphical presentation is shown at the bottom of this page.

EV	Cell No.	Cell name	Locus names									Figures
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO	
			<i>11,12,13</i>	<i>11,12</i>	<i>8,9,11</i>	<i>10,11,12</i>	<i>15,16,18</i>	<i>6,7,9</i>	<i>x,x</i>	<i>8,9,12</i>	<i>10,11,12</i>	
0.93(40/43)	CRL-5900	NCI-H1869 (H1869)	11,11	11,11	8,9	12,12	16,16	6,6	X,X	8,9	10,10	-
0.93(40/43)	CRL-5912	NCI-H2023 (H2023)	12,12	12,12	11,11	11,1,2	18,18	7,9	X,X	8,8	12,12	-
0.93(40/43)	HTB-34	MS751	12,12	12,12	9,11	11,11	16,16	6,6	X,X	8,8	11,11	-
0.93(40/43)	JCRB1090	NCE 16IIA	12,12	11,12	8,11	11,1,2	16,18	7,7	X,X	9,12	11,12	-
0.93(40/43)	JCRB1091	NCE SVIIA3	12,12	11,12	8,11	11,1,2	16,18	7,7	X,X	9,12	11,12	-
0.93(40/43)	RCB1062	LMSU	11,12	12,12	11,11	10,10	16,16	6,7	X,X	9,9	12,12	-

Analyze again after changing the EV

EV	Cell No. Scored	
0.95-1.00	0	
0.90-0.95	6	
0.85-0.90	16	
0.80-0.85	75	
0.75-0.80	195	
0.70-0.75	850	
0.65-0.70	505	
0.60-0.65	546	
0.55-0.60	474	
0.50-0.55	283	
0.45-0.50	181	
0.40-0.45	96	
0.35-0.40	16	
0.30-0.35	20	
0.25-0.30	1	
0.20-0.25	0	
0.15-0.20	0	
0.10-0.15	0	
0.05-0.10	0	

Result of STR matching analysis by your data.

- DSMZ Profile Database -

A graphical presentation is shown at the bottom of this page.

EV	Cell No.	Cell name	Locus names									Figure
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO	
			11,12	11,11	8,9	11,12	15,15	6,6	x,x	9,12	10,10	
1.44(52/36)	115	MCF-7	11,12	11,11	8,9	11,12	14,15	6,6	X,X	9,12	10,10	-
1.44(52/36)	HTB-22	MCF7	11,12	11,11	8,9	11,12	14,15	6,6	X,X	9,12	10,10	-
1.44(52/36)	JCR80134	MCF-7	11,12	11,11	8,9	11,12	14,15	6,6	X,X	9,12	10,10	-
1.44(52/36)	RCB1904	MCF7	11,12	11,11	8,9	11,12	14,15	6,6	X,X	9,12	10,10	-
1.23(48/36)	317	KPL-1	11,12	10,11	8,9	11,12	14,15	6,6	X,X	9,12	10,10	-
1.28(46/36)	CRL-5900	NCI-H1869 [H1869]	11,11	11,11	8,9	12,12	16,16	6,6	X,X	8,9	10,10	-
1.17(42/36)	254	BEN	12,12	12,12	12,12	11,11	15,15	6,6	X,X	8,9	10,10	-
1.17(42/36)	CRL-2267	BE(2)-M17	12,12	11,11	9,10	11,11	18,18	6,6	X,X	8,11	10,10	-
1.17(42/36)	CRL-7721	MB 157	12,12	11,11	10,11	11,11	15,15	7,8	X,X	9,11	10,10	-
1.17(42/36)	HTB-24	MDA-MB-157	12,12	11,11	10,11	11,11	15,15	7,8	X,X	9,11	10,10	-
1.17(42/36)	JCR89131	BE(2)M-17	12,12	11,11	9,10	11,11	17,18	6,6	X,X	8,11	10,10	-
1.11(40/36)	632	SK-N-BE(2)	12,12	11,11	9,10	9,11	18,18	6,6	X,X	8,11	10,10	-
1.11(40/36)	CRL-2268	BE(2)-C	12,12	11,11	9,10	9,11	18,18	6,6	X,X	11,11	10,10	-
1.06(38/36)	203	SK-N-MC	11,11	11,11	8,8	12,12	17,18	9,9,9,3	X,X	9,11	10,10	-
1.06(38/36)	377	FCC-SUP	12,12	11,11	8,9	9,11	14,16	6,9,3	X,X	8,8	10,10	-
1.06(38/36)	731	CAK1-1	11,12	11,11	8,12	12,12	15,17	6,8	X,X	8,11	10,11	-
1.06(38/36)	CRL-2066	CCD-1068Sk	12,13	8,11	8,9	11,12	15,15	6,6	X,X	8,10	9,9	-
1.06(38/36)	CRL-2270	MC-IXC	11,11	11,11	8,8	12,12	17,18	9,9,9,3	X,X	9,11	10,10	-
1.06(38/36)	HTB-10	SK-N-MC	11,11	11,11	8,8	12,12	17,18	9,9,9,3	X,X	9,11	10,10	-
1.06(38/36)	JCRB1203	HCS-2	11,12	11,11	10,12	9,10	18,18	6,6	X,X	9,11	10,10	-
1.06(38/36)	RCB2830	OMC-2	11,12	11,11	8,10	11,11	15,15	7,7	X,X	9,12	9,12	-
1.00(36/36)	151	SK-MEL-30	9,12	8,11	8,9	8,11	15,17	6,6	X,Y	8,11	10,10	-
1.00(36/36)	667	UPCI-SCC-072	14,14	11,11	11,12	11,12	15,15	6,6	X,X	8,8	11,11	-
1.00(36/36)	694	ESO-51	11,11	11,11	8,8	13,13	14,15	9,9	X,X	8,8	10,10	-
1.00(36/36)	783	PANC-1	11,13	11,11	8,10	11,11	15,15	7,8	X,X	8,11	10,12	-
1.00(36/36)	CRL-1469	PANC-1	11,13	11,11	8,10	11,11	15,15	7,8	X,X	8,11	10,12	-
1.00(36/36)	CRL-2323	HCC 1187BL	11,12	11,11	8,11	10,11	15,19	6,6	X,X	8,8	13,13	-
1.00(36/36)	CRL-2718	6	12,13	11,11	9,10	12,12	14,16	6,6	X,Y	8,8	10,10	-
1.00(36/36)	CRL-2720	12	12,13	11,11	9,10	12,12	14,16	6,6	X,Y	8,8	10,10	-
1.00(36/36)	CRL-2722	22	12,13	11,11	9,10	12,12	14,16	6,6	X,Y	8,8	10,10	-
1.00(36/36)	CRL-3035	CHLA-03-AA	11,11	10,11	9,10	11,12	16,18	6,9	X,X	8,9	10,10	-

1.00(36/36)	CRL-7373	Hs 611.T	11.11	11.11	8.10	12.12	15.16	6.9	X,X	8.9	9.11	-
1.00(36/36)	CRL-7473	Hs 737.T	9.11	11.11	8.12	9.11	16.18	6.9	X,X	8.9	10.10	-
1.00(36/36)	CRL-7846	Hs 571.T	11.11	10.11	8.9	11.12	18.18	6.9.3	X,X	8.11	10.10	-
1.00(36/36)	JCR00113	KHM-1B	11.11	11.11	10.10	9.9	14.17	6.6	X,X	11.11	10.10	-
1.00(36/36)	JCR00177.0	KP-1N	11.13	11.11	8.10	11.11	15.15	7.8	X,X	8.11	10.12	-
1.00(36/36)	RCB2095	PANC-1	11.13	11.11	8.10	11.11	15.15	7.8	X,X	8.11	10.12	-
1.00(36/36)	SCRC-4001	ASC57zelo	10.11	9.12	8.8	11.12	15.16	6.6	X,X	8.9	8.10	-
0.97(36/39)	CRL-2922	EA.hy926	11.11	11.11	8.9.10	11.12	14.17	6.8.9.3	X,X	8.9	10.11.2012	-
0.94(34/36)	242	GAMG	10.11	11.11	9.10	11.13	14.19	6.9.3	X,X	8.8	10.10	-
0.94(34/36)	502	H-1184	12.12	11.11	10.12	11.12	16.17	6.9.3	X,Y	8.9	10.10	-
0.94(34/36)	535	CL-40	11.11	8.11	8.9	11.12	16.17	6.9	X,X	8.9	10.12	-
0.94(34/36)	698	FLO-1	12.14	11.11	8.8	12.13	16.16	6.6	X,X	9.11	11.11	-
0.94(34/36)	CCL-199	HLF-a	8.12	11.12	9.12	12.13	15.15	6.9.3	X,X	6.8	10.11	-
0.94(34/36)	CRL-1424	G-361	11.11	11.11	8.11	15.15	15.17	7.9	X,X	8.10	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-2549	Panc 03.27	12.13	11.12	8.13	12.12	16.17	6.6	X,X	8.9	10.11	-
0.94(34/36)	CRL-4010	HTEK-HME1 (ME16C)	11.11	11.12	7.12	11.12	15.16	7.8	X,X	10.12	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-5800	NCI-H23 (H23)	12.13	12.12	9.10	11.11	16.17	6.6	X,X	8.9	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-5817	NCI-H889 (H889)	12.12	11.11	8.9	8.8	17.17	8.9.3	X,X	8.9	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-5842	NCI-H774 (H774)	11.11	8.8	9.11	12.12	15.17	6.9.3	X,X	8.8	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-5858	NCI-H1184	12.12	11.11	10.12	11.12	16.16	6.9.3	X,Y	8.9	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-5880	NCI-H1622	12.12	11.11	10.12	11.12	16.16	6.9.3	X,Y	8.9	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-5930	NCI-H2172	12.12	11.11	9.12	11.11	15.15	7.7	X,X	8.11	12.12	-
0.94(34/36)	CRL-5949	NCI-BL1184 (BL1184)	11.12	11.11	10.12	11.12	16.16	6.9.3	X,Y	8.9	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-7256	Hs 371.T	12.12	11.11	8.12	11.13	14.18	7.8	X,X	9.11	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-7267	Hs 391.We	10.11	11.11	8.11	10.12	14.17	6.9.3	X,X	8.11	10.10	-
0.94(34/36)	CRL-7935	*R1192 (BL: BEAN, R11 *	11.12	11.12	8.12	12.12	15.17	6.8	X,X	8.11	10.11	-
0.94(34/36)	CRL-8799	184B5	11.11	11.11	9.11	11.12	18.19	9.3.9.3	X,X	11.11	10.10	-
0.94(34/36)	HTB-122	BT-549	11.11	11.11	9.10	8.8	15.15	9.3.9.3	X,X	8.8	10.12	-
0.94(34/36)	HTB-46	Caki-1	11.12	11.12	8.12	12.12	15.17	6.8	X,X	8.11	10.11	-
0.94(34/36)	HTB-46	SK-NEP-1	13.13	11.11	8.10	11.11	15.19	8.9.3	X,X	8.11	10.10	-
0.94(34/36)	HTB-5	FCCSUP	12.12	11.14	8.9	9.11	14.16	6.9.3	X,X	8.8	10.10	-
0.94(34/36)	HFO9009	G-361	11.11	11.11	8.11	15.15	15.17	7.9	X,X	8.10	10.10	-
0.94(34/36)	JCRB0253	MKN28	11.11	11.11	9.9	9.11	16.20	6.6	X,X	8.11	12.12	-
0.94(34/36)	JCRB0255	MKN74	11.11	11.11	9.9	9.11	16.20	6.6	X,X	8.11	12.12	-
0.94(34/36)	JCR00801	Caki-1	11.12	11.12	8.12	12.12	15.17	6.8	X,X	8.11	10.11	-

Result of STR matching analysis by your data.

- DSMZ Profile Database -

A graphical presentation is shown at the bottom of this page.

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
Query (Your Cell)			11,12	8,12	11,12	10,12	16,18	7,7	x,x	8,9	11,11
1.17(42/36)	JCRB0403	HuH-7	12,12	10,11	11,11	10,10	16,18	7,7	X,X	8,11	11,11
1.17(42/36)	RCB1366	HuH-7	12,12	10,10	11,11	10,10	16,18	7,7	X,X	8,11	11,11
1.11(40/36)	RCB0266	CLAIRGB	11,12	9,12	11,11	9,12	14,19	7,7	X,X	8,8	11,11
1.06(38/36)	CRL-2175	SW 156	10,11	8,8	11,12	10,12	18,18	9,9,9,3	X,X	8,8	11,11
1.06(38/36)	CRL-2195	SHP-77	12,12	8,8	11,11	11,11	16,16	7,7	X,X	9,11	10,11
1.06(38/36)	CRL-3190	UACC2715	10,10	12,12	11,11	13,13	18,18	7,7	X,X	8,11	11,11
1.06(38/36)	CRL-3190	UACC2715	10,10	12,12	11,11	13,13	18,18	7,7	X,X	8,11	11,11
1.06(38/36)	CRL-7636	Hs 895.Sk	11,12	12,12	10,12	12,14	18,18	6,7	X,X	8,11	11,11
1.06(38/36)	CRL-7637	Hs 895.T	11,12	12,12	10,12	12,14	18,18	6,7	X,X	8,11	11,11
1.03(36/35)	RCB2105	D9S-AH2	11,12		12,12	9,10	16,18	7,7	X,X	8,12	9,10,11
1.00(36/36)	894	HDQ-P1	11,11	12,12	11,12	11,11	16,18	9,9,9,3	X,X	8,8	11,11
1.00(36/36)	528	OCI-LY-19	9,11	11,12	12,12	12,12	16,16	6,7	X,X	8,9	11,12
1.00(36/36)	566	HCC-827	12,12	9,9	11,12	12,12	18,18	6,6	X,X	8,8	11,11
1.00(36/36)	CRL-2503	NL20	12,12	11,12	12,12	12,12	14,17	6,7	X,X	9,11	11,11
1.00(36/36)	CRL-2504	NL20-TA	12,12	11,12	12,12	12,12	14,17	6,7	X,X	9,11	11,11
1.00(36/36)	CRL-2858	HCC827	12,12	9,9	11,12	12,12	18,18	6,6	X,X	8,8	11,11
1.00(36/36)	CRL-5892	NCI-H1755 [H1755]	11,12	10,12	12,12	11,12	18,18	7,7	X,X	8,8	12,12
1.00(36/36)	CRL-7551	Hs 820.Sk	11,11	12,12	12,12	9,13	16,18	7,7	X,Y	8,8	11,12
1.00(36/36)	CRL-7552	Hs 820.T	11,11	12,12	12,12	9,13	16,18	7,7	X,Y	8,8	11,12
1.00(36/36)	CRL-7653	Hs 906(A).T	11,11	10,11	11,12	12,12	16,18	7,8	X,X	8,8	10,11
1.00(36/36)	CRL-7654	Hs 906(B).T	11,11	10,11	11,12	12,12	16,18	7,8	X,X	8,8	10,11
1.00(36/36)	CRL-7654	Hs 906(B).T	11,11	10,11	11,12	12,12	16,18	7,8	X,X	8,8	10,11
1.00(36/36)	CRL-7684	Hs 934.T	11,11	10,11	11,12	12,12	16,18	7,8	X,X	8,8	10,11
1.00(36/36)	CRL-7685	Hs 935.T	11,11	10,11	11,12	12,12	16,18	7,8	X,X	8,8	10,11
1.00(36/36)	JCRB1090	NCI 1681A	12,12	11,12	8,11	11,12	16,18	7,7	X,X	9,12	11,12
1.00(36/36)	JCRB1091	NCE SVHA3	12,12	11,12	8,11	11,12	16,18	7,7	X,X	9,12	11,12
1.00(36/36)	JCRB3008	GM1526	8,11	12,12	11,12	12,12	16,18	7,9,3	X,X	8,10	11,12
1.00(36/36)	RCB1062	LMSU	11,12	12,12	11,11	10,10	16,16	6,7	X,X	9,9	12,12
1.00(36/36)	RCB1545	HSCAS-2-L	12,12	11,14	12,12	9,10	17,18	7,9	X,X	8,8	11,11
1.00(36/36)	RCB2345	EEB	11,11	9,12	10,10	10,12	16,17	7,7	X,Y	8,9	11,11
1.00(36/36)	TIB-195	CEM-CM3	12,13	12,12	10,13	10,12	18,19	6,7	X,X	8,8	11,11

0.94(34/36)	228	SBC-2	11.12	12.13.3	12.12	9.10	16.18	7.7	X,X	8.12	9.10	-
0.94(34/36)	229	SBC-7	11.12	12.13.3	12.12	9.10	16.18	7.7	X,X	8.12	9.10	-
0.94(34/36)	515	CAL-29	11.12	8.12	8.31	11.11	16.16	7.7	X,X	8.8	10.12	-
0.94(34/36)	561	RC-K8	11.11	9.9	11.12	10.10	18.19	7.7	X,Y	8.8	11.13	-
0.94(34/36)	CCL-256	NCI-H2126 (H2126)	11.11	12.14	8.9	12.12	17.17	7.9.3	X,X	8.8	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-10782	MCF-12A	11.13	9.11	8.11	9.12	16.18	7.7	X,X	8.8	10.11	-
0.94(34/36)	CRL-10783	MCF-12F	11.13	9.11	8.11	9.12	16.18	7.7	X,X	8.8	10.11	-
0.94(34/36)	CRL-2104	CCD-1087Sk	11.12	12.12	9.10	10.13	17.19	7.7	X,X	8.8	11.12	-
0.94(34/36)	CRL-2742	1A6 (PTA-554)	11.12	11.11	10.11	9.9	16.18	7.9	X,X	8.9	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-2914	M4A4	11.12	12.12	8.10	13.13	16.18	6.7	X,X	8.11	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-2915	M4A4 GFP	11.12	12.12	8.10	13.13	16.18	6.7	X,X	8.11	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-2916	M4A4 LMS-2 GFP	11.12	12.12	8.10	13.13	16.18	6.7	X,X	8.11	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-2917	M4A4 LMS-4 CL16 GFP	11.12	12.12	8.10	13.13	16.18	6.7	X,X	8.11	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-2918	NM2C5	11.12	12.12	8.10	13.13	16.18	6.7	X,X	8.11	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-2919	NM2C5 GFP	11.12	12.12	8.10	13.13	16.18	6.7	X,X	8.11	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-5863	NCI-H1334	11.11	12.12	11.11	11.12	17.17	7.7	X,X	8.8	12.12	-
0.94(34/36)	CRL-5912	NCI-H2023 (H2023)	12.12	12.12	11.11	11.12	18.18	7.9	X,X	8.8	12.12	-
0.94(34/36)	CRL-7479	Hs 741.Sk	11.11	11.12	9.10	12.12	19.19	7.9.3	X,X	8.8	11.11	-
0.94(34/36)	CRL-7480	Hs 741.T	11.11	11.12	9.10	12.12	19.19	7.9.3	X,X	8.8	11.11	-
0.94(34/36)	HTB-105	Tera-1	11.13	12.12	9.10	10.12	14.14	7.8	X,X	8.8	11.11	-
0.94(34/36)	HTB-129	MDA-MB-4355	12.12	12.12	8.10	13.13	16.18	6.7	X,X	8.11	11.11	-
0.94(34/36)	HTB-34	MS751	12.12	12.12	9.11	11.11	16.16	6.6	X,X	8.8	11.11	-
0.94(34/36)	RCB0007	HeLa	11.12	12.12	8.12	9.10	16.18	7.7	X,X	8.12	9.10	-
0.94(34/36)	RCB0402	"HeLa-P3"	11.12	12.12	8.12	9.10	16.18	7.7	X,X	8.12	9.10	-
0.94(34/36)	RCB0785	FCP-53H	10.11	8.12	11.12	9.10	17.18	7.7	X,X	8.9	9.10	-
0.94(34/36)	RCB1125	TUM-2	11.13	8.12	10.11	10.14	17.17	7.7	X,X	8.8	11.12	-
0.94(34/36)	RCB1889	HEp-2	11.12	12.12	8.12	9.10	16.18	7.7	X,X	8.12	9.10	-
0.94(34/36)	RCB1966	S1	11.11	11.12	8.11	12.12	16.16	7.7	X,X	8.11	12.12	-
0.94(34/36)	RCB2234	HE13	10.11	8.8	9.11	10.11	17.17	7.7	X,X	8.8	11.13	-
0.94(34/36)	RCB2277	GSS	12.13	8.8	11.11	12.12	14.14	7.7	X,X	8.8	9.9	-
0.94(34/36)	RCB2356	HeLa CM8- LTR-??-gal	11.12	12.12	8.12	9.10	16.18	7.7	X,X	8.12	9.10	-
0.94(34/36)	RCB2358	HLat	11.12	12.12	8.12	9.10	16.18	7.7	X,X	8.12	9.10	-
0.94(34/36)	RCB2818	B1203L	11.11	12.12	11.12	11.11	18.18	9.9	X,X	9.10	11.11	-
0.94(34/36)	SCRC-4000	ASC52etu	11.13	8.12	8.11	10.13	16.16	7.7	X,X	8.8	10.13	-
0.94(34/36)	0	PC-9	11.11	8.8	10.11	9.9	17.17	7.7	X,X	11.11	11.11	-
0.92(34/37)	CRL-2265	CEM/CI	12.13	9.10.12	9.12	10.13	18.19	6.7	X,X	8.8	11.11	-

0.92(34/37)	RCB0589	SP8761	11.32	8.30,11	11.32	9.9	16.19	7.7	X.X	9.11	11.32	-
-------------	---------	--------	-------	---------	-------	-----	-------	-----	-----	------	-------	---

Analyze again after changing the EV

EV	Cell No. Scored	
0.95-1.00	31	
0.90-0.95	37	
0.85-0.90	121	
0.80-0.85	193	
0.75-0.80	226	
0.70-0.75	334	
0.65-0.70	421	
0.60-0.65	353	
0.55-0.60	484	
0.50-0.55	355	
0.45-0.50	32	
0.40-0.45	352	
0.35-0.40	182	
0.30-0.35	96	
0.25-0.30	27	
0.20-0.25	19	
0.15-0.20	2	
0.10-0.15	1	
0.05-0.10	0	
0.00-0.05	10	

Total No. of cells = 3274

Tabla 4.- Resultado del genotipificación realizado en el INMGEN

Se determina que los cultivos celulares DSG – BC1 y DSG – BC2 no corresponden a líneas celulares previamente establecidas por lo que les brinda el título de nueva línea celular.

12. DISCUSIÓN

Al inicio de la investigación, se propuso que existen diferencias en la biología celular y los perfiles moleculares entre el cáncer de mama que se desarrolla en mujeres obesas y el que se desarrolla en mujeres sin obesidad. Esto en parte está basado en estudios previos en donde se estableció una asociación causal entre la obesidad y el cáncer de mama. No obstante, en México únicamente se cuenta con un estudio del Instituto Nacional de Cancerología en donde se establece la obesidad y el sobrepeso entre los factores pronósticos más importantes para el cáncer de mama. Hasta el momento, no se contaba con ningún estudio a nivel celular y molecular en donde se buscara no solamente la asociación entre la obesidad y el cáncer sino en el que se pudiera delimitar las diferencias entre el cáncer de mama desarrollado en ambientes metabólicos distintos.

La obtención de los explantes para poder realizar el cultivo inicial fue complicada, por lo que fue necesario establecer un protocolo de cooperación entre los distintos servicios del Centro Médico ABC. Aún así, la población con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ en el ABC fue escasa, por lo que únicamente se obtuvieron cuatro pacientes para el estudio de manera inicial. En esta primera fase se completó el grupo control y de las 10 pacientes de las que se obtuvieron explantes sólo logramos establecer dos nuevos cultivos primarios denominados DSG –BC1 y DSG – BC2, provenientes de una paciente con obesidad (31.5 kg/m^2) y otra con peso en límites normales (22 kg/m^2), respectivamente. Por medio de los explantes se logró estandarizar la metodología de cultivo y tipificación celular para la realización de cultivos primarios. Se confirmó la originalidad y autenticidad de las líneas celulares mediante estudios de genotipificación en el INMEGEN.

Ya establecidas las líneas celulares, se continuó la caracterización celular y molecular mediante tasas de proliferación y motilidad *in vitro*, sensibilidad a dos quimioterapéuticos (Doxorubicina y Paclitaxel), índices de tumorigenicidad en un modelo murino a través de determinar las tasas de crecimiento tumoral en ratones atímicos, análisis patológico de tumores provenientes de los cultivos primarios generados, obtención de medio condicionado y determinación de componentes, valoración de la activación endotelial por los factores presentes en el medio condicionado a través de un ensayos de adhesión, y genotipificación de las líneas valorando microsatélites .

De acuerdo a nuestra hipótesis encontramos diferencias en las tasas de proliferación entre los cultivos derivados de la paciente con obesidad comparada con la paciente no obesas. Concretamente, el cultivo primario DSG – BC1 (IMC 31.5 kg/m²) duplicó la cantidad de células sembradas a las 60 horas, mientras que el cultivo primario DSG – BC2 (IMC 22 kg/m²) llegó a su máxima a confluencia a las 48 horas de sembrado. Por tratarse de una ensayo *in vitro* estos resultados reflejan características intrínsecas de proliferación que podrían deberse a que se generaron en ambientes metabólicos particulares.

A diferencia de estos ensayos *in vitro*, en ratones atímicos el cultivo primario DSG – BC1 generado en obesidad mostró tener menor tasa de crecimiento que el cultivo DSG – BC2 generado sin obesidad. Esto se reflejó en que el máximo desarrollo tumoral del primer cultivo fue de 1 mm mientras que el del segundo alcanzó 10 mm de diámetro. A diferencia de los cultivos *in vitro*, el crecimiento tumorigénico *in vivo* requiere un ambiente metabólico similar al huésped con obesidad, caracterizado por la presencia de adipocitocinas, factores proinflamatorias y hormonas. Esta hipótesis se podría probar implantando cada cultivo primario en ratones atímicos con obesidad supliendo así los factores ambientales.

En el análisis de los tumores murinos por patología se observó que mostraban las mismas características, inmunofenotipo y agresividad que el del tumor de origen. De manera más

específica, DSG – BC2, al ser triple negativo presentó invasión vascular, muscular y perineural.

Las tasas de citotoxicidad para cada línea reflejan distintas concentraciones inhibitorias 50 (IC50) para cada fármaco. Para DSG – BC1 fue necesaria una dosis de doxorubicina similar a la de DSG – BC2 (0.03 µg/ml y 0.04 µg/ml respectivamente), mientras que para DSG – BC1 fue necesaria una dosis casi tres veces mayor de paclitaxel comparada a aquella para DSG – BC2 (0.2 µg/ml y 0.07 µg/ml respectivamente). Se conoce por la literatura oncológica que la dosis de quimioterapia es calculada dependiendo de los metros cuadrados de superficie corporal del paciente, no obstante a nivel molecular es evidente cómo será necesario brindar mayor medicamento a la primer cultivo primario, esto implicaría que la paciente con obesidad requeriría de una mayor dosis de quimioterapia.

La capacidad de motilidad celular fue valorada por medio de un ensayo de cierre de herida en el cual se estimó con un cierre total en 72 horas con una velocidad de 46% cada 24 horas para DSG – BC1, mientras que para DSG – BC2 se observó un cierre total en 96 horas, con una velocidad de 21% cada 24 horas. La línea DSG – BC1 muestra mayor velocidad para cierre de herida, por ende mayor capacidad de desplazamiento celular, lo que podría traducirse en mayor invasión y metástasis in vivo. Sin embargo, el análisis de los tumores generados en el modelo murino no cumplen con esta expectativa. La falta de invasión a tejidos adyacentes del cultivo primario DSG – BC1, a pesar de haber mostrado mayor motilidad in vitro, podría a la falta del ambiente característico de la obesidad.

Para analizar la presencia de factores con potencial metastásico existen cuatro ensayos principales, ensayos de motilidad, invasividad, capacidad de invasión vascular y generación tumoral in vivo. Para realizar estos ensayos, se obtuvo medio condicionado y se puso en contacto con células endoteliales humanas derivadas de la vena del cordón umbilical. En estos estudios, la adhesión de células U937 y la separación entre la

monocapa de células endoteliales conllevan a pensar que las células tumorales generadas en un ambiente con obesidad favorecen características metastásicas. De manera específica, los estudios de adhesión mostraron discretamente mayor adhesión de la línea con obesidad (2.02 veces más que el control, 1.99), mientras que con el sistema Xcelligence reveló mayor adhesión valorada por disminución en la resistencia eléctrica que generan las células contra la placa conductora y por ende mayor permeabilidad vascular. De los cuatro posibles ensayos para realizar, a pesar de haberse realizado en pacientes con el mismo perfil inmunohistoquímico, se refleja un distinto potencial metastásico entre la paciente con y sin obesidad (DSG-BC2 vs DSG-BC1). Los resultados del ensayo del cierre de herida puede correlacionarse a que, para obtener la misma velocidad y agresividad en dicho ensayo, posiblemente sean indispensables las condiciones in vivo, de las que carecemos in vitro. Poner células en una condición artificial aunque ayuda enormemente a la comprensión de las mismas y al avance de la ciencia, nunca reflejará la fisionomía humana.

Al retomar el estudio y volver a plantear la metodología de toma de los mismos, fue posible obtener metodología una cifra final de 2 líneas celulares y 3 cultivos celulares de cancer de mama de 32 explantes mamarios. Es importante notar que de las líneas celulares que se establecieron, DSG- BC2 tuvo un viraje a triple negativo, por lo que se obtuvo una pareja de la misma neoplasia establecida en ambientes metabólicos distintos. Al tener esto es de aún mayor importancia valorar las diferencias que existen en esta aparente "misma enfermedad," que muestra, como se ha visto a lo largo del protocolo, que no lo es. De los cultivos celulares establecidos, aun no se establecen las líneas celulares de los cultivos celulares que se han aislado al necesitar pasar por un proceso arduo en el Instituto Nacional de Ciencias Genómicas (INMEGEN) en donde es necesario obtener ADN directamente de la paciente del cual pertenece el cultivo, por lo que se hará como un segundo protocolo. Además, existen explantes cuyas células aún se encuentran en crecimiento y proliferación. De todos estos es importante realizar los estudios mencionados de proliferación, cierre de herida y valoración motilidad, respuesta a quimioterapia y valoración de dosis y esquema óptimo, crecimiento in vivo

del tumor en ratones atímicos *nu/nu*, además de los otros estudios del medio condicionado que permite valorar también la capacidad indirecta de metástasis.

13. CONCLUSIONES

Se lograron establecer dos líneas celulares, uno proveniente de un paciente con cáncer de mama y obesidad, DSG – BC1 (IMC 31.5 kg/m²) y otra sin obesidad, DSG – BC2 (IMC 22 kg/m²). No tenemos conocimiento de la existencia de cultivos primarios de cáncer de mama generados enfocándose en el IMC como principal factor distintivo. Se establecieron además 3 cultivos celulares de los explantes obtenidos, que serán material para continuar estudiando esta asociación, además de 10 explantes que se mantiene en crecimiento.

Se logró corroborar la autenticidad de dichas líneas y su caracterización mediante distintos ensayos tanto in vitro como in vivo. Los ensayos buscaban valorar características como respuesta a tratamiento, tasas de crecimiento y proliferación celular, reproducibilidad in vivo, respuesta a quimioterapia y de manera indirecta, capacidad de invasión y metástasis. Se estableció que el cultivo primario derivado de un ambiente con obesidad tiene una mayor tasa de proliferación, motilidad, resistencia a quimioterapia y características que sugieren mayor capacidad metastásica.

Los ensayos realizados muestran diferencias importantes entre cultivos primarios de cáncer de mama con y sin obesidad. Las pacientes del estudio, a pesar de tener “la misma enfermedad,” se comportaron de manera completamente distinta. Dichas diferencias son notorias en cuando a que los cultivos celulares desarrollados en un ambiente metabólico de obesidad tienen a tener una mayor tasa de proliferación, utilizan distintos esquemas y dosis de quimioterapia, tienen mayor capacidad de motilidad, invasión y de manera indirecta, metástasis. Esto sirve como base para recalcar la importancia y relevancia del tratamiento individualizado.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. "Diccionario De Cáncer." National Cancer Institute. National Institutes of Health, n.d. Web. 03 Feb. 2016. [En línea] <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45587>.
2. Abouzied, M. "Glosario." Health Library. EBSCO, 5 Jan. 2015. Web. 03 Feb. 2016. [En línea] <http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=0a1af489-5b4c-4f2d-978e-3930be13b1f6&chunkiid=126531>.
3. INEGI. Mortalidad. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. México, INEGI, 2011. Recuperado el 29 de enero del 2014. [En línea] <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>.
4. Cárdenas Sánchez J, Bargalló Roche E, Erazo Valle A, Maafs Molina E, Poitevin Chacón A. Concenso mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario: Quinta revisión. México, INCAN, 2013. Recuperado el 27 de enero del 2014. [En línea] <http://www.incan.edu.mx/images/cmama.pdf>.
5. Herschkowitz, JI. Breast Cancer Subtypes, Mouse Models, and Microarrays. (Tesis doctoral). North Carolina, EUA: Degree of Doctor of Philosophy in the Curriculum of Genetics and Molecular Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, 2007. Recupera. [En línea] <https://cdr.lib.unc.edu/indexablecontent/uuid:2c573582-6062-46b6-95f8-02594590bfa0>.
6. Iorns E, Drews-Elger K, Ward TM, Dean S, Clarke J, et al. A New Mouse Model for the Study of Human Breast Cancer Metastasis. PLoS ONE. 2012; 7(10): e47995. [En línea] <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0047995>.

7. Barquera, Simón, Ismael Campos Nonato, Lucía Hernández Barrera, and Juan Rivera Dommarco. "Obesidad En Adultos: Los Retos De La Cuesta Abajo." ENSANUT 2012: Centro De Investigación En Nutrición Y Salud, Instituto Nacional De Salud Pública, México (n.d.): n. [En línea] <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/ObesidadAdultos.pdf>.
8. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene*. Aug 23 2004;23(38):6365-6378. [En línea]
9. Aguilar Cordero MJ, González Jiménez E, García López AP, et al. Obesidad y su implicación en el cáncer de mama. *Nutrición Hospitalaria*. 2011; 26: 899-903. [En línea]
10. "What Is Cancer?" National Cancer Institute. National Institutes of Health, 9 Feb. 2015. Web. 30 Mar. 2016. [En línea] <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>.
11. Chow, A. Y. "Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells." *Nature Education* 2010: 3(9):7. [En línea]
12. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000. 406: 747 - 752. [En línea]
13. Romero Figueroa MS, Santillán Arreygüe L, Olvera Hernández PC, Morales Sánchez MA, Ramírez Mendiola VL. Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecol Obstet Mex*. 2008; 76(11):667-72. [En línea]
14. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. A. [En línea]
15. Rose DP, Vona-Davis L. Influence of obesity on breast cancer receptor status and prognosis. *Expert Review of Anti-cancer Therapy*. 2009; 9(8): 1091–1101. [En línea]

16. Vona-Davis L, Rose DP, Hazard H, et al. Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2008; 17(12): 3319–3324. [En línea]
17. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, Eley JW. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes and Control*. 2009; 20(7): 1071–1082. [En línea]
18. Gerson R, Albán F, Villalobos A, Serrano A. Recurrencia y supervivencia en cáncer mamario temprano con inmunofenotipo triple-negativo. *Gac Méd Méx*. 2008; 144 (1): 27-34. [En línea] http://www.anmm.org.mx/GMM/2008/n1/27_vol_144_n1.pdf.
19. Santana-Davila R, Perez EA. Treatment options for patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2010 3:42. <http://www.jhoonline.org/content/3/1/42>. [En línea]
20. Carey LA. Directed Therapy of Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*. 2010; 15(5): 49-6. [En línea] http://theoncologist.alphamedpress.org/content/15/suppl_5/49.full.pdf+html.
21. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* (2012) 23 (suppl 6): vi7-i12. [En línea] http://annonc.oxfordjournals.org/content/23/suppl_6/vi7.full.pdf+html.
22. Liedtke C, Hess KR, Karn T et al. The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2013; 138(2): 591-9. [En línea]
23. "Types of Breast Cancers." The American Cancer Society, 22 Feb. 2016. Web. 25 Feb. 2016. [En línea] <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>.
24. "Breast Cancer Facts and Figures: 2011 - 2012." American Cancer Society (2012): n. pag. Web. 25 Feb. 2016. [En línea]

<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-030975.pdf>.

25. "Invasive Ductal Carcinoma (IDC)." The National Breast Cancer Foundation. N.p., 2015. Web. 25 Feb. 2016. [En línea] <http://www.nationalbreastcancer.org/invasive-ductal-carcinoma>.
26. Rivera DJ, Shamah LV, Villalpando HS, González de Cossío T, Hernández PB, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Nutrición 1999: Estado nutricional de niños y mujeres en México. Instituto Nacional de Salud Pública: 2001. [En línea]
27. Martorell R. Diabetes and Mexicans: Why the Two Are Linked. *Prev Chronic Dis*. 2005; 2(1): A04. [En línea]
28. Medina, Catalina, Simón Barquera, and Ian Janssen. "Resultados De Actividad Física Y Sedentarismo En Personas De 10 a 69 Años." *ENSANUT (2012): n. pag.* Encuesta Nacional De Salud Y Nutrición 2012: Evidencia Para La Política Pública En Salud. Instituto Nacional. [En línea] <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/ActividadFisica.pdf>.
29. Amadou A, Torres Mejia G, Fagherazzi G, Ortega C, Angeles-Llerenas A, Chajes V, Biessy C, Sighoko D, Hainaut P, Romieu I. Anthropometry, silhouette trajectory, and risk of breast cancer in Mexican women. *Am J Prev Med*. 2014; 46(3 Suppl 1): S52-64. [En línea]
30. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev*. 2012; 249(1): 218–238. [En línea]
31. Alam I, Ng TP, Larbi A. Does Inflammation Determine Whether Obesity Is Metabolically Healthy or Unhealthy? The Aging Perspective. *Mediators Inflamm*. 2012: 456. [En línea]
32. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 93-107. [En línea]

33. Arce-Salinas C, JL Aguilar - Ponce, C Villarreal-Garza, FU Lara-Medina, D Olvera-Caraza, A Alvarado Miranda, D Flores Díaz, A Mohar. "Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients.". *Breast Cancer Res Treat* (2014) 146:183-188. [En línea]
34. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 2011; 13 (14): 215. [En línea] <http://breast-cancer-research.com/content/pdf/bcr2889.pdf>.
35. Jerry Usary, Wei Zhao, David Darr, et al. Predicting Drug Responsiveness in Human Cancers Using Genetically Engineered Mice. *American Association for Cancer Research: Clinical Cancer Research*. 2013; 19(17): 4889–99. [En línea] <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2013/07/18/1078-0432.CCR-13-0522.full.pdf>.
36. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, et al. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS ONE*. 2009, 4(7): e6146. [En línea] <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0006146>.
37. Bana E, Bagrel D. In Vitro Breast Cancer Models as Useful Tools in Therapeutics? *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. Croatia, In Tech Europe, 2011. Recuperado el 27 enero del 2014. [En línea] <http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-focusing-tumor-microenvironment-stem-cells-and-metastasis/in-vitro-breast-cancer-models-as-useful-tools-in-therapeutics->.
38. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research* 2008, 10 (2): R25. [En línea] <http://breast-cancer-research.com/content/10/2/r25>.
39. Lasfargues EY, Ozzello L: Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1958; 21:1131-1147. [En línea]

40. Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973; 51:1409-1413. [En línea]
41. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy.* 2010; 10:10, 955-960. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3047091/>.
42. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS). Estrategia de Cooperación con México de la OPS/OMS para el periodo 2005-2009. 2005. Recuperado el 29 de enero del 2014. [En línea] http://www.who.int/countryfocus/cooperation_strategy/ccs_mex_es.pdf.
43. Diario Oficial de la Federación [DOF]. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011: Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. México, Diario Oficial de la Federación, 2011. Recuperado el 12 de enero d. [En línea] http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5194157&fecha=09/06/2011.
44. Organización Mundial de la Salud [OMS]. Cáncer de mama: prevención y control. 2013. Recuperado el 20 de enero de 2014, de: . [En línea] <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index3.html>.
45. Instituto Nacional de Salud Pública [INSP]. (2012b). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: INSP, SSA. [En línea]
46. Herrera, LA, Mohar – Betancourt A. La investigación traslacional en cáncer: Reto del Instituto Nacional de Cancerología. *Revista de Investigación Clínica* 2009; 61 (6): 451-453. [En línea] <http://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2009/nn096a.pdf>.
47. Park J, TSMorely, M Kim, DJ Clegg, PE Scherer. “Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence”. *Nat Rev Endocrinol.* 2014 Aug;10 (8):455-65. [En línea]

48. Rose DP, PJGracheck, L Vona-Davis. "The Interactions of Obesity, Inflammation and Insulin Resistance in Breast Cancer." *Cancers (Basel)* 2015 Oct 26; 7(4): 2147-68. [En línea]
49. Lorez M, Ceschi M, Dehler S, Jundt G, Probst-Hensch N. Obesity as Prognostic Factor for Survival after Breast Cancer: Results from a population-based study. Foundation National Institute for Cancer Epidemiology and Registration. Switzerland, 2012. *Recuperado el 2 enero del 2014.* . [En línea] http://www.krebsregister.usz.ch/Publikationen/Documents/p_poster%20ML_Obesity%20as%20Prognostic%20Factor%20for%20Survival%20after%20Breast%20CancerIACR_2012.pdf.

15. PRESUPUESTO

La Unidad Periférica del IIB, UNAM ubicada en la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ cuenta con toda la infraestructura necesaria para realizar cultivos primarios de células: cuarto de cultivo, 4 gabinetes de cultivo con flujo laminar estéril, 3 incubadoras de temperatura constante que mantienen una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, microscopio invertido de contraste de fase para seguir la evolución de los cultivos, baño de 37° C , dos refrigeradores de 4° C con sección de -20° C para el almacenamiento de medios, sueros y otros suplementos, 2 tanques de nitrógeno líquido y 1 ultra-congelador de -70 C° para el almacenamiento de líneas celulares y cultivos primarios. Con el presupuesto de la Unidad de bioquímica se han adquirido todos los materiales y reactivos para el establecimiento de los cultivos primarios y el mantenimiento, expansión y preservación de células primarias normales o transformadas.

La determinación del presupuesto de equipo de cultivo celular es la siguiente:

ETAPA I

Incubadora de células de CO ₂	\$ 250,000
Campana de cultivo nivel II	\$ 150,000
Centrífuga clínica refrigerada	\$ 70,000
Microscopio invertido	\$ 250,000
Pipetor	\$ 15,000
Micropipetas	\$ 15,000
Baño de temperatura variable	\$ 30,000
Tanque de nitrógeno líquido	\$ 75,000
Refrigerador 4 °C/-20 °C	\$ 20,000

Potenciómetro (ajuste de pH)	\$ 30,000
Balanza analítica	\$ 20,000
Plataforma de agitación orbital	\$ 30,000

ETAPA II

Equipo de electroforesis y electro-transferencia	\$ 75,000
Microcentrífuga refrigerada	\$ 75,000
Baño seco	\$ 20,000
Sistema de detección de imagen visible	\$ 350,000

ETAPA III

Sistema de captura de imagen fluorescente	\$ 1000,000
Sistema multiplex	\$ 1000,000

REACTIVO PARA CULTIVO	COSTO
Suero fetal bovino	\$ 8,000.00
Caja de Medio RPMI 1640 con 10 sobres de 2 L cada sobre	\$ 5,000.00
2 x 25 ml de solución concentrada 100x de antibiótico antimicótico	\$ 2,000.00
10 x 50 ml de solución estéril de NaCl 150 mM con tripsina 0.02% con 10 mM EDTA	\$ 1,000.00
5 ml de solución estéril de azul de tripano al 0.4% en NaCl 150 mM	\$ 250.00
100 ml de solución de matriz extracelular al 20% (P/V) en 10% de ácido acético	\$ 500.00
5 botellas de 250 ml de etanol al 70% para limpieza	\$ 1,500.00
SUBTOTAL	\$ 18,250.00

MATERIAL PARA CULTIVO	COSTO
Caja Petri esteril para cultivo celular de 3 cm de diámetro caja con 100 piezas	\$ 2,000.00
Caja Petri esteril para cultivo celular de 10 cm de diámetro caja con 100 piezas	\$ 5,000.00
Caja con 12 unidades de filtración estériles con filtro de 0.22 micrometros	\$ 6,000.00
Caja con 200 pipetas pasteur de 20 cm de largo	\$ 500.00
Caja con 250 pipetas estériles de plástico de 5 ml empacadas individualmente	\$ 1,000.00
Caja con 250 pipetas estériles de plástico de 10 ml empacadas individualmente	\$ 2,500.00
Caja con 500 tubos cónicos estériles de 50 ml con tapa de rosca	\$ 5,500.00
Caja con 500 tubos cónicos estériles de 15 ml con tapa de rosca	\$ 3,500.00
Caja con 100 crio-tubos estériles de 3 ml con tapa de rosca	\$ 3,000.00
Caja con 10 cajas con puntas estériles para micropipeta de 1 ml	\$ 3,000.00
Caja con 10 cajas con puntas estériles para micropipeta de 0.2 ml	\$ 2,500.00
SUBTOTAL	\$ 34,000.00

RESUMEN	COSTO
REACTIVO PARA CULTIVO	\$ 18,250.00
MATERIAL PARA CULTIVO	\$ 34,000.00
TOTAL	\$ 52,250.00

16. ANEXOS

16.1 ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo: “Creación de un Banco de Cultivos Primarios de células tumorales humanas derivadas de cáncer de mama en mujeres con obesidad”

Nombre de la Institución: The American British Cowdray Medical Center I.A.P.
Centro Médico ABC – Centro de Cáncer

Dirección: Sur 128, No 143
Consultorio 201 – 202 , Col. Las América
C.P. 01120, Delegación Álvaro Obregón
México D.F.
Teléfono: 52 72 33 45

NATURALEZA Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

Se invita a participar de forma voluntaria en el estudio descriptivo para la creación de un banco de Cultivos Primarios de Células tumorales.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, la decisión sobre la participación en este estudio no afectará la atención médica que reciba. Si usted desea participar en este estudio, debe firmar esta forma para mostrar que acepta que la Dra. Daniela Shveid Gerson use y comparta su información de salud con el equipo de Investigadores que están trabajando en este estudio para corroborar la información recopilada como parte del mismo.

Se le será proporcionada una clave a cada participante para resguardo de confidencialidad de cada paciente.

Antes de decidir si participará o no en el almacenamiento de su muestra, por favor lea con cuidado esta forma. Haga todas las preguntas que sean necesarias para asegurarse de que entiende completamente la información. Usted podrá cambiar de parecer sobre la participación en el estudio y retirar su consentimiento en cualquier momento, y en caso de que se haya utilizado su tejido para establecer una línea celular, este se desechará de manera apropiada.

Actualmente no existen ni cultivos primarios ni líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer de mama y obesidad. Se busca generar cultivos primarios de pacientes con dichas características, estableciendo diferencias entre las líneas celulares de los cánceres de tipo Luminal A y Triple negativo, también llamado basal. Por lo que se requiere establecer un registro clínico de base de datos de mujeres con las características antes mencionadas para así poder crear un perfil epidemiológico y clínico.

Usted será seleccionada de acuerdo al cumplimiento de los Criterios de Inclusión-Exclusión, serán seleccionadas las mujeres premenopáusicas, con cáncer de mama, documentado con el informe de patología, quienes estén programadas a mastectomía o cirugía conservadora que se realizará en este hospital, que hayan dado su consentimiento informado para participar en este estudio.

Se recabarán datos clínicos y se realizará la medición del Índice de Masa Corporal tomando los datos del Peso y Talla de cada participante, se interrogará a la paciente sobre tratamientos previos recibidos, las pacientes quienes tengan o hayan tenido cirugía plástica mamaria quedarán excluidas, o que tengan un proceso de enfermedad inflamatoria en el seno o hayan tenido algún traumatismo en el mismo no podrán participar en el estudio.

Si acepta participar en este estudio, se utilizara una parte de la muestra del tejido extraído al momento de la cirugía, no se obtendrán muestras de sangre adicionales, se realizarán diversos métodos científicos para evaluar diferentes aspectos como estudios genéticos y moleculares que se realizarán al tomar una biopsia del tumor resecado de la pieza quirúrgica ya extirpada por lo que no se incidirá en las pacientes ni sufrirán ningún inconveniente por parte del estudio, la muestra se almacenará por un máximo de 24 horas, posteriormente se realizara una siembra en un medio de cultivo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

¿ Existen riesgos o efectos secundarios?

No, ya que la biopsia se tomará directamente de la pieza quirúrgica por lo que no se incidirá en las pacientes.

¿Existen Beneficios para *mi* por donar una muestra?

Usted no obtendrá un beneficio directo por la biopsia pero esta investigación podrá ayudar a pacientes como usted en un futuro.

¿Cómo protegerán mi privacidad?

Como se mencionó anteriormente se le asignará a cada biopsia un número clave para cada participante.

He leído esta forma de consentimiento informado y he tenido la oportunidad de platicarlo con la Dra. _____ Se me han explicado los riesgos y beneficios y han contestado mis preguntas a mi satisfacción.

Doy mi consentimiento a la Dra. Daniela Shveid Gerson para que recolecte y procese mi información, incluso la información acerca de mi salud.

Acepto libremente participar en este estudio. Comprendo que se requiere de mi confidencialidad con respecto a mi participación en el estudio para mantener una selección aleatoria de pacientes y que el estudio no se reproduzca en un establecimiento alterno. Entiendo que la confidencialidad de los datos adquiridos durante el estudio que puedan identificar a los sujetos que participaron en él estarán protegidos, respetando las reglas de confidencialidad y privacidad en acuerdo con los requerimientos regulatorios aplicables.

Entiendo que me puedo retirar del estudio en cualquier momento y que mi decisión no afectará la atención médica que se me brinde en el futuro. Si decido retirarme del estudio acepto que la información que se haya recolectado acerca de mi hasta el momento de mi retiro se sigan procesando.

Mi firma indica que se me ha otorgado una copia de esta forma de consentimiento informado.

Nombre de la Participante	Firma	Fecha de la Firma (DD- MM- AAAA)

Nombre del Testigo 1	Firma del testigo 1	Fecha de la Firma
Dirección		Parentesco

Nombre del Testigo 2	Firma del testigo 2	Fecha de la Firma
Dirección		Parentesco

Firma del Investigador/Autorizado	Nombre del Investigador	Fecha de la Firma

16.2 ANEXO 2

BASE DE DATOS

PROTOCOLO: CREACIÓN DE UN BANCO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS DERIVADAS DE CÁNCER DE MAMA EN MUJERES CON ÍNDICE DE MASA CORPORAL MAYOR A 30 KG/M2

FECHA:

INICIALES DEL PACIENTE:

FECHA DE NACIMIENTO:

EDAD:

PESO:

TALLA:

IMC:

RAZA: NEGRA ___ BLANCA ___ MESTIZO ___ ASIÁTICO ___

FAMILIARES CON CA DE MAMA SI ___ NO ___
PRIMER GRADO ___ SEGUNDO GRADO ___ TERCER
GRADO ___

EDAD DE PRESENTACIÓN
< 30 ___ 31 – 45 ___ 46 – 59 ___ >60 ___
FAMILIARES CON OTROS TIPOS DE CA SI ___ NO ___
TIPO

TABAQUISMO SI ___ NO ___
CANTIDAD FRECUENCIA
SUSPENDIDO SI ___ NO ___
TIEMPO

ALCOHOLISMO SI ___ NO ___
CANTIDAD FRECUENCIA
SUSPENDIDO SI ___ NO ___
TIEMPO

TOXICOMANÍAS SI ___ NO ___
CANTIDAD FRECUENCIA
SUSPENDIDO SI ___ NO ___
TIEMPO

ENFERMEDADES CRÓNICO – DEGENERATIVAS SI ___ NO ___
TIPO

CÁNCER PREVIO SI ___ NO ___
TIPO
TRATAMIENTO

EDAD MENARCA
 USO DE ANTICONCEPTIVOS SI___ NO___
 TIPO
 FUM
 ACTUALMENTE CON POSIBILIDAD DE EMBARAZO SI___ NO___
 EDAD MENOPAUSIA
 NÚMERO DE EMBARAZOS
 EDAD DEL NACIMIENTO DEL PRIMER HIJO
 AMAMANTÓ SI___ NO___
 ANTECEDENTE DE TRAUMATISMO EN MAMA SI___ NO___
 CIRUGÍA PREVIA EN MAMA SI___ NO___
 BIOPSIA PREVIA EN MAMA SI___ NO___
 PROCESOS INFLAMATORIOS/ INFECCIOSOS ACTUALES EN MAMAS SI___
 NO___

CÁNCER DE MAMA

BIRADS 0 1 2 3 4 5 6
 RESULTADOS BIOPSIA INICIAL

RESULTADO FINAL PATOLOGÍA

FECHA DIAGNÓSTICO
 ESTADIO I II III IV
 SUBTIPO HISTOLÓGICO

TUMOR PRIMARIO
 TAMAÑO
 LOCALIZACIÓN
 T N M
 LOCALIZACIÓN DE GANGLIOS AFECTADOS

LOCALIZACIÓN DE METÁSTASIS

INMUNOFENOTIPO

ER + ___ PR + ___ HER2 + ___
 ER - ___ PR - ___ HER2 - ___

OTROS

TRATAMIENTO HORMONAL SI___ NO___

TIPO

QUIMIOTERAPIA SI___ NO___

TIPO
 NÚMERO DE CICLOS
 RADIOTERAPIA SI___ NO___
 NÚMERO DE SESIONES
 OTRO TRATAMIENTO
 REINCIDENCIA SI___ NO___
 MUTACIÓN BRCA1 SI___ NO___ DESCONOCE___
 MUTACIÓN BRCA2 SI___ NO___ DESCONOCE___

TIPO DE CIRUGÍA PROGRAMADA

MASTECTOMÍA RADICAL___ CUADRANTECTOMÍA___
 LUMPECTOMÍA___ CIRUGÍA CONSERVADORA___
 FECHA
 GANGLIO CENTINELA SI___ NO___
 POSITIVO PARA NEOPLASIA SI___ NO___
 RESECCIÓN GANGLIONAR SI___ NO___
 NÚMERO
 LOCALIZACIÓN
 N0___ N1___ N2___ N3___

CUMPLE CRITERIOS INCLUSIÓN SI___ NO___
 CONSENTIMIENTO INFORMADO SI___
 NO___
 FECHA DE FIRMA

16.3 ANEXO 3

PROCEDIMIENTOS

Expansión celular:

1. Se descongela un vial de células y se coloca en un tubo cónico con 300 ml de medio completo y se centrifuga por 5 minutos a 1200 rpm.
2. Se aspira el sobrenadante y el pellet se coloca en placas Petri, agregándose 10 ml de medio completo para su incubación.
3. Cuando las células tienen > 80% de confluencia será necesaria su expansión.
4. Se aspiró el contenido líquido de la caja Petri.
5. Se agrega 1 ml de tripsina con EDTA y se deja en la incubadora 5 – 10 minutos para que se pudiera desprender todo el contenido celular del fondo de la caja.
6. Se agrega 1 ml de medio completo (RPMI-1640 + 10% SFB) y se vierte el contenido entero en un tubo cónico.
7. Se centrifuga por 5 minutos a 1200 rpm.
8. Finalizando esto se aspira el sobrenadante, se agrega 1 ml de medio completo, resuspendiendo el pellet.
9. Se homogeniza y se divide dependiendo de la densidad celular observada en el microscopio previo a la expansión, típicamente para sembrar en 2 cajas Petri.
10. A cada caja se le agrega 10 ml de medio completo.
11. Se observan al microscopio.

Congelación de viales:

1. Valorar al microscopio las cajas a congelar para poder estimar los viales que serán necesarios.
2. Aspirar el medio de la caja petri y aplicar 2 lavados con PBS para remover detritus celular.
3. Agregar tripsina con EDTA. Esto depende del tamaño de la caja o placa: caja grande 2 ml, caja chica 1 ml, pozo 500 microl.
4. Incubar 5 minutos.
5. Valorar despegado al microscopio y realizar golpeteo para que las células que aún no se han despegado se sepeguen. Si existen fibroblastos en las cajas y estos no se han despegado, no realizar golpeteo.
6. Aspirar tripsinizado con maniobra mecánica, removiendo conglomerados celulares y colocar en tubo cónico de 50 ml.
7. Agregar el equivalente de ml de tripsinizado de medio completo a la caja y volver a hacer aspirado mecánico para poder remover totalidad de células. Agregar a tubo cónico en donde se colocó el aspirado tripsinizado. El índice tripsinizado – medio completo deberá ser 1:1.

8. Centrifugar a 1200 rpm por 5 minutos. Poner contrapeso con equivalente de ml.
9. Ver pelet y aspirar sobrenadante.
10. Agregar al pelet el equivalente de medio de congelación. Por cada 2 cajas Petri será necesario utilizar un vial. Por cada vial se usara 500 microl de medio de congelación.
11. Resuspender.
12. Transferir a viales de congelación y marcarlos debidamente (tipo celular, nombre y fecha).
13. Acomodar en ultracongelador a -70°C .

Aro de clonación:

Instrumentos adicionales: Pipeta estéril seccionada (aro), silicón y pinzas estériles.

1. Se marca el área en donde existen únicamente células tumorales.
2. Se aspira el medio presente en la caja Petri.
3. se aplica PBS 2 ml en dos lavados para poder remover cualquier impureza que podría estar presente en el cultivo, como detritus celulares.
4. Se toma el aro de clonación con las pinzas estériles y se coloca en el silicón, formado una ligera capa del del mismo para posteriormente colocar sobre el área en cuestión.
5. Se fija el aro de clonación sin movilización excesiva dado a que el silicón puede resbalar y deslizarse sobre la placa Petri y entrar en contacto con áreas celulares no deseadas.
6. Dentro del aro de clonación colocar 100 ml de tripsina para despegar a las células.
7. Incubar por 2 minutos y agitar la tripsina con una pipeta.
8. Colocando el contenido en un pozo de 24, previa la colocación de 1 ml de medio completo (RPMI-1640 + 10ml de SFB).
9. Valorar al microscopio.

Inoculación de ratones:

1. Se sostiene el ratón con el primer y tercer dedo, creando una especie de pinza sobre la piel de la espalda, permitiendo una clara visualización de las escápulas.
2. Para disminuir el movimiento del ratón se toma la cola entre el cuarto y quinto dedo de la misma mano que sostiene al ratón, siempre manteniendo ésta a corta proximidad del resto del cuerpo del ratón.
3. Se inserta la aguja con el bisel hacia debajo de manera subcutánea en la región subescapular de ambos lados.
4. Se inyecta el contenido celular preparado.
5. Se debe poder observar una ligera tumoración en el área inyectada.