

## Tesis de Licenciatura

# Estudio citogenético de líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por progestágenos

Fabris, Victoria Teresa

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fabris, Victoria Teresa. (). Estudio citogenético de líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por progestágenos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000660\\_Fabris](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000660_Fabris)

Cita tipo Chicago:

Fabris, Victoria Teresa. "Estudio citogenético de líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por progestágenos". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000660\\_Fabris](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000660_Fabris)

**EXACTAS**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“Estudio citogenético de líneas celulares de adenocarcinomas  
mamarios murinos inducidos por progestágenos”**

AUTORA: VICTORIA TERESA FABRIS

DIRECTORA: Dra. SUSANA MERANI

CO-DIRECTORA: Dra. CLAUDIA LANARI

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN REPRODUCCIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA, UBA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

TESIS DE LICENCIATURA

MARZO 1999

Nº 0660

A mi papá.

## AGRADECIMIENTOS

Este seminario se lo dedico a mi padre, que ya no está a mi lado, pero que sigue dándome fuerzas para seguir adelante y de quién aprendí que nada es imposible.

Un agradecimiento muy especial a:

-Mis directores, Susana y Claudia. A Susana, por los conocimientos que me transmitió, no solo de citogenética, sino también de cómo trabajar en citogenética. A Claudia, por la guía invaluable en la realización de este seminario.

-A Alfredo, por haber confiado en mí y haberme asignado sabiamente este tema.

-A mi familia, que me apoyó en todo momento.

-A mis compañeras de laboratorio del IBYME: Caro, Luisa y Eleo, y de Medicina: María Inés, Mónica, Cecilia, Adela y Vanesa. A todas gracias por estar en cada parte de este seminario, con sus valiosas explicaciones y su apoyo.

-En especial a María Inés, por la ayuda con las fotos y las explicaciones que me dio con tanta paciencia y detalle cuando se las pedí.

-A mis compañeros de la Facu, que no nombro para no olvidarme de alguien, gracias por aquellos días de estudio en la biblio y los nervios previos a cada exámen.

-Al grupo de siempre, por haber compartido horas de clase y por seguir compartiendo de alegría reunidos en alguna casa y también de vacaciones.

La realización de este seminario contó con el apoyo de:

-Fundación Sales

-Laboratorios Gador

-subsidio UBACyT

## ABREVIATURAS

DMBA:	dimetilbenzo(a)antraceno
E <sub>2</sub> :	estradiol
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
FISH:	Hibridización “in situ” fluorescente
HD:	hormono-dependiente
HI:	hormono-independiente
Kd:	constante de disociación
MMTV:	virus de tumor mamario murino
MPA:	acetato de medroxiprogesterona
NMU:	N-nitrosometilurea
p:	brazo corto del cromosoma
PD:	progestágeno-dependiente
Pg:	progesterona
PI:	progestágeno-independiente
q:	brazo largo del cromosoma
RE:	receptor de estrógeno
R-EGF:	receptor de factor de crecimiento epidérmico
RP:	receptor de progesterona
SFB:	suero fetal bovino
TGF $\beta$ :	factor de transformación tipo $\beta$

## RESUMEN

Las líneas celulares son utilizadas en la investigación de los mecanismos de la carcinogénesis y para el desarrollo de nuevas terapias. Constituyen además una valiosa herramienta en el estudio citogenético de adenocarcinomas, dada la dificultad de obtener metafases en cultivos primarios de este tipo de tumores. Los estudios citogenéticos se realizan principalmente caracterizando nuevas líneas, determinando su número modal de cromosomas y marcadores que permitan identificarlas. Estos marcadores se siguen en su evolución analizando el cariotipo y pueden asociarse o no con el comportamiento de las líneas que los poseen. Con el objetivo de identificar marcadores que puedan relacionarse con la biología tumoral se estudiaron, por medio de técnicas de citogenética clásica y de bandeo, tres líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA), dos de ellas derivadas de un tumor hormono-dependiente (HD) y otra derivada de un tumor hormono-independiente (HI). Se obtuvo el número modal, que fue mayor de 60 cromosomas en las tres líneas, y se encontraron alteraciones estructurales y numéricas del cariotipo en todas las metafases analizadas. Las líneas presentaron marcadores identificados y compartidos, como las fusiones céntricas entre los cromosomas 1 y 10 y los cromosomas 2 y 17, y no identificados, también resultado de fusiones, presentes sólo en las líneas derivadas del tumor HD. Otros marcadores no identificados y compartidos por las tres líneas fueron dos cromosomas acrocéntricos grandes, posible resultado de rearreglos no determinados, además de cromosomas acrocéntricos variables en cada línea y metafase. La presencia de cromosomas marcadores compartidos por las tres líneas, derivadas de tumores con un comportamiento biológico diferente pero con una etiopatogenia común, sugiere una relación de éstos con el agente inductor.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
I-Crecimiento neoplásico .....	1
I.I-Alteraciones cromosómicas en cáncer .....	3
I.II-Estudio citogenético en cáncer .....	5
II-Oncogenes, genes supresores y sitios frágiles .....	8
III-Cáncer de mama .....	11
III.I-Alteraciones cromosómicas en cáncer de mama .....	13
III.II-Estudio citogenético en cáncer de mama .....	14
IV-Modelos experimentales .....	16
V-Líneas celulares .....	18
V.I-Estudio citogenético en líneas celulares .....	21
VI-Hipótesis de trabajo .....	22
VII-Objetivos .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
RESULTADOS .....	28
DISCUSIÓN .....	42
CONCLUSIONES .....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49

# INTRODUCCIÓN

## I-Crecimiento neoplásico

El descontrol en la proliferación celular produce tumores o neoplasias, los cuales pueden ser benignos o malignos. Un cáncer es una neoplasia maligna. Es crucial distinguir entre uno y otro para efectuar un tratamiento apropiado. Los tumores malignos se caracterizan porque invaden y destruyen el tejido normal que los rodea, a diferencia de los benignos, aunque éstos pueden llegar a presionar nervios y vasos sanguíneos debido a su crecimiento y ser así una amenaza para la vida del paciente. Los tumores malignos metastatizan a través de vasos sanguíneos y linfáticos hacia otras partes del cuerpo, en cambio los tumores benignos son localizados. Los tumores malignos tienden a mostrar una morfología menos diferenciada que las células normales del tejido del cual se desarrollan, en cambio los tumores benignos poseen una morfología similar al tejido normal. Los tumores malignos, en general, crecen más rápido que los benignos. Criterios citológicos confirman este diagnóstico, entre ellos la morfología de las células cancerosas, que son más variables en tamaño y forma que las células normales, con un núcleo de mayor tamaño e hiperchromático. Se observa además un mayor número de células en mitosis que en el tejido normal, siendo frecuentes las mitosis anormales, con células gigantes con múltiples núcleos (Ruddon, 1995).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental. En Estados Unidos y en países europeos es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y cerca de un millón de nuevos casos ocurren en los Estados Unidos cada año. Las mayores tasas de mortalidad se registran con cáncer de pulmón, próstata, colorectal y de mama (Ruddon, 1995).

Las causas del cáncer no están del todo claras. Factores externos, como la radiación o agentes químicos del medio ambiente, y factores internos, como defectos en el sistema inmune o una predisposición genética, juegan un papel importante. Estos factores pueden actuar juntos iniciando y promoviendo el proceso de carcinogénesis. Los agentes iniciadores producen mutaciones, en general recesivas, que se ponen de manifiesto gracias a los agentes promotores, que hacen que progrese el tumor (Cairns, 1981). Agentes como el benzo(a)pireno o el dimetilbenzo(a)antraceno causan

alteraciones genéticas pero no producen tumor con una sola aplicación del mismo. Estas alteraciones se detectan al producir una mayor incidencia de cáncer cuando las células son expuestas posteriormente al mismo agente (iniciador tumoral) o a otros agentes, conocidos como promotores y que por sí solos no son mutagénicos. Los promotores tumorales más ampliamente estudiados son los ésteres de forbol.

Según los autores, los agentes carcinogénicos pueden dividirse en factores debido a la ocupación, médicos o farmacológicos y factores sociales, donde la mayor proporción de muertes por cáncer se debe al tabaco (Doll y Peto, 1981), un agente social. El principal cáncer relacionado con el hábito de fumar es el cáncer de pulmón. Existe una relación directa entre la cantidad que se fuma con el riesgo de desarrollar cáncer. Se han aislado numerosos carcinógenos de la condensación del humo del cigarrillo, los cuales mostraron ser más bien agentes promotores del cáncer (Cairns, 1981).

Otro factor de importancia en la etiopatogenia del cáncer es la dieta. Los principales cánceres relacionados con este factor son los de estómago, colon, páncreas y de próstata (Kritchevsky, 1991). El cáncer de estómago es el que posee una mayor incidencia en Japón, América del Sur y norte y este de Europa, mientras que los cánceres de colon, páncreas, mama y ovario son más comunes en Estados Unidos y oeste de Europa. El riesgo está relacionado con la forma de cocción de las comidas y la preservación de las mismas. El proceso de ahumado genera compuestos carcinogénicos, como los hidrocarbonados policíclicos, y para la conservación de los alimentos se utilizan nitratos y otros compuestos que resultaron carcinogénicos en animales de experimentación. Ambos procesos están asociados con un aumento del riesgo de cáncer de estómago. El cáncer de colon se encuentra relacionado con una dieta rica en grasas y carne y pobre en fibras (Yeung et al. 1991). Se cree que la fibra elimina del tracto gastrointestinal posibles carcinógenos, disminuyendo de esta forma su contacto con la mucosa gastrointestinal.

Las hormonas juegan un papel importante en el cáncer de mama en las mujeres y sus efectos carcinogénicos se demostraron en animales de laboratorio. Se observó la importancia del tiempo de exposición a las hormonas y que una mayor duración de dicha exposición aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Bradley et al.

1976). Estrógenos y progesterona pueden actuar como promotores en células iniciadas por algún carcinógeno, y aumentar el riesgo en una mujer con propensión a desarrollar cáncer de mama.

En la industria también están presentes agentes carcinogénicos. Esto surge de la asociación de determinados cánceres con el lugar de trabajo de los pacientes. La exposición a las fibras de asbesto está asociada principalmente con el cáncer de pulmón y la exposición al benzeno con la leucemia (Hughes, 1968).

Las radiaciones ultravioletas están asociadas con el cáncer de piel (Cairns, 1981). La radiación UV no penetra profundamente y es absorbida mayormente por la piel, donde actúa como carcinógeno. El cáncer de piel más maligno es el melanoma, altamente metastásico y con poca sobrevida para el paciente.

## I.I-Alteraciones cromosómicas en cáncer

La morfología de los cromosomas mitóticos está determinada por la posición del centrómero o constrictión primaria. Es así como los cromosomas metacéntricos tienen el centrómero en la posición media, los cromosomas submetacéntricos en la posición subterminal y los cromosomas acrocéntricos en la posición terminal del cromosoma. La posición del centrómero determina la longitud de los brazos del cromosoma, brazo corto (p) y brazo largo (q). El conjunto de cromosomas característico de una especie constituye su cariotipo. La técnica de bandeo G es una de las que más se utiliza para identificar cada cromosoma, ya que éstos adquieren un patrón de bandas característico. Estas bandas se designan según convenciones con números, por ejemplo en el humano, o con letras y números, en el ratón.

El cariotipo humano está formado por 46 cromosomas, 22 pares de autosomas y el par XY en el varón y XX en la mujer. Este cariotipo puede verse alterado en determinados síndromes, por ejemplo en el síndrome de Down o el síndrome de Turner, y en enfermedades como el cáncer.

Las anomalías en el cariotipo de las células cancerosas pueden afectar tanto el número como la estructura de los cromosomas. Las alteraciones pueden ser: duplicaciones, delecciones, translocaciones, inversiones y ganancias o pérdidas de

cromosomas individuales o aneuploidía. Se habla de nulisomía cuando faltan los cromosomas de un par, monosomía cuando falta un cromosoma del par, trisomía cuando hay tres elementos de un mismo par, tetrasomía cuando hay cuatro cromosomas de un mismo par, etc.

Se entiende por alteración primaria aquella que inicia la transformación neoplásica y por alteración secundaria aquella que permite el progreso de la enfermedad (Pathak, 1992). Un tumor que presenta un solo cambio cariotípico primario se encuentra en el menor nivel de malignidad y la aparición de alteraciones adicionales está asociada con la progresión del tumor y su malignidad. Los estudios en leucemias indican que parámetros como invasividad, diseminación y respuesta a la terapia están relacionados con el número de cambios cromosómicos (Sandberg et al. 1987).

La delección de la banda 13 del brazo largo del cromosoma 14 en el retinoblastoma y la delección de la banda 13 del brazo corto del cromosoma 11 en el tumor de Wilms son ejemplos de alteraciones cariotípicas primarias y fueron detectadas primero en un cultivo de linfocitos de sangre periférica de niños afectados y nacidos con anomalías congénitas en el desarrollo y retraso mental. Posteriormente se encontraron estas mismas delecciones en células tumorales de chicos fenotípicamente normales. En meningioma, en cambio, primero se encontró la monosomía del cromosoma 22 en las células tumorales y luego se confirmó la presencia de esta anormalidad en el cariotipo de linfocitos de sangre periférica (Pathak, 1992). Otras anomalías primarias, tales como la delección del brazo largo del cromosoma 5 en el cáncer colorectal o la anomalía del brazo corto del cromosoma 3 en el cáncer renal, sólo se observaron en un 0% a un 4% de los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con cáncer de colon y renal (Balsara et al. 1996).

Además de los defectos tempranos en el desarrollo del tumor, ocurren otros cambios no azarosos que permiten la progresión tumoral y confieren ventaja para la proliferación. En la leucemia mieloide crónica, por ejemplo, se adquieren cromosomas Philadelphia extra y cromosomas 8 y 7 en forma de isocromosoma en los pacientes Philadelphia positivos; la delección del brazo largo del cromosoma 6 es frecuente en la leucemia linfocítica aguda y linfomas. En tumores sólidos, es frecuente encontrar regiones homogéneamente teñidas en los cromosomas y fragmentos acéntricos o doble

diminutas. Se encontraron dichas regiones en un 60% de pacientes con carcinomas de colon y en un 30% de pacientes con neuroblastoma. Se estudiaron leucemias y linfomas de pacientes en el momento del diagnóstico y luego de tratamiento y no se encontraron tales evidencias de amplificación génica, debido posiblemente al recambio que sufren las células en estos cánceres, y por lo tanto las regiones amplificadas no son retenidas. La amplificación o duplicación que ocurre en los tumores sólidos durante el transcurso de la enfermedad indicaría que las copias extra del gen son importantes, sobre todo en carcinomas. Estos cambios secundarios en los cromosomas tienden a acumularse cuando el carcinoma se extiende o no responde a la terapia y contribuirían a la capacidad del tumor a invadir y metastatizar (Yunis, 1983).

La aneuploidía está presente durante la progresión de todos los tumores, pero no es específica de ninguno de ellos. Todos los cánceres presentan aneuploidía hacia las últimas etapas de la enfermedad y estaría correlacionada con un fenotipo maligno (Wake et al. 1982).

## I.II-Estudio citogenético en cáncer

Una serie de herramientas permiten el diagnóstico y pronóstico del cáncer y la citogenética es una de ellas. Se la aplica principalmente en el pronóstico de las leucemias, y algunos investigadores, como Sandberg y col. (1987), intentaron su aplicación en el diagnóstico de tumores sólidos de histología poco definida y en la determinación del origen de las metástasis basándose en las alteraciones del cariotipo, ya que tanto éstas como el tumor que les dio origen comparten las mismas aberraciones (Sandberg et al. 1987).

El entendimiento de los defectos cromosómicos en la neoplasia humana se ha desarrollado en tres etapas (Yunis, 1983). La primer etapa se extiende desde 1956 hasta 1970 y el único cáncer con un defecto cromosómico consistente observado fue la leucemia mieloide crónica, en la cual se encontró un cromosoma 22 más pequeño, llamado cromosoma Philadelphia. En la segunda etapa, a partir de 1970, se aplicaron las técnicas de bandeados cromosómicos. Alrededor de 30 desordenes mostraron una anomalía cromosómica, asumiéndose entonces que existía una alteración específica

para cada tipo de cáncer. Numerosos informes en la década de 1970 sobre un gran número de pacientes indicaron la presencia de la translocación entre el cromosoma 9 y el 22 en el 95% de los pacientes con leucemia mieloide crónica; la translocación entre el cromosoma 8 y el 14 en el 100% de los casos de linfoma de Burkitt; la monosomía del cromosoma 22 en el 95% de los casos de meningioma y la translocación entre los cromosomas 15 y 17 en el 41% de los pacientes con leucemia no linfocítica aguda. En la tercera etapa, los estudios mostraron que una misma anormalidad se encontraba asociada a varios cánceres y que éstos no presentan una única alteración en su cariotipo. Es así como la translocación entre los cromosomas 9 y 22 es compartida por las leucemias mieloide crónica, linfocítica aguda y no linfocítica. Se cree que en las tres leucemias se encuentra afectada la misma célula troncal o stem cell, y que defectos adicionales jugarían un papel en la diferenciación del linaje celular que resulta en los diferentes tipos de leucemia (Yunis, 1983).

El estudio citogenético de las células tumorales reveló que la mayoría de las neoplasias presentaban defectos cromosómicos y que éstos estaban en la mayoría de sus células malignas. El estudio molecular en dichos cánceres reveló que se encontraban activos varios oncogenes. Estas anormalidades cromosómicas representarían entonces mecanismos de alteración en la actividad de los proto-oncogenes. En el linfoma de Burkitt, por ejemplo, el oncogen *c-myc* es activado por una translocación recíproca entre el cromosoma 8 y los cromosomas 2, 14 o 22. El oncogen *c-myc* está localizado en el cromosoma 8 y por medio de una translocación es ubicado en un lugar de activa transcripción, cerca de los genes de cadenas liviana, en los cromosomas 2 o 22, y pesada, en el cromosoma 14, de inmunoglobulinas (Adams et al. 1983). La translocación estaría asociada con el rearreglo de las cadenas de inmunoglobulinas que ocurre durante la diferenciación de los linfocitos.

Estudios más recientes utilizan técnicas de bandeo de alta resolución, que permiten ver una mayor cantidad de bandas y detectar pequeños defectos que antes no se observaban. Con estas nuevas técnicas se detectaron defectos cromosómicos en un 97% de los pacientes con leucemia no linfocítica y 90% de los pacientes con leucemia linfocitica aguda. Con las técnicas de bandeo convencionales, solo el 50% de los

pacientes con dichas leucemias presentaban una anormalidad en sus células malignas (Yunis, 1983).

Con el mejoramiento de las técnicas de cultivo y disagregación de las células fue posible el estudio de tumores sólidos, donde se observó la delección de una banda del brazo corto del cromosoma 1 en el 80% de los pacientes con neuroblastoma, la delección en el brazo corto del cromosoma 3 en el 100% de los pacientes estudiados con carcinoma de pulmón, la translocación entre el cromosoma 6 y el 14 en el 100% de los pacientes estudiados con carcinoma de ovario y la delección de una banda en el brazo largo del cromosoma 13 en pacientes con retinoblastoma (Yunis, 1983).

Sin embargo, la mayoría de las publicaciones sobre citogenética sigue siendo sobre leucemias, donde los cambios en el cariotipo son de valor diagnóstico y pronóstico. Esto es posible ya que las células que se estudian presentan solo la alteración primaria. En tumores sólidos, en cambio, el cariotipo es más complejo, donde se observan numerosas alteraciones y es difícil establecer el cambio primario o específico para ese tumor. La complejidad del cariotipo en estos tumores es probable que sea reflejo del estado avanzado del tumor al momento del diagnóstico y del estudio citogenético. Los tumores sólidos con una única alteración son raros y lo que se hace es estudiar un gran número de muestras de tumores en los cuales la aberración definida y recurrente observada se toma como el evento primario (Sandberg et al. 1987).

La dificultad en el estudio de tumores sólidos reside en la necesidad de cultivar las células del tumor, lo cual no siempre es exitoso. Además, la morfología de los cromosomas no siempre es buena, al igual que su bandeados. Muchos laboratorios investigan en el mejoramiento de las técnicas de cultivo para realizar citogenética (Pandis et al. 1992). El mayor éxito se obtiene con los sarcomas, debido a su mayor índice mitótico, la facilidad de cultivo por períodos cortos y largos (Sandberg et al. 1987) y según la vía de inoculación en el ratón, producen tumores sólidos o ascíticos (Bianchi et al. 1977), siendo en estos últimos más fácil obtener su cariotipo. La dificultad del estudio citogenético de los carcinomas se ve reflejada en el informe realizado por Mitelman en 1983, el cual detalla todas las aberraciones cromosómicas en cáncer

humano publicadas en la literatura, y donde menos del 10% del total de los estudios citogenéticos de cáncer humano se hizo sobre carcinomas.

Con el tiempo, las técnicas van mejorando y cada vez son más los tumores estudiados con técnicas de citogenética y a los que se les encuentra una alteración específica. Es así como se realizaron numerosos estudios en numerosos tumores y se construyeron tablas de alteraciones cromosómicas para cada tumor, tanto de tumores sólidos como de leucemias (Mitelman, 1983).

## **II-Oncogenes, genes supresores y sitios frágiles**

El descontrol en la división celular que se produce durante la carcinogénesis se debe en muchos casos a la activación de proto-oncogenes o a la pérdida de función de genes supresores de tumores. El mecanismo más frecuente de activación de los oncogenes es por translocaciones. Por ejemplo, en la leucemia mieloide crónica la translocación entre los cromosomas 9 y 22 activa al oncogen *abl*, mientras que en el linfoma de Burkitt la translocación entre los cromosomas 8 y 14 activa al gen *c-myc*. La pérdida de los genes supresores de tumores es, en general, por delecciones de fragmentos cromosómicos. Por ejemplo, en el retinoblastoma ocurre una delección de la banda 14 del brazo largo del cromosoma 13 donde se encuentra el gen *rb*, y en el tumor de Wilms se produce la delección de la banda 13 del brazo corto del cromosoma 11, donde se ubicó al gen *wt* (Pathak, 1992).

Los oncogenes se encuentran conservados en secuencia entre las especies, de los cuales el más estudiado es el *c-myc*, que fue encontrado en un mielocitoma de células B de ave y por hibridización "in situ" fue localizado en la banda q24 del cromosoma 8 humano. Este oncogen se encuentra involucrado en plasmacitomas de ratón y rata y en el linfoma de Burkitt. En ratón, el segmento terminal del cromosoma 15, que lleva al oncogen *c-myc*, rearregla con el cromosoma 12 en la región de switch de la cadena de inmunoglobulina, mecanismo similar al que ocurre en el linfoma de Burkitt. El oncogen *c-abl* (localizado en el cromosoma 9) está involucrado en la

leucemia mieloide crónica (De Kleim et al. 1982), y la translocación entre los cromosomas 9 y 22 produce una proteína de fusión con el producto del gen bcr (en el cromosoma 22), que lleva a la transformación tumoral.

Otros oncogenes estudiados son *c-mos*, en la banda del cromosoma 8 que está involucrada en la translocación con el cromosoma 21 en la leucemia no linfocítica aguda de tipo M2. El oncogen *c-myb* mapea en el brazo largo del cromosoma 6, en la banda que transloca con el cromosoma 14 en el carcinoma de ovario (Yunis, 1983).

Además de la activación por translocación, los oncogenes pueden encontrarse amplificados en muchas neoplasias, como ocurre con el oncogen erbB. Este gen fue identificado primero en el virus de la eritroblastosis aviaria y codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico. La amplificación resulta en la sobreexpresión del producto normal del proto-oncogen y que en presencia del factor de crecimiento epidérmico, conduciría a la transformación neoplásica. Un gen relacionado, pero que codifica una proteína diferente, es el erbB-2, y se encuentra amplificado principalmente en cáncer de mama y ovario. El gen erbB-2 es el homólogo humano del gen neu, que fue inicialmente detectado como un oncogen activado en neuroblastoma de rata (Cooper, 1990).

La inactivación, pérdida o represión de los genes supresores de tumores conduce a la transformación celular o conversión neoplásica, y ya fueron identificados cerca de una docena de estos genes. Los primeros en descubrirse fueron los genes asociados a los cánceres heredables, como el retinoblastoma y el tumor de Wilms. En estos casos, la mutación de los genes en la línea germinal está asociada con la predisposición heredada a dichos tumores.

Los genes supresores cumplen con diversas funciones en la regulación normal del ciclo celular, en el control y modulación de las señales de transcripción y reparación del ADN. El gen RB1 es una fosfoproteína nuclear, cuyo estado de fosforilación es crítico en la regulación del ciclo celular. Se expresa en todas las células y está ausente en las células de retinoblastoma. Este gen se pierde por delección de la banda cromosómica donde se encuentra y permite el desarrollo de la enfermedad. Se lo encontró mutado en otros cánceres, como los de pulmón, vejiga, próstata, mama, pero se trataría de mutaciones somáticas y no germinales (Hinds et al. 1994).

El gen WT, asociado al tumor de Wilms o nefroblastoma, codifica para una proteína con dedos de zinc, que se encuentra mayormente en el ovario, testículo, útero y riñón, y cumpliría un papel en el desarrollo urogenital. Su función sería la regulación de la transcripción, reprimiendo la transcripción de genes como c-myc y bcl-2. La pérdida del gen en la línea germinal está asociado con una predisposición a tumores con anomalías del sistema urogenital (Hinds et al. 1994).

En numerosos tumores se encontró mutado al gen p53, principalmente en cáncer de pulmón, colorectal y de mama. El gen p53 detiene la replicación ante un daño del ADN y conduce a la apoptosis si éste no se repara. Cuando está mutado, la célula continúa dividiéndose y pasando el daño a las células hijas. De esta forma se acumulan mutaciones que dan lugar a un estado cada vez más maligno (Lane, 1992).

En cáncer de mama y ovario los genes supresores involucrados son los genes de susceptibilidad BRCA1 y BRCA2. El gen BRCA1 fue clonado en 1994, y codifica para una proteína nuclear que puede tener función regulatoria en las células del epitelio mamario. Se observó que mutaciones en el gen en la línea germinal dan lugar a una proteína truncada, de localización citoplasmática, que fue encontrada en líneas de cáncer de mama y ovario y muestras de células de derrames pleurales. Se observó también que en el 50 % de los tumores mamarios y en el 65% de los cánceres de ovario se perdió un alelo del gen BRCA1 por delección somática (Teich, 1997). La expresión de BRCA2 está coordinada con la de BRCA1 durante la proliferación y diferenciación de las células epiteliales mamarias, y mutaciones en este gen también constituyen un riesgo para el cáncer de mama (López-Otín y Diamandis, 1998).

La mayoría de los proto-oncogenes y genes supresores involucrados en cáncer se encontraron localizados en sitios rearreglados. Estos sitios son lugares frágiles en los cromosomas, que pueden ser heredados o constitucionales y que se ponen de manifiesto con bajas concentraciones de ácido fólico y timidina (precursores del DNA). La falta de ácido fólico y timidina pone en evidencia 13 de los 16 sitios frágiles heredables conocidos, así como también la aparición de rupturas cromosómicas espontáneas o sitios frágiles constitutivos. Se encontró que 20 de los 51 sitios frágiles constitutivos y 6 de los 16 sitios frágiles heredables están localizados cerca o en los puntos de ruptura de 26 de las 31 alteraciones cromosómicas estructurales específicas

conocidas en leucemias, linfomas y tumores sólidos (Yunis y Soreng, 1984). Estos lugares de posible ruptura predisponen al individuo a sufrir determinadas malignidades debido a una mayor susceptibilidad de rearreglos que ocurrán en sus cromosomas.

Los cromosomas 1, 2, 3, 6, 7 y 9 presentan sitios frágiles constitucionales, es decir, que se encuentran en la población en general y son lugares de ruptura en delecciones relacionadas con la exposición a diferentes agentes carcinógenos. Por ejemplo, la banda 31 del brazo largo del cromosoma 7 es un sitio frágil constitucional y está involucrada en una delección en pacientes con leucemia no linfocítica aguda expuestos a radiación o pesticidas (Yunis, 1983).

### **III-Cáncer de mama**

El cáncer de mama es el tumor maligno más común entre las mujeres y se estima que ocurren cerca de 135.000 nuevos casos en la Comunidad Europea (Moller et al. 1990) y cerca de 200.000 son diagnosticados cada año en los Estados Unidos (López-Otín y Diamandis, 1998). Las tasas de incidencia aumentaron cerca del 2% por año desde 1980 (Hankey, 1992). Esto parece ser reflejo de un diagnóstico más temprano, donde los tumores se detectan cada vez más pequeños y en estadios más tempranos de la enfermedad. Sin embargo las tasas de mortalidad no cambiaron drásticamente en los últimos años, lo cual se deba a la recurrencia tardía que tiene este tipo de cáncer.

Los factores de riesgo para el cáncer de mama incluyen la edad, mayor de 60 años, una menarca temprana y menopausia tardía, el primer hijo después de los 30 años, nuliparidad, antecedentes familiares de cáncer de mama, dieta rica en grasas, obesidad y altas dosis de radiación en el tórax antes de los 35 años (Kelsey y Berkowitz, 1988).

Además, los genes de susceptibilidad BRCA1 y BRCA2 confieren un alto riesgo de padecer cáncer de mama y de ovario. Estos genes están relacionados con la

aparición del cáncer de mama a una edad temprana y la pérdida alélica de estos genes fue asociada con tumores pobemente diferenciados (Lo et al. 1998).

El cáncer de mama se desarrolla también en mujeres que no poseen estos factores conocidos, lo que indica la presencia de múltiples causas aún no descubiertas (Kelsey y Berkowitz, 1988).

Los factores antes mencionados pueden interferir con el control del crecimiento de la glándula mamaria y conducir a la desregulación de su normal desarrollo (Callahan, 1996). La patogénesis del cáncer de mama está ligada a las hormonas esteroideas sexuales endógenas, cuyos niveles en suero pueden ser modificados por dichos factores, como la dieta (López-Otín y Diamandis, 1998).

Los criterios para la estratificación del cáncer de mama incluyen parámetros anatómo-patológicos tales como tamaño tumoral, clasificación histológica y compromiso de ganglios linfáticos; parámetros citológicos como grado nuclear y parámetros biológicos, como edad del paciente, estado de receptores hormonales y amplificación de oncogenes (Afify et al. 1996). Algunos de estos criterios pueden ser de significado pronóstico, como por ejemplo la amplificación del gen c-erbB-2.

Con respecto al tratamiento del cáncer de mama, éste puede ser la cirugía (mastectomía), la radioterapia, la quimioterapia o la hormono-terapia. En muchos casos se combina la cirugía con la quimioterapia u hormono-terapia. La mastectomía es parcial si el cáncer está localizado, o total si éste se encuentra extendido. En los últimos años se han realizado mastectomías parciales junto con radioterapia, donde los pacientes mostraron una supervivencia igual a los que habían recibido una mastectomía total (Pierce y Harris, 1991). La quimioterapia se aplica, en general, a pacientes con metástasis en ganglios linfáticos y las drogas antiestrógenos se combinan con la quimioterapia para el tratamiento de tumores que poseen receptores de estrógeno y progesterona en mujeres post-menopáusicas (Fisher, 1991).

### III.I-Alteraciones cromosómicas en cáncer de mama

Los primeros análisis citogenéticos realizados en células de cáncer de mama en cultivo mostraron la complejidad de las alteraciones somáticas que ocurren durante la progresión del tumor. Las alteraciones observadas incluyen aneuploidía y rearreglos que afectan a varios cromosomas, como translocaciones del brazo largo del cromosoma 1; delecciones y translocaciones del brazo largo del cromosoma 6; translocaciones, inversiones pericentroméricas e isocromosomas del brazo corto del cromosoma 7 y translocaciones del brazo largo del cromosoma 11 (Trent, 1985). Son varios los autores que involucran al cromosoma 1 con el cáncer de mama (Gebhart et al. 1986; Mitchell et al. 1990; Pathak, 1992), y se lo observó alterado en líneas derivadas de derrames, en células tumorales y en cultivo de linfocitos de pacientes con cáncer de mama familiar y esporádico, pero en bajo porcentaje (Pathak, 1992; Balsara et al. 1996). Sin embargo, no se le asoció aún una alteración específica.

Utilizando técnicas de hibridización genómica se encontraron secuencias de DNA amplificadas, con un aumento en el número de copias, que corresponden a la amplificación de proto-oncogenes conocidos y posibles otros desconocidos. La amplificación del oncogen c-erbB-2 está asociada con un peor pronóstico de la enfermedad, como mayor tamaño tumoral, ausencia de receptores hormonales y aneuploidía (Xing et al. 1996). La pérdida de heterocigosis es otra alteración frecuente en cáncer de mama y ocurre como consecuencia de delecciones intersticiales, pérdida de cromosomas o eventos de recombinación mitótica aberrante. Estas alteraciones significan en la pérdida de uno de los alelos de los genes supresores y revelan mutaciones recesivas del otro alelo, perdiéndose de esta manera la supresión normal de la proliferación celular (Callahan, 1996). En cáncer de mama se encontraron 5 regiones de pérdida de alelo en la banda 22-24 del brazo largo del cromosoma 11 y que involucra a varios genes supresores, como el de ataxia telangiectasia; 5 regiones de pérdida de heterocigosis, una dentro del área del gen BRCA1, en el cromosoma 17 (Kerangueven et al. 1997) y en el cromosoma 13, que involucran al gen BRCA2 pero no al RB1 (Kerangueven et al. 1995) y regiones de pérdida de heterocigosis en el brazo corto del cromosoma 11 que involucran al locus de globina y c-H-ras-1 (Ali et al. 1987).

El cromosoma 11, además, presenta una zona de fragilidad heredable en el brazo corto (Ali et al. 1987).

Se observó también la trisomía del cromosoma 8 en cáncer de mama y se la asoció con una mayor incidencia de carcinoma invasivo, con ausencia de expresión del receptor de estrógeno, expresión de c-erbB-2 y con alta tasa de proliferación. La trisomía del cromosoma 8 es frecuente también en leucemias, linfomas, cáncer de próstata, carcinoma de ovario, tumor de glándula salivar y melanoma maligno (Afify et al. 1996).

### **III.II-Estudio citogenético en cáncer de mama**

Por tratarse de un tumor sólido, el estudio citogenético en cáncer de mama está limitado por una serie de factores, dificultades técnicas en el establecimiento de los cultivos, contaminación, sobrecrecimiento de células del estroma, escasas metafases, bandeo G poco satisfactorio y complejidad de los cariotipos obtenidos. La información en la mayoría de los casos proviene de tumores muy avanzados o de efusiones, donde los cariotipos presentan marcadores no identificables. Además, el análisis de células en cultivo tiene el inconveniente de la artificialidad del sistema "in vitro", es decir, poder reconocer la alteración propia del tumor de la alteración surgida como adaptación al cultivo. En algunos casos, por este motivo se estudian núcleos en interfase por medio de la hibridización "in situ" fluorescente o FISH. Esta técnica es usada para la identificación de un cromosoma en particular o para evidenciar la amplificación de oncogenes cuya secuencia se conoce. No necesita del cultivo ni tener metafases, ya que se puede realizar sobre cortes de tejido o tejido disgregado (Afify et al. 1996).

Desde 1950, el cáncer de mama ha sido estudiado por medio de técnicas de citogenética, esencialmente con tinciones con Giemsa y otros colorantes básicos, como la orceína. Estos reportes informan principalmente el número anormal de cromosomas (Steenis, 1966), con metafases poliploides y aneuploides en su mayoría, y la presencia de marcadores cromosómicos. Se observó un mayor número de cromosomas de los pares 6 a 12, posiblemente por la formación de cromosomas submetacéntricos luego de translocaciones recíprocas entre los cromosomas

acrocéntricos, cuyo número era menor que el normal. Estas alteraciones se observaron también cuando se analizaron las metafases con técnicas de bandeo, a partir de 1970.

A mediados de 1980 Gebhart y col. (1986) realizaron estudios citogenéticos en 50 carcinomas de mama y 61 líquidos de derrames de 46 pacientes. Se analizaron cambios estructurales y numéricos, con especial interés en dobles diminutas y regiones homogéneamente teñidas. Las muestras revelaron poliploidía y aneuploidía de varios cromosomas y se indicó que el alto número de cromosomas coincidía con el aumento de la malignidad del tumor. Realizó cultivos de las muestras e intentó seguir el cariotipo del cultivo "in vitro" para ver su posible evolución "in vivo". Por medio de bandas G se encontraron marcadores formados más frecuentemente por la región pericentromérica del cromosoma 1 (13p12q), con la presencia de isocromosomas de los brazos largo y corto de dicho cromosoma. También se encontraron otros segmentos de otros cromosomas involucrados, marcadores formados por translocaciones y delecciones de dichas bandas. Se encontraron además marcadores estables, que se observaron en el tumor y en el cultivo de sus células, en todos los pasajes del tumor cultivado por 5 años, y que fueron la translocación entre los cromosomas 4 y 12 y un isocromosoma del brazo largo del cromosoma 1. En el 50% de los tumores se detectaron doble diminutas, que variaban en número y tamaño, pero no se les encontró correlación con otros parámetros como metástasis (Gebhart et al. 1986).

Los casos analizados de cáncer de mama a partir de bandeo muestran alteraciones estructurales y numéricas del cromosoma 1, el segmento distal del brazo largo en trisomía o translocaciones. Sin embargo, no hay especificidad en el punto de ruptura o en el compañero de translocación, lo que hace pensar que el cambio sería secundario, relacionado con la progresión del tumor. Otros cromosomas involucrados frecuentemente en cáncer de mama son los cromosomas 6, 7 y 11. Las alteraciones en el cromosoma 11 poseen puntos de ruptura variable, con lo cual serían también alteraciones secundarias e importantes en la progresión del tumor (Trent, 1985).

Se han localizado varios oncogenes en dichos cromosomas. En el cromosoma 1 mapean los oncogenes c-Blym-1, c-N-ras y c-sk, en el brazo largo del cromosoma 6 se ubicó al oncogen c-myb, en el brazo corto del cromosoma 7 al gen c-erbB y en el cromosoma 11 mapearon los genes c-H-ras-1 (en el brazo corto) y c-ets (en el brazo

largo). Sin embargo existe variabilidad en los puntos de ruptura y no habría una asociación entre las alteraciones producidas y la activación de estos oncogenes, como si existe en leucemias y linfomas (Trent, 1985). Sí es clara la amplificación de oncogenes en cáncer de mama, como el erbB-2, evidenciada recientemente con técnicas de hibridización *in situ* (FISH) (Xing et al. 1996).

#### **IV-Modelos experimentales**

Mucho de lo que se sabe sobre el cáncer se basa en el estudio de la carcinogénesis en animales. El método de estudio más usado es la exposición del animal a agentes físicos o químicos que dañen el DNA y produzcan mutaciones que lleven a la transformación neoplásica (Au et al. 1977). El proceso no es simple y por lo general se requieren varias dosis en el animal para producirle tumor. Otro modelo de estudio es la infección del animal con ciertos virus oncogénicos (Kano-Tanaka y Tanaka, 1982), o la producción de cáncer por transplante de tejido en el animal, en sitios que permitan un crecimiento no restringido. Los modelos experimentales pueden basarse también en tumores espontáneos que surgen en el animal (Cairns, 1981).

En cáncer de mama, uno de los modelos usados es el modelo de inducción por el virus del tumor mamario murino (mouse mammary tumor virus, MMTV). Son varias las cepas de ratón con alta incidencia de tumores mamarios y que transmiten a su descendencia el virus MMTV. El virus actúa como mutágeno por inserción, que causa la desregulación de la expresión de los genes adyacentes, llamados loci *Int*. La activación de la expresión de estos genes es consecuencia del efecto potenciador de las secuencias dentro de las repeticiones terminales largas (long terminal repeat, LTR) del genoma proviral integrado. El modelo permite estudiar los genes mutados involucrados en cada etapa del desarrollo tumoral usando el genoma del virus como sonda. De esta manera se identificaron varios loci *Int* en cepas de ratón infectadas con MMTV. Los genes Wnt pertenecen a la familia de genes relacionados con los genes de polaridad de segmento de *Drosophila* (wingless, wg), mientras que los genes Fgf son miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Ambos se expresan durante el desarrollo embrionario y en la diferenciación de la glándula mamaria. Se estudió la

participación de los genes Wnt1 y Fgf3 en cáncer de mama en ratones transgénicos, en los cuales dichos genes estaban activados por las secuencias LTR del virus MMTV (Callahan, 1996). Sin embargo, son pocas las evidencias de la presencia de secuencias de RNA viral en cáncer de mama humano.

Los modelos que más se ajustan al humano y de mayor importancia son los inducidos por hormonas y carcinógenos químicos. Estos modelos poseen receptores hormonales y son de utilidad para el estudio de la regulación hormonal en cáncer de mama. Los modelos de inducción por carcinógenos químicos son utilizados para el estudio de los eventos tempranos en el proceso de carcinogénesis y para el estudio de su progresión. Los carcinógenos más usados son el dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA), que requiere de la activación hepática para actuar, y el N-nitrosometilurea (NMU), carcinógeno directo (Clarke, 1996).

Los modelos más recientes utilizan ratones transgénicos para determinados genes humanos, como oncogenes, y estudiar de esta forma su participación en cáncer. Uno de los modelos es el ratón transgénico neu, que sobreexpresa el gen c-erbB-2/neu (Muller et al. 1988), cuya amplificación es frecuente en cáncer de mama humano y está asociado con un mal pronóstico (Dougall et al. 1994). El modelo permite investigar el papel de este oncogen en el desarrollo del adenocarcinoma y estudiar nuevas terapias.

En nuestro laboratorio de Carcinogénesis Hormonal se han desarrollado una serie de modelos experimentales de inducción de adenocarcinomas mamarios en ratones hembra BALB/c mediante la administración de acetato de medroxiprogesterona (MPA) o progesterona (Pg). Los tumores inducidos con MPA (Lanari et al. 1986; Molinolo et al. 1987) son en su mayoría carcinomas ductales, que expresan elevados niveles de receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RP) y niveles no detectables de receptores de factores de crecimiento epidérmico (R-EGF). En pasajes singenéticos, tienen un comportamiento dependiente de progestágeno (PD) (Kordon et al. 1993). Estos tumores mantenidos por pasajes seriados en ratones tratados con MPA dan metástasis en pulmón y en ganglio axilar homolateral. Por pasajes seriados en ratones sin tratar se seleccionaron variantes capaces de crecer sin el aporte exógeno de progestágenos y se los denominó progestágeno-independientes (PI).

Se analizaron las líneas PD en comparación con sus variantes PI, sin encontrar diferencias en el Kd y el número de receptores de progesterona, como tampoco en su histología. Estos tumores retrogradan con el tratamiento con antiprogestágenos, lo cual implica que, tanto los tumores PD como sus variantes PI, estarían utilizando la vía del receptor de progesterona para crecer (Lanari et al. 1997).

Los modelos pueden estudiarse "in vivo", manteniendo el tumor en el animal y analizar la interacción entre el tumor y el huesped, e "in vitro", donde las células del tumor son cultivadas y observar la acción directa de una droga sobre las mismas. La elección entre uno u otro tipo de estudio dependerá del objetivo de la investigación. Del cultivo de células tumorales humanas y animales se derivaron una serie de líneas celulares que también son utilizadas como herramientas para el estudio del cáncer.

## V-Líneas celulares

El número de replicaciones de las células diploides normales en cultivo es finito, debido al acortamiento de los telómeros luego de cada división mitótica. Se sabe que cultivos linfoides de tejido normal de varias especies no viven más de 12 o 14 días (Delpierre et al. 1975). Cuando las células en cultivo son más viejas y alcanzan los últimos pasajes, aumentan las anormalidades que se producen en sus cromosomas (Hughes, 1968). Las células en cultivo sufren cambios que las asemejan a células cancerosas. Este proceso de transformación conduce a la alteración de ciertas propiedades de las células, se produce de esta forma un aumento en el número de cromosomas, hay una pérdida de la dependencia de los factores de crecimiento del suero y las células se vuelven inmortales. Estas células pueden originar un tumor cuando son colocadas en un animal, convirtiéndose en células tumorigénicas. La transformación de las células "in vitro" puede ocurrir en forma espontánea o por agentes físicos, químicos y virus. La propagación continua de muchas de las líneas celulares se debe a virus asociados a las mismas (Theilen et al. 1969). Los virus producen alteraciones en el cariotipo de las células en cultivo, que conducen a su transformación (Tyrkus et al. 1983).

Son de especial interés las líneas celulares que se mantienen diploides, ya que esto es una garantía de que no se encuentran infectadas con virus y por lo tanto no están transformadas. Estas líneas son utilizadas para la obtención de vacunas virales. Las líneas no diploides también pueden ser utilizadas en virología, ya que algunas de ellas son sensibles a determinados virus. Una de estas líneas es la Vero, establecida a partir de células de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) en 1963 por Yasumura y Kawakita, y utilizada en nuestro país para el estudio de los Arenavirus (De Salum et al. 1978).

En la investigación oncológica son de gran importancia las líneas celulares obtenidas a partir de tumores humanos y animales, así como también las que resultan de la infección de células con virus oncogénicos, como el virus del sarcoma de Rous (Tyrkus et al. 1983). Las líneas celulares permiten desarrollar modelos para el estudio del crecimiento tumoral, para probar nuevas drogas y para el desarrollo de nuevas terapias (McBain et al. 1984). Es el caso de una línea de carcinoma sarcomatoide mamario murina, desarrollada por Alonso et al. en 1996, derivada de la línea M3 (Bal et al. 1983), la cual es útil, según los autores, para el estudio de agentes antiinvasivos, antiangiogénicos y antimetastásicos (Alonso et al. 1996).

Los factores a tener en cuenta en la obtención de una línea son el sustrato de adhesión de las células, el medio de cultivo y los nutrientes que éstas requieren, la necesidad de hormonas, el momento del primer repique, la densidad de siembra, el tipo de disgregación mecánica o enzimática y la necesidad de separar las células epiteliales de los fibroblastos (Engel y Young, 1978).

Existen varias dificultades técnicas en el cultivo de adenocarcinomas y por lo tanto en la obtención de líneas a partir de éstos. El número de células de las muestras de tumor no es grande y además están junto con células estromales y matriz, donde los fibroblastos se replican más que las células epiteliales tumorales (McCallum y Lowther, 1996). Esto también sucede al intentar establecer líneas de otros carcinomas, como por ejemplo a partir de cáncer colorectal (McBain et al. 1984). Con respecto al cáncer de mama fueron más exitosas las líneas celulares obtenidas a partir de derrames malignos y no del tumor sólido, debido a que en un derrame las células son más numerosas y se encuentran disgregadas (Gazdar et al. 1998).

El primer reporte del establecimiento exitoso de una línea celular de cáncer de mama fue en 1958, realizado por Lasfargues y Ozzello. Se trata de la línea celular BT-20 (Lasfargues et al. 1958), obtenida a partir de un tumor original. Posteriormente fueron derivadas numerosas líneas a partir de tumores y derrames pleurales y ascíticos. La línea de cáncer de mama más estudiada es la MCF-7, derivada de un derrame pleural maligno por Soule y col. en 1973. Se caracterizó su crecimiento, el estado de receptores, la morfología, el fenotipo aloenzimático y el cariotipo. Otras líneas celulares de cáncer de mama estudiadas por diversos grupos son ZR-75 (Engel et al. 1978) y T-47D (Keydar et al. 1979), ambas obtenidas a partir de derrames pleurales. Las tres líneas expresan receptores hormonales y su crecimiento es regulado por hormonas.

La línea de adenocarcinoma mamario derivada del ratón transgénico neu también posee receptores hormonales, siendo útil en la evaluación de la terapia hormonal. Además, expresa altos niveles del oncogen neu, pudiéndose utilizar en estudios sobre el papel de dicho oncogen en el mantenimiento del fenotipo transformado (Sacco et al. 1998).

Se han obtenido líneas celulares de cáncer de mama de pacientes con predisposición genética y una historia familiar de cáncer de mama y de colon. Si bien las líneas no poseen receptores hormonales, serían de utilidad para el estudio de alteraciones en genes involucrados, como el BRCA1 (Gazdar et al. 1998).

Recientemente, en nuestro laboratorio se lograron obtener líneas celulares a partir de los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA. Se establecieron cinco líneas a partir de un tumor PD (C4-HD) y una línea a partir de un tumor PI (C7-HI). Como parte de su caracterización, se comenzaron a estudiar los receptores hormonales, la respuesta hormonal "in vivo" e "in vitro", la capacidad metastásica y tumorigénica, así como también el cariotipo de cada una de las líneas.

## V.I-Estudio citogenético en líneas celulares

Para obtener resultados válidos se requiere un control de las líneas celulares, por lo que es necesario conocer varios parámetros de las mismas, incluyendo su cariotipo. El análisis citogenético es uno de los controles que se realiza sobre las líneas celulares. La transformación celular “*in vitro*” está acompañada por cambios en el cariotipo. Existe variación en el número modal a lo largo de los pasajes, pero se conservan cromosomas llamados marcadores, que presentan una morfología diferente al resto de los cromosomas del complemento y permiten diferenciar las líneas (De Salum et al. 1978). Es frecuente también el hallazgo de fragmentación de cromosomas y ganancia y pérdida de cromosomas en las líneas analizadas. Se observa un reemplazo progresivo de las células diploides por las aneuploides, mejor adaptadas a las condiciones de cultivo “*in vitro*” (Bianchi et al. 1971; De Salum et al. 1971).

La línea MCF-7 y sublíneas derivadas fueron estudiadas con técnicas de citogenética desde 1975 hasta 1981. Todas resultaron poliploides, con un rango en el número de cromosomas de 48 a 89, y con cromosomas marcadores compartidos formados por delecciones y translocaciones que involucran a varios cromosomas (Whang-Peng et al. 1983).

Otras líneas estudiadas fueron las obtenidas de cáncer de mama de pacientes con predisposición genética, observándose poliploidía y aneuploidía, con rearreglos de los cromosomas 1, 3, 9, 11, 13 y 17 y presencia de doble diminutas en tres de las líneas (Gazdar et al. 1998).

El estudio citogenético en líneas celulares no siempre es detallado y sólo se muestra su número modal. Por ejemplo, la línea derivada de adenocarcinoma mamario del ratón transgénico neu presentó un número modal de 80 cromosomas (Sacco et al. 1998), y la línea derivada del adenocarcinoma mamario murino M3 mostró un número modal de 57 cromosomas (Alonso et al. 1996).

Es posible asociar las alteraciones cromosómicas observadas en las líneas con la tumorigenidad y metástasis que producen “*in vivo*”. Las líneas tumorigénicas derivadas de carcinoma de vejiga inducido por NMU en ratas presentaron la pérdida del

brazo corto del cromosoma 3, no así las líneas derivadas del mismo carcinoma pero que no resultaron tumorigénicas (Debiec-Rychter et al. 1991).

Gebhart y col. (1986) resaltaron la importancia del estudio citogenético en cultivos primarios, ya que es más real que el estudio en líneas celulares. Sin embargo, existen inconvenientes, no solo la dificultad de realizar el cultivo de las células del tumor, sino también el bajo índice mitótico que presenta. Por este motivo, el uso de líneas celulares es de gran valor para el estudio citogenético y permite además seguir la evolución del cariotipo en los sucesivos pasajes. Este tipo de estudios fue realizado en una línea endotelial cerebral de rata transformada "in vitro" con el virus de sarcoma de Rous, en la cual se siguió la aparición de los distintos marcadores (Tyrkus et al. 1983).

## VI-HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las líneas celulares derivadas de tumores mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) de crecimiento hormono-dependiente o independiente, poseen alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas, con marcadores cromosómicos específicos para cada una de ellas relacionadas con el tumor que les dio origen.

## **VII-OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Análisis del cariotipo de las líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos para identificar marcadores resultantes de rearreglos cromosómicos y asociarlos con el comportamiento biológico de las mismas.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtención del número cromosómico modal de las líneas celulares C4L1, C4L2 y C7L1.
- Obtención de los cariotipos de banda G y banda C de dichas líneas celulares.
- Identificación de posibles marcadores para cada línea celular.
- Comparación de las tres líneas celulares con respecto a sus marcadores y su relación con otros parámetros de las líneas, como hormono-dependencia o capacidad metastásica.

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

### **Medios y soluciones utilizadas:**

#### **Medio de cultivo:**

Se utilizó DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle medium: Ham's F 12, 1:1) (Sigma) sin rojo fenol más sulfato de gentamicina comercial en concentración de 50 mg/l. Se preparó según las indicaciones del fabricante con agua bidestilada.

SFB (Gen S.A) decomplementado: calentado a 56°C durante treinta minutos.

#### **PBS 10X:**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (fosfato dibásico de sodio dodecahidrato, Baker): 30,06 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (fosfato monobásico de sodio monohidratado, Anedra): 2,56 g

NaCl (cloruro de sodio, Baker): 87,6 g

Se lleva a un litro con agua deionizada o bidestilada.

Para trabajar se hace una dilución 1:10 con agua bidestilada (PBS 1X).

#### **Solución de tripsina/EDTA usada en cultivo:**

Tripsina (Gibco BRL) 0,25 % más EDTA (Sigma) 0,2% en PBS (sin Ca++ ni Mg++).

#### **SSC 2X:**

NaCl (cloruro de sodio, Anedra): 17,53 g

Citrato de sodio (Baker): 8,82 g

En un litro de agua deionizada.

### **Líneas celulares:**

Líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos:

-C4L1 y C4L2, derivadas del mismo tumor PD (C4-HD).

-C7L1, derivada de tumor PI (C7-HI).

Los tumores C4-HD y C7-HI se originaron en ratones hembra BALB/c por el tratamiento con 40mg de MPA de tipo depot cada 3 meses. Ambos tumores son de histología ductal y se mantienen por pasajes singeneicos en ratones tratados o no con

MPA. El crecimiento in vivo de C4-HD es dependiente de MPA (PD), mientras que el tumor C7-HI tiene un crecimiento autónomo (PI). El tumor C4-HD hace metástasis pulmonares después de 4 a 5 meses, mientras que C7-HI hace metástasis en el ganglio axilar homolateral y pulmones antes de los dos meses. Con respecto a expresión de receptores, ambos expresan receptores de estrógeno y progesterona y no se han detectado receptores de glucocorticoides, andrógenos y de EGF (Lanari et al. 1997). El tumor C7-HI tiene amplificadas las ciclinas D1 y E y el tumor C4-HD tiene amplificado el gen c-erbB-2 (resultados no publicados).

#### **Mantenimiento de las líneas celulares:**

Las líneas celulares derivadas de estos tumores se mantienen con medio de cultivo adicionado con 10% SFB y Progesterona 10nM, en estufa con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Se repican cada 7 días con tripsina /EDTA y se siembran en dilución 1:20.

#### **Obtención de metafases del ratón BALB/c normal:**

Se inyectó intraperitonealmente a un ratón hembra de la cepa BALB/c con colchicina (Sigma) en concentración 1µg/g peso. Luego de tres horas se le extrajeron los fémures para la obtención de médula ósea. Ésta se sometió a hipotonía con una solución de KCl (Anedra) 0,07M durante 10 minutos a 37°C y se fijó con metanol: ácido acético (Merck) en proporción 3:1. Los preparados se realizaron según la técnica de secado al aire. Se dejaron caer unas gotas de la suspensión sobre portaobjetos limpios y empañados y se secó al aire. Se realizó bandeo G y bandeo C.

#### **Obtención de metafases de las líneas celulares:**

Se aplicó la técnica de Worton (1979), con algunas modificaciones. Los cultivos celulares 3 a 4 días luego del repique se trajeron durante dos horas con colchicina (Sigma), en concentración final 1 µg/ml de cultivo. Se descartó el medio de cultivo y se levantó la monocapa celular con tripsina (GIBCO BRL) 0,25% en PBS 1X. Se recogió todo en un tubo de centrífuga y se centrifugó 5 minutos a 800 rpm. Se descartó el

sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 2 ml de solución hipotónica de KCl (Anedra) 0,07 M. Se incubó 10 minutos a 37°C y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 800 rpm para eliminar la hipotonía. Las células se fijaron con 2 ml de metanol: ácido acético (Merck) en proporción 3:1, dejándolo caer lentamente por las paredes del tubo, sin resuspender. Se dejó 30 minutos aproximadamente en hielo y las células ya fijadas se resuspendieron para realizar los preparados, lavándolas con fijador cuando fue necesario. Para ello se centrifugó 5 minutos a baja velocidad y se cambió el fijador. Los extendidos se realizaron dejando caer unas gotas de la suspensión sobre portaobjetos limpios y fríos para secarlo al aire.

#### **Análisis de las metafases:**

Los preparados se tiñeron con solución de Giemsa (Merck) al 3% en PBS 1X para observar y dibujar las metafases y contar el número de cromosomas de cada una. La tinción se realizó en un coplin, durante 5 minutos y enjuagando luego con agua de la canilla. El número modal se obtuvo como el número de cromosomas de mayor frecuencia. Las metafases primero se seleccionaron a bajo aumento y luego se contó su número de cromosomas con el objetivo de inmersión. Se contaron 5 metafases y se agregaron 5 por cada número cromosómico nuevo encontrado, hasta un máximo de 25 metafases. Esto nos asegura no dejar ninguna población celular fuera del recuento. Además de estudiar la ploidía, se analizó la presencia de marcadores aplicando técnicas de bandeo C y bandeo G.

#### **Bandeo G:**

Los portaobjetos se incubaron previamente en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se trataron con tripsina (GIBCO BRL) 0,1 % en PBS 1X (sin Ca++ ni Mg++) entre 20 y 50 segundos. Se lavaron en PBS 1X y se colorearon con solución Giemsa al 3% entre 3 y 5 minutos, enjuagando luego con agua de la canilla (Seabright, 1971).

**Bandeo C:**

Los preparados se incubaron en HCl (Ruido) 0,2N durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con agua destilada y se trataron con una solución saturada de Ba(OH)<sub>2</sub> (Anedra) a 50°C, entre 1 y 15 minutos. Se lavaron luego con abundante agua destilada y se incubaron en solución SSC 2X a 60°C durante 1 hora. Luego se colorearon con Giemsa al 2% durante 10 minutos, enjuagando con agua de la canilla (Sumner, 1972).

**Fotografía:**

Las metafases se observaron con el objetivo de inmersión en un microscopio Zeiss y se fotografiaron usando una cámara Olympus adaptada a dicho microscopio. Se utilizó una película ortocromática Kodalith de 32 asa. Las fotos obtenidas se utilizaron para armar los cariotipos correspondientes y compararlos con el patrón normal de bandas G obtenido de la literatura y el realizado a partir de los ratones normales de la cepa BALB/c de nuestro bioterio, los cuales se utilizan para mantener los tumores. Los pares fueron ordenados según el sistema estandarizado para el ratón (Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, 1976).

# RESULTADOS

**Cariotipo de la cepa BALB/c:**

El cariotipo normal de ratón (*Mus musculus*) está formado por 40 cromosomas todos acrocéntricos, 19 pares de autosomas y el par sexual (XX en hembras y XY en machos) (figuras 1 y 2).

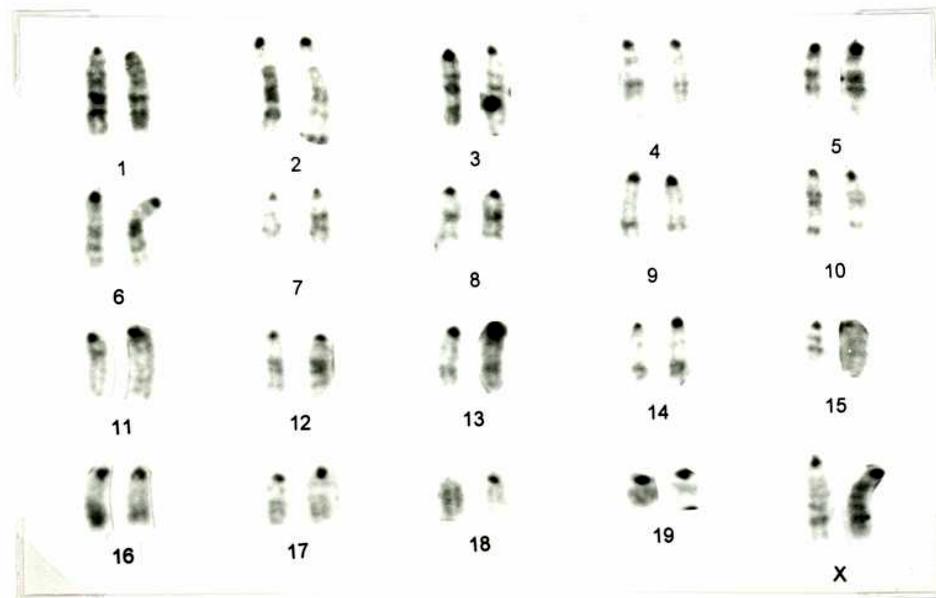


Figura 1: Cariotipo de banda G de un ratón hembra de la cepa BALB/c ( $2n=40$ , XX).

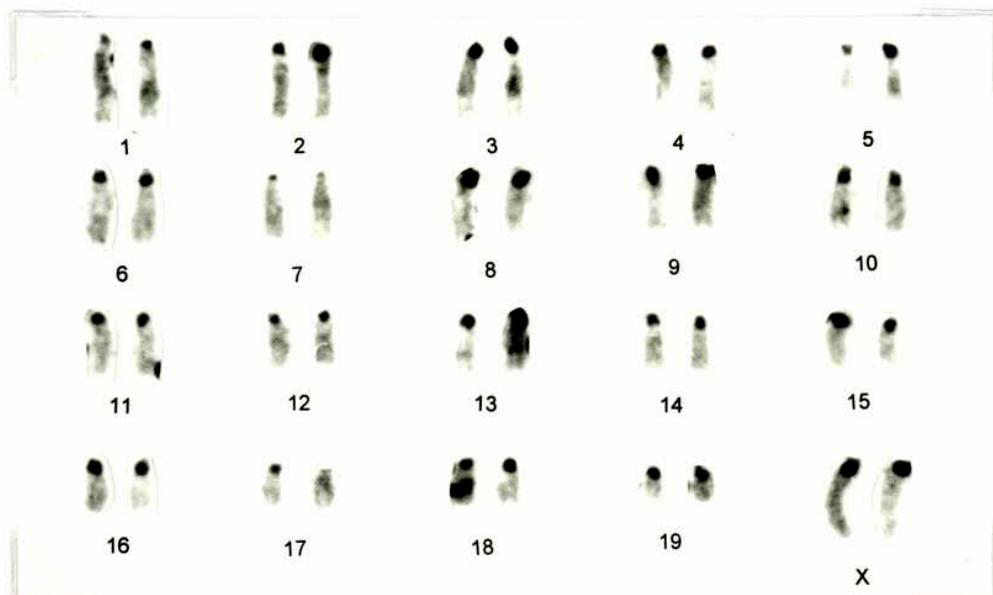


Figura 2: Cariotipo de banda C de un ratón hembra de la cepa BALB/c ( $2n=40$ , XX).

**Cariotipo de las líneas celulares:****LÍNEA C4L1:**

Las células de la línea C4L1 presentaron en cultivo en monocapa una morfología de tipo epitelioide, poligonal (figura 3). Las mismas se estudiaron en el repique 48 y el número de cromosomas de las metafases coloreadas con Giemsa presentó un rango de 41 a 68 cromosomas. El número modal fue de 65 cromosomas y se encontró en el 20% de las metafases (figura 4). El estudio de las mismas metafases con tinción con Giemsa reveló la presencia de cromosomas metacéntricos (M) y submetacéntricos (SM). En el 48% de las metafases se encontraron 7, en el 40% 6, el 8% presentó 5 y el 4% presentó 4 cromosomas, tanto M como SM, en una misma metafase.

El estudio de las metafases con banda G mostró que dichos cromosomas marcadores eran el resultado de fusiones céntricas entre dos cromosomas acrocéntricos. Los cromosomas involucrados identificados fueron los correspondientes a los pares 1, 2, 10 y 17. Las fusiones ocurrían siempre entre el cromosoma 1 y el cromosoma 10 y entre el cromosoma 2 y el cromosoma 17. Ambas fusiones estaban presentes en la misma metafase, en todas las metafases analizadas. El 80% de las metafases presentó 2 fusiones entre los cromosomas 2 y 17 acompañadas por 1, 2 y hasta 3 fusiones entre los cromosomas 1 y 10. Las restantes metafases (el 20%) presentaron solo una fusión entre los cromosomas 2 y 17, acompañadas también por un número variable de la fusión (1;10) (figura 5). Se observaron además otras fusiones no identificadas, que varían de una metafase a otra.

Se observó tanto la falta del par sexual; monosomías en los pares 7 o 14; trisomías, como la de los cromosomas 12 o 13; hasta tetrasomías y pentasomías de los cromosomas 3 y 5 (figura 5).

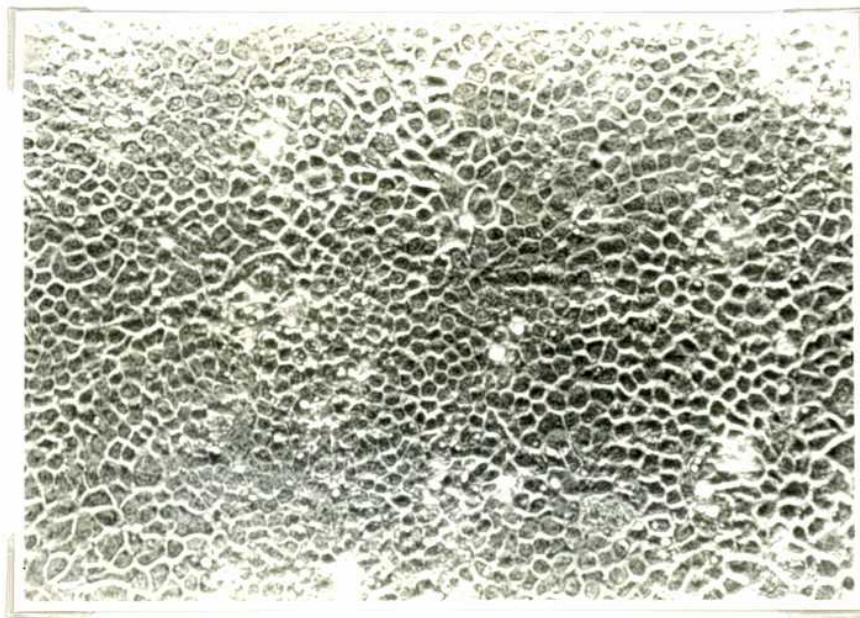


Figura 3: Morfología de las células de la línea C4L1 en monocapa (contraste de fase, 100X).

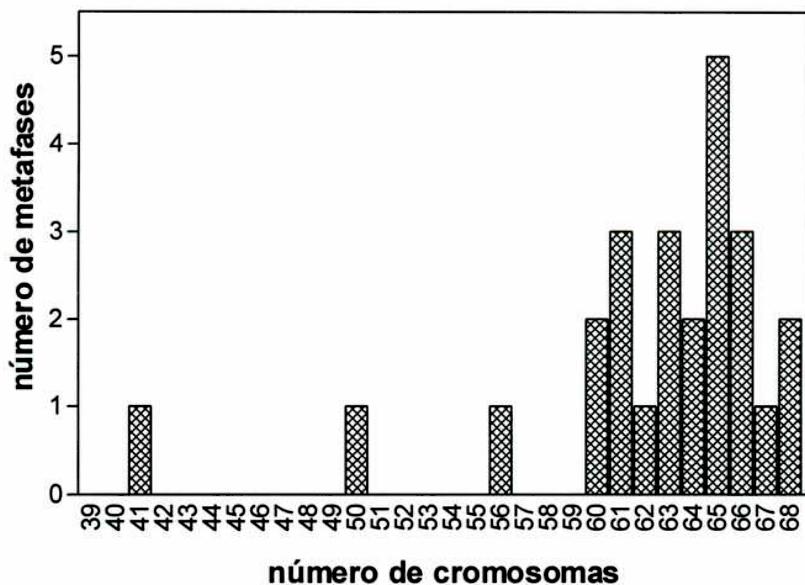


Figura 4: Histograma de la distribución del número de cromosomas observado en la línea C4L1, repique 48. Se analizaron 25 metaphases y los valores se expresaron como número de metaphases para cada número de cromosomas. El número modal es 65, presente en el 20% de las metaphases.

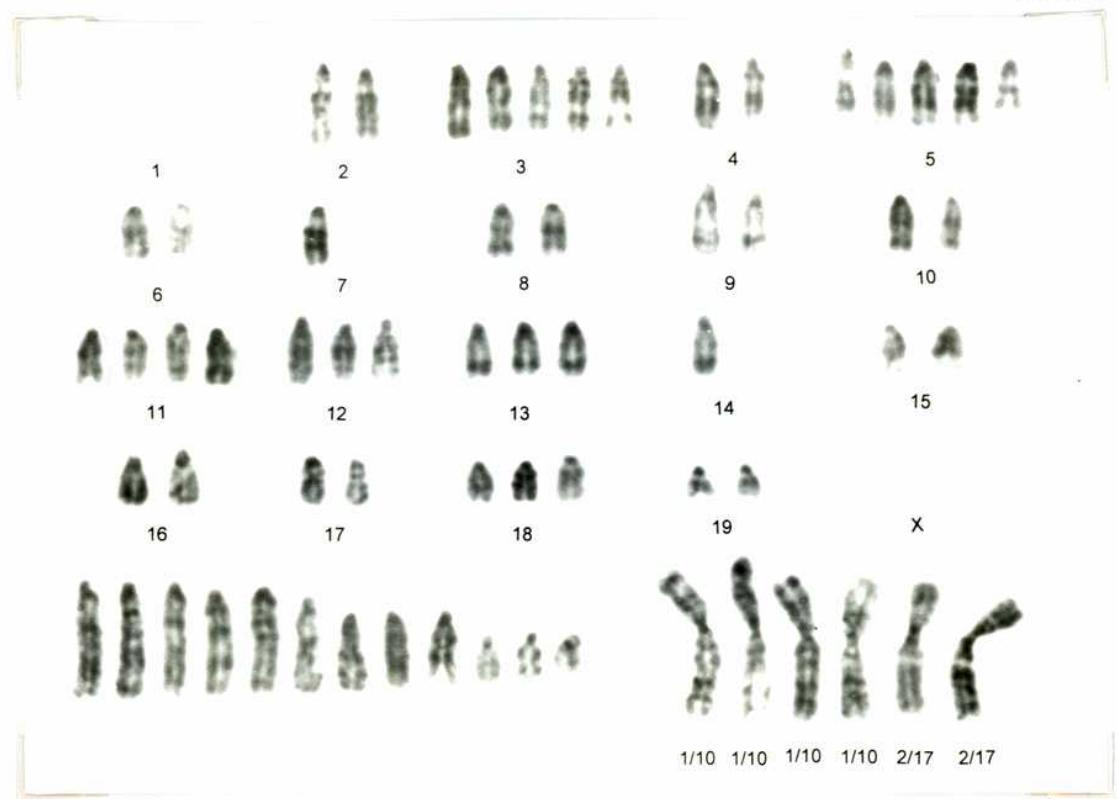


Figura 5: Cariotipo de banda G de la línea C4L1 repique 48. Ángulo inferior izquierdo: marcadores no identificados, ángulo inferior derecho: marcadores identificados.

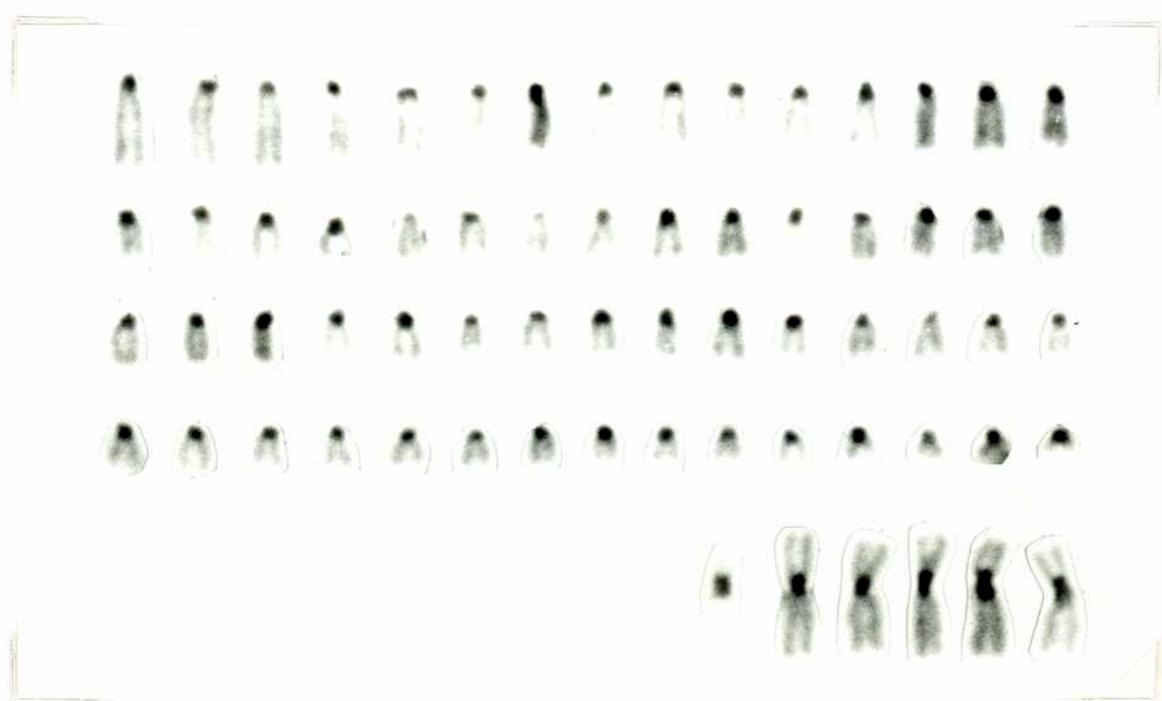


Figura 6: Cariotipo de banda C de la línea C4L1 repique 48. Los cromosomas fueron ordenados según su tamaño. Las fusiones fueron ubicadas debajo a la derecha.

## LÍNEA C4L2:

Las células de la línea C4L2 presentaron una morfología de tipo fibroblastoide en cultivo en monocapa (figura 7), pero estudios de inmunohistoquímica y microscopía electrónica confirmaron su origen epitelial. Las mismas se estudiaron en el repique 19 y presentaron un rango de 59 a 81 cromosomas. El número cromosómico modal fue de 68 cromosomas, presentes en el 16 % de las metafases (figura 8).

Se encontraron cromosomas metacéntricos (M) y submetacéntricos (SM) en todas las metafases estudiadas, resultado de fusiones céntricas. El 85% de las metafases de la línea C4L2 presentaron 2 cromosomas, 1 M y 1 SM, mientras que un pequeño porcentaje presentó 1 y 3 cromosomas M y SM en la misma metafase (con el 10% y el 5% respectivamente).

Por medio de banda G se identificaron los cromosomas fusionados y que formaban dichos cromosomas marcadores. Las metafases presentaron solamente una única fusión entre los cromosomas 1 y 10 y una sola fusión entre los cromosomas 2 y 17 en la misma metafase en el 90% de los casos (figura 9). Un 5% presentó además de estas dos fusiones una tercera no identificada. Se encontraron metafases con una sola fusión, que podía ser tanto (1;10) como (2;17).

Se observó además monosomía, como la del cromosoma 7; trisomía, como la de los cromosomas 14 y 15; tetrasomía, como la de los cromosomas 3, 9 y 13; hasta 5 y 6 cromosomas en un mismo par, como los pares 5, 10 y 11 (figura 9).

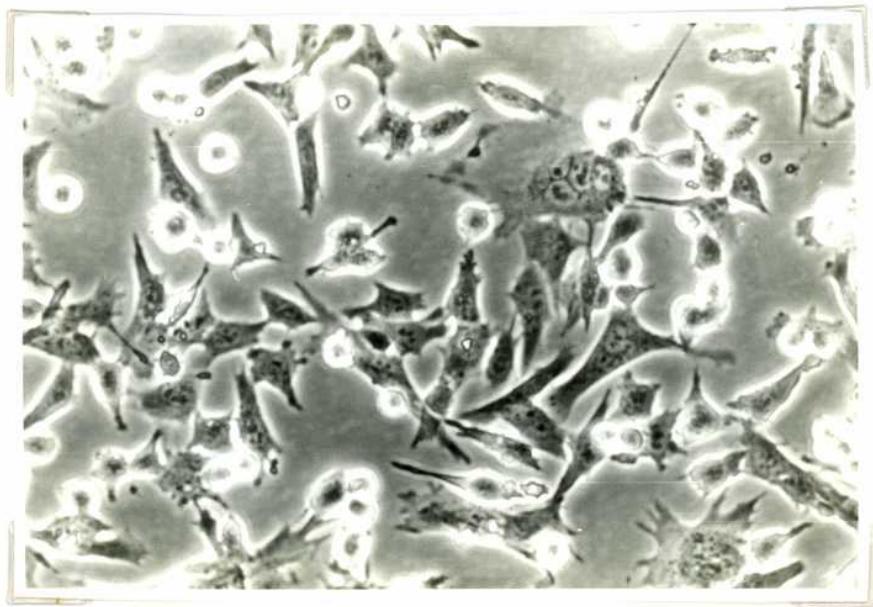


Figura 7: Morfología de las células de la línea C4L2 en monocapa (contraste de fase, 100X).

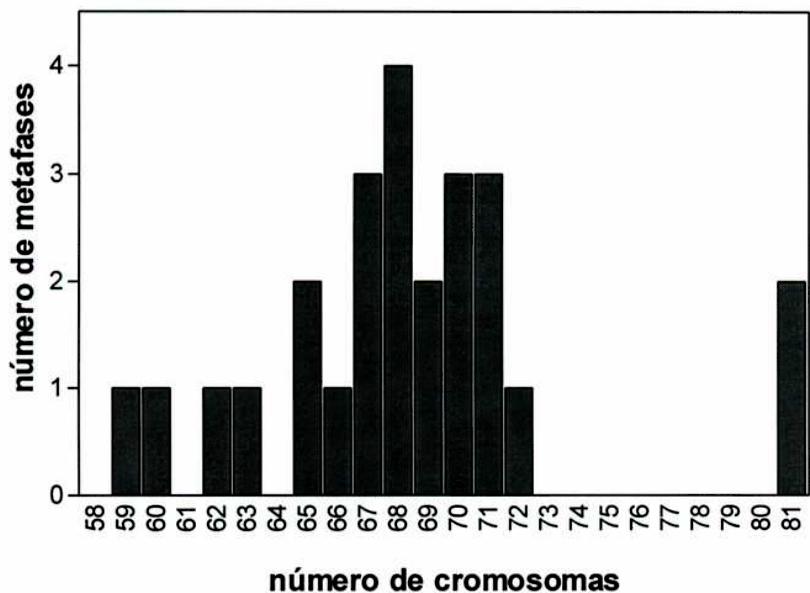


Figura 8: Histograma de la distribución del número de cromosomas observado en la línea C4L2, repike 19. Se analizaron 25 metaphases y los valores se expresaron como número de metaphases para cada número de cromosomas. El número modal es 68, presente en el 16% de las metaphases.

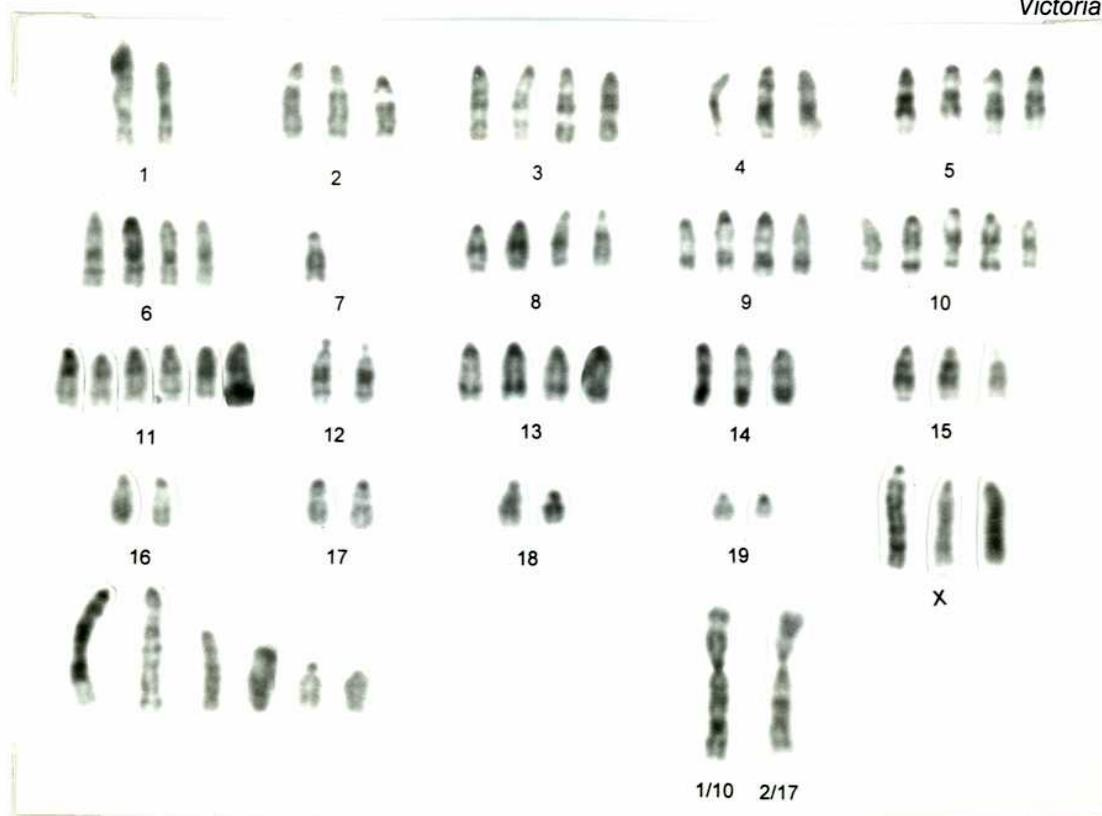


Figura 9: Cariotipo de banda G de la línea C4L2 repique 19. Ángulo inferior izquierdo: marcadores no identificados, ángulo inferior derecho: marcadores identificados.

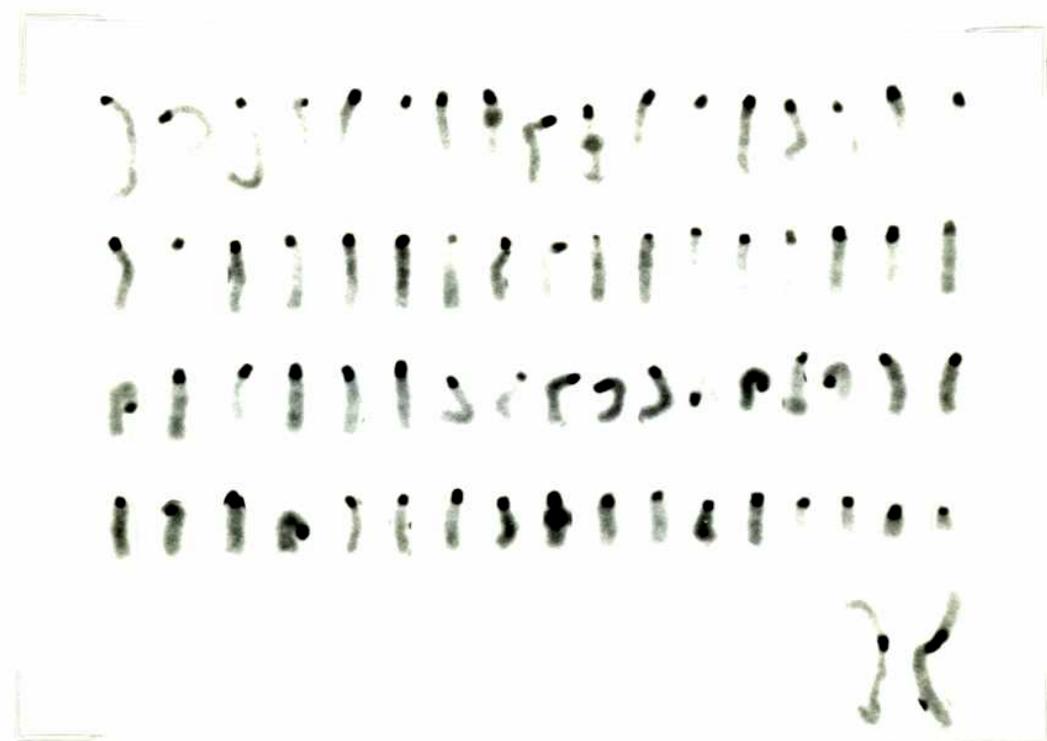


Figura 10: Cariotipo de banda C de la línea C4L2 repique 19. Los cromosomas fueron ordenados según su tamaño. Las fusiones fueron ubicadas debajo a la derecha.

## LÍNEA C7L1:

La línea C7L1 en presentó una morfología fibroblastoide en cultivo en monocapa (figura 11) y se confirmó su origen epitelial por técnicas de inmunohistoquímica y estudios de microscopía electrónica. Las mismas fueron estudiadas en el repique 25 y las metafases coloreadas con Giemsa presentaron un rango de 58 a 81 cromosomas. El número modal de 74 cromosomas estaba presente en el 32% de las metafases estudiadas (figura 12).

Todas las metafases analizadas presentaron cromosomas marcadores formados por la fusión entre los cromosomas 1 y 10 y los cromosomas 2 y 17. Todas las metafases de la línea celular presentaron estas dos únicas fusiones en la misma metafase (figura 13).

Se observó la presencia de trisomías, como la de los cromosomas 4, 5 y 14; tetrasomías, como la de los cromosomas 3, 13 y 15 y pentasomía del cromosoma 11 (figura 13).

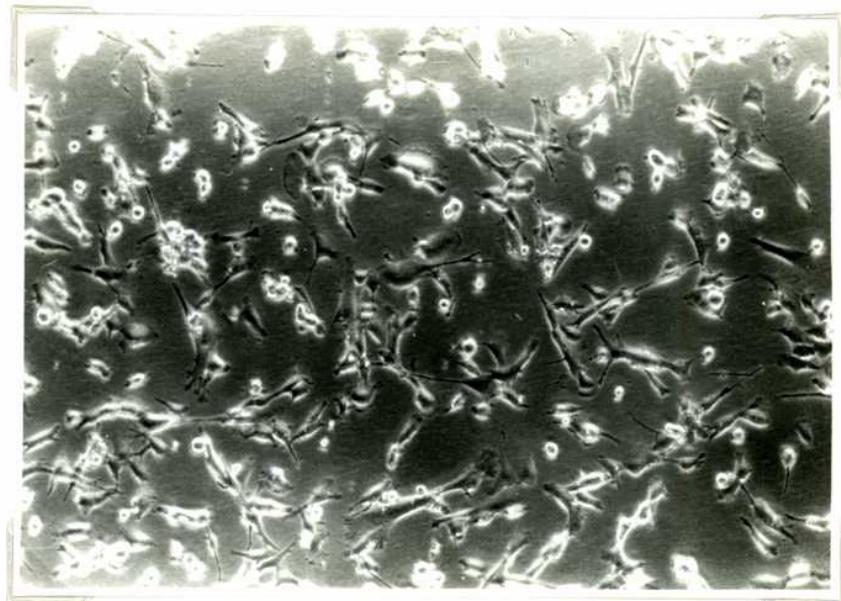


Figura 11: Morfología de las células de la línea C7L1 en monocapa (contraste de fase, 100X).

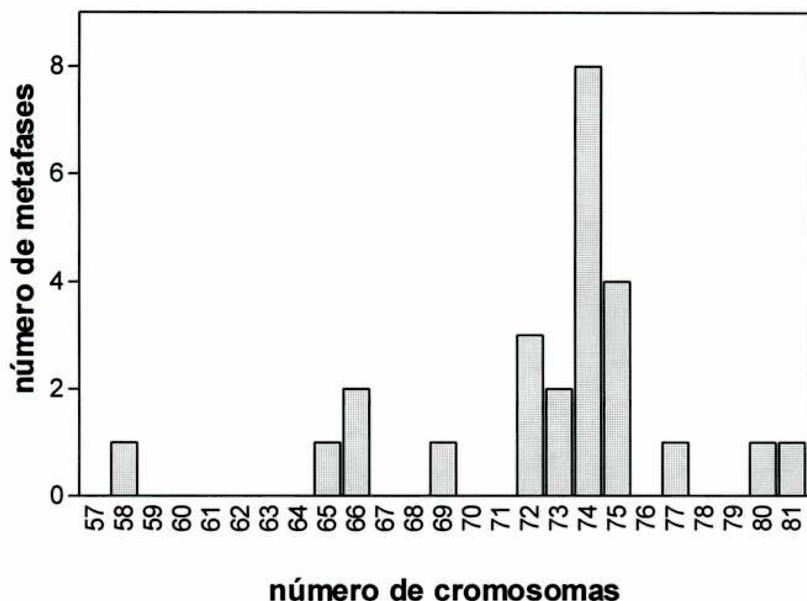


Figura 12: Histograma de la distribución del número de cromosomas observado en la línea C7L1, repique 25. Se analizaron 25 metafases y los valores se expresaron como número de metafases para cada número de cromosomas. El número modal es 74, presente en el 32% de las metafases.

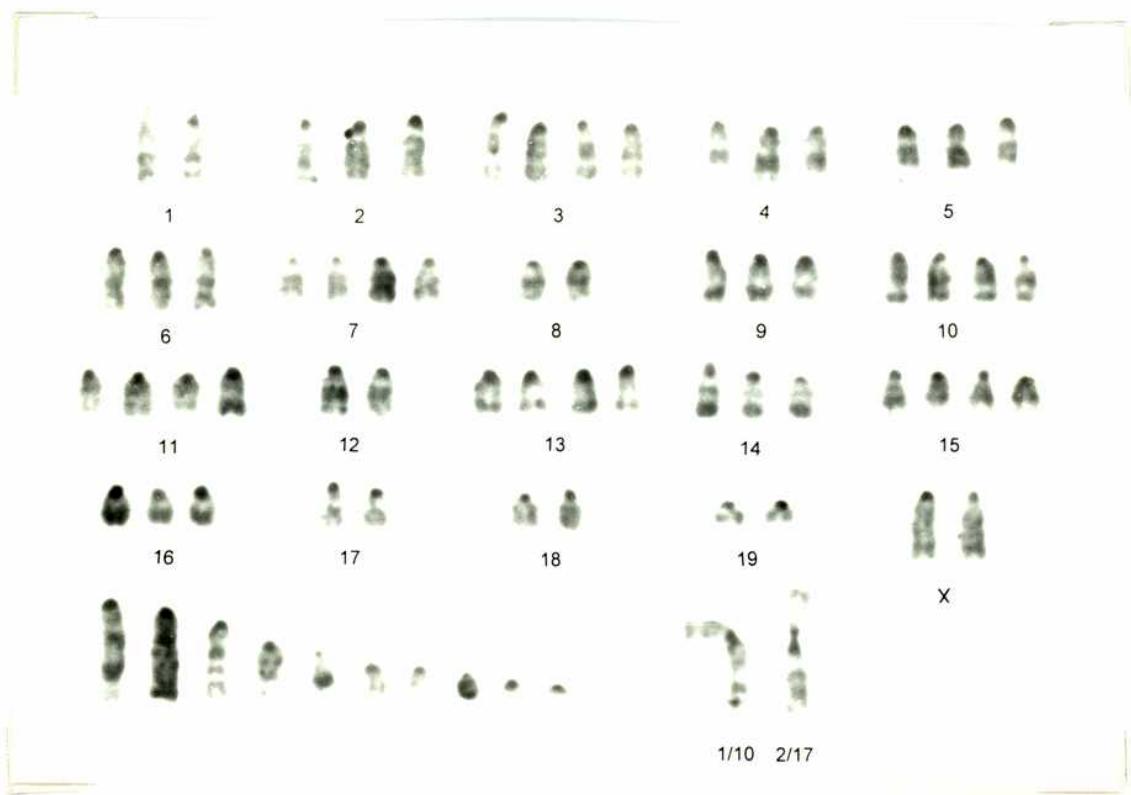


Figura 13: Cariotipo de banda G de la línea C7L1 repique 25. Ángulo inferior izquierdo: marcadores no identificados, ángulo inferior derecho: marcadores identificados.



Figura 14: Cariotipo de banda C de la línea C7L1 repique 25. Los cromosomas fueron ordenados según su tamaño. Las fusiones fueron ubicadas debajo a la derecha.

### **Comparación de las líneas estudiadas:**

Las líneas resultaron ser aneuploides, con diferente número cromosómico modal y un rango de 41 a 81 cromosomas, mayor al número de cromosomas encontrado en el núcleo de una célula normal de ratón. No se observó un patrón común de aneuploidía para cada línea en particular ni compartido por las tres líneas. El número de cromosomas de cada par varía de una línea a otra y de una metafase a otra. Se observó tanto la falta de un par completo, como el par sexual en la línea C4L1, monosomías, en su mayoría de los pares 7 y 8, así como también trisomías, tetrasomías en varios pares cromosómicos. Se observó hasta 5 y 6 cromosomas en algunos pares, como el 5, 10, 11 y 13. Los pares 18 y 19, en general, no presentaron alteración numérica. La línea C4L1 presentó el cromosoma 1 siempre formando parte de uno de los marcadores, no así las otras dos líneas.

Todas las metafases estudiadas de las tres líneas celulares presentaron cromosomas marcadores formados por fusiones céntricas entre los cromosomas 1 y 10 y los cromosomas 2 y 17 (figura 15A). Además se encontraron fusionados otros cromosomas no identificados en las líneas C4L1 y C4L2 (figura 16).

Otros marcadores observados no identificados fueron dos cromosomas acrocéntricos grandes, presentes en todas las metafases estudiadas de las tres líneas celulares (figura 15B).

En todos los cariotipos de las tres líneas analizados se encontraron cromosomas cuyo patrón de bandas no coincidía con los de los cromosomas del cariotipo normal, y posiblemente se deban a alteraciones estructurales, como translocaciones, delecciones o inversiones, que no fueron determinadas (figuras 5, 9 y 13).

El análisis del cariotipo de banda C de las tres líneas celulares mostró la localización de la heterocromatina constitutiva exclusivamente centromérica en todos los cromosomas, al igual que en el ratón normal (figuras 2, 6, 10 y 14).

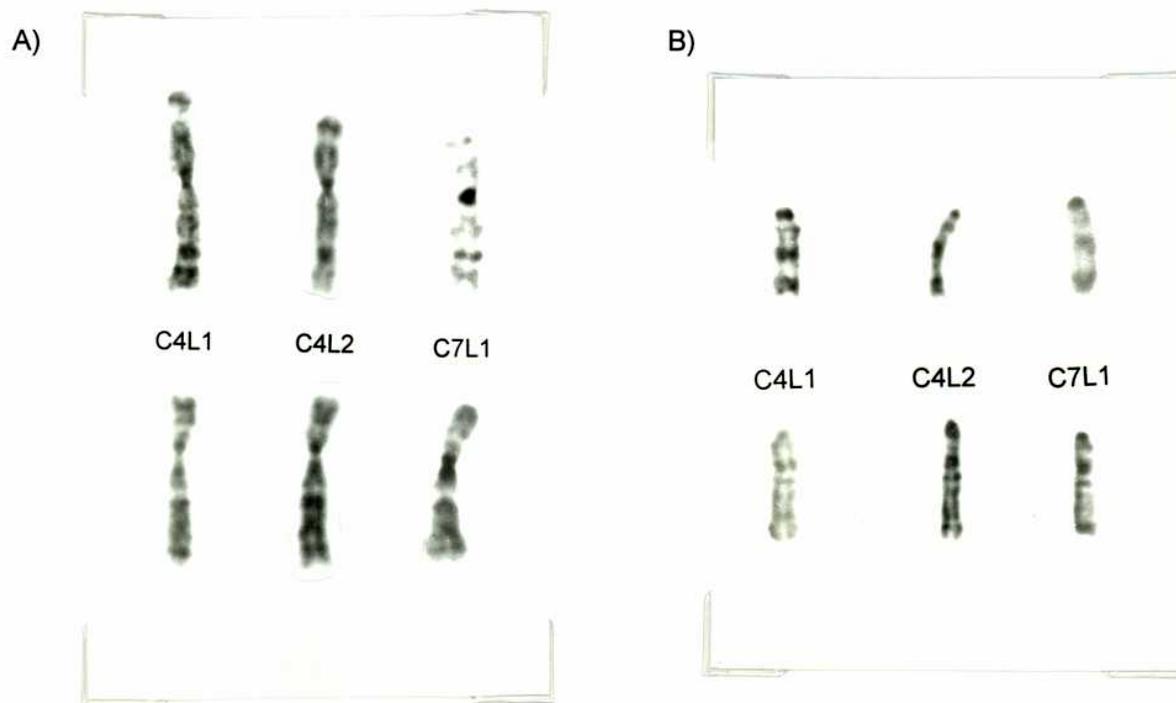


Figura 15: Marcadores compartidos por las tres líneas celulares. A) Identificados: fusión entre los cromosomas 1 y 10 en la parte superior, fusión entre los cromosomas 2 y 17 en la parte inferior. B) No identificados.

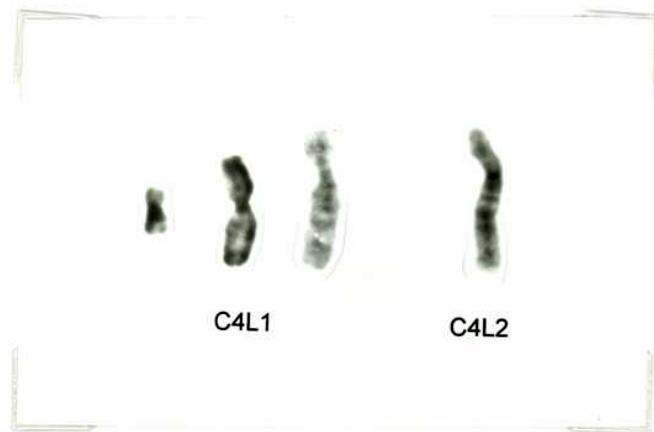


Figura 16: Marcadores no compartidos, formados por fusiones no identificadas y encontrados en las líneas C4L1 y C4L2.

El número modal y los marcadores que fueron identificados se resumen en el cuadro 1, donde figuran además otros parámetros de las líneas celulares analizadas y de las otras líneas en estudio en el laboratorio. Las características más notorias son la expresión de receptores para estrógenos y progesterona por todas las líneas, presentando cada una respuestas hormonales tanto “in vivo” como “in vitro” particulares para cada una. Curiosamente, las que aparentemente responden “in vitro” al MPA muestran un comportamiento hormono-independiente “in vivo” y las que hasta el momento no hemos podido demostrar que respondan “in vitro” a progestágenos y estrógenos muestran un comportamiento hormono-dependiente al inocularlas en ratones. Todas las líneas son de estirpe epitelial ya que expresan citoqueratinas y caderina E.

Característica evaluada	C4-L1	C4-L2	C4-L3	C4-L4	C4-L5	C7-L1
Nº de repike actual	81	48	27	31	24	35
Tumor original	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C7-L1
Morfología <i>in vitro</i>	epitelioide	fibroblastoides	epitelioide	epitelioide	Epitelioide	fibroblastoides
Despegado	> 10 min.	< 1 min.	> 10 min.	> 10 min.	> 10 min.	< 1 min.
Tiempo de duplicación (hs)	24,48	27,95	ND	ND	ND	20
Número modal	<b>65</b>	<b>68</b>	ND	ND	ND	<b>74</b>
Marcadores cromosómicos	<b>Fus(1;10) Fus(2;17)</b>	<b>Fus(1;10) Fus(2;17)</b>	ND	ND	ND	<b>Fus(1;10) Fus(2;17)</b>
RE (TB)	+	+	+	+	+	+
RE (IMHQ)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RP (TB)	++	+++	+++	+++	+++	+++
RP (IMHQ)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Citoqueratina <i>in vitro</i>	++	++	++	++	++	++
c-erbB2	++	++	++	++	++	+
Caderina E	+	+	+	+	+	+
Respuesta proliferativa al MPA	±α	+++	±	±	±	++++
Respuesta proliferativa a E <sub>2</sub>	±	++	±	±	±	++
Respuesta inhibitoria de TGFβ1	++	++	++	++	++	-
Progestágeno-dependencia <i>in vivo</i>	PD	PI	PD	PD	PD	PI
RE y RP <i>in vivo</i> (IMHQ)	++	++	++	++	++	++
Citoqueratinas <i>in vivo</i>	++	++	++	++	++	
Morfología <i>in vivo</i>	a	b	a	a	a	c
Patrón de invasión y metástasis	pulmonar	Inv local,axilar y pulmonar	pulmonar	pulmonar	Pulmonar	Inv local,axilar y pulmonar
Regresión con antiprogestágeno mifepristona <i>in vivo</i>	NO	NDβ	SI	ND	SI	NO
Tratamiento con antiprogestágeno onapristona <i>in vivo</i>	SI	ND	SI	ND	SI	NO
Tratamiento con E <sub>2</sub> <i>in vivo</i>	NO	ND	SI	ND	SI	NO

Cuadro 1: Características de las líneas celulares desarrolladas en nuestro laboratorio. a: Carcinoma ductal infiltrante con patrón de crecimiento cribiforme y tubular. b: Carcinoma fusocelular. c: Carcinoma indiferenciado. α: efectos no muy claros, en ocasiones estimula y en otros experimentos no. β: aún no determinado. TB: técnica bioquímica. IMHQ: técnica inmunohistoquímica.

# DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó, mediante el estudio citogenético clásico y técnicas de bandeo C y G, el cariotipo de líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos. Las tres líneas analizadas se presentaron con un número de cromosomas mayor a 60 y con ganancia y pérdida de cromosomas individuales o aneuploidía. Las tres líneas compartieron cromosomas marcadores, que fueron identificados como el resultado de fusiones céntricas entre los cromosomas 1 y 10 y los cromosomas 2 y 17.

Tanto las alteraciones numéricas como estructurales se asocian a un mayor grado de malignidad (Nowell, 1986). La aneuploidía, en general, es característica de tumores malignos y de líneas celulares transformadas. Se caracteriza por inducir un desbalance génico importante, contribuyendo a la mayor probabilidad de no-disyunción de los cromosomas. Estos cambios pueden estar asociados a su vez a cambios estructurales de los cromosomas.

En las líneas estudiadas en este trabajo se detectaron además de trisomías en varios pares cromosómicos, hasta más de 4 y 6 cromosomas de un mismo par. Se ha observado la presencia de trisomías en muchos tumores experimentales, como por ejemplo en leucemias y sarcomas inducidos por DMBA en ratas (Sugiyama et al. 1967; Mitelman y Levan, 1972), en linfomas espontáneos en una cepa de ratón, con trisomía del cromosoma 15 (Dofuku et al. 1975), y en tumores mamarios espontáneos en ratón asociados a las cepas GR y C3H, que contienen el virus MMTV, con una trisomía del cromosoma 13 (Dofuku et al. 1979). En líneas derivadas de tumores neurogénicos inducidos en ratas por etilnitrosourea (ENU), además de trisomías del cromosoma 4, se informaron tetrasomías y pentasomías de dicho cromosoma (Au et al. 1977).

El número modal caracteriza a una línea celular y a veces puede ir cambiando a medida que se avanza en los repiques. Es por eso que es conveniente repetir los estudios citogenéticos en intervalos establecidos de tiempo para garantizar que se está trabajando con la línea establecida con los parámetros informados. Al cambiar el cariotipo, otros parámetros se pueden ir modificando. En este trabajo se estudió un único pasaje de cada línea, y será necesario repetir estos estudios usando repiques más avanzados. Son escasos los trabajos sobre estudios citogenéticos en líneas celulares obtenidas de tumores de mama de ratón. Recientemente se ha obtenido una

línea de tipo sarcomatoide por clonación de una línea obtenida a partir de un adenocarcinoma mamario de ratones BALB/c. Se ha reportado que esta es casi triploide, con un número modal de 57 cromosomas (Alonso et al. 1996). La línea parental de ésta, M3, está descripta como tetraploide, con número cromosómico modal de 84. Otra línea celular recientemente obtenida a partir de un adenocarcinoma mamario de ratón transgénico neu presentó un rango de 40 a 174 cromosomas (Sacco et al. 1998). Las líneas celulares humanas de carcinomas mamarios también se caracterizan por una gran aneuploidía, por ejemplo, la línea MCF-7 más ampliamente utilizada tiene un amplio rango en el número de cromosomas y un número modal entre 70 y 80 cromosomas (humano: 2n=46) (Whang-Peng et al. 1983).

Las metafases en nuestro trabajo fueron analizadas principalmente por medio de banda G, que permite identificar a cada cromosoma por su patrón de bandas. Debido a la morfología que poseen los cromosomas de ratón, es difícil identificarlos cuando se encuentran coloreados con Giemsa. Los cromosomas con banda C se ordenaron por tamaño, debido a la imposibilidad de encontrar los respectivos pares. La técnica de bandeo C nos corroboró el patrón de banda C correspondiente al ratón normal y que los reordenamientos encontrados provenían de mecanismos de fusión céntrica, ya que las bandas C fueron todas centroméricas y no se observó heterocromatina intercalar. Las bandas G son las que aportan mayor información sobre la manera en la cual los rearreglos pueden haber ocurrido en el cariotipo. En la actualidad también se emplean técnicas de FISH utilizando sondas que reconocen sitios específicos a lo largo del cromosoma y se detectan como cromosomas pintados. Esta técnica permite además realizar un estudio cuantitativo de las señales fluorescentes observadas y en núcleos en interfase (Afify et al. 1996). En estudios preliminares se aplicó la técnica de FISH en una de las líneas utilizando la sonda del cromosoma 11, ya que nos interesaba investigar si la sobre-expresión del oncogen c-erbB-2 observada en nuestros tumores se debía a un aumento del cromosoma 11, donde se encuentra localizado el oncogen. En efecto, observamos hasta 5 señales correspondientes al cromosoma 11. En el futuro mediato utilizaremos esta técnica para confirmar los cromosomas involucrados en los marcadores observados y verificar fragmentos intercalares en otros elementos del cariotipo.

La fusión céntrica entre dos cromosomas acrocéntricos para dar un cromosoma metacéntrico o submetacéntrico puede ocurrir por tres mecanismos. Por adhesión de los extremos cercanos al centrómero, sin ruptura y el cromosoma formado tendrá dos centrómeros. Puede ocurrir una ruptura en el pequeño brazo corto de los dos cromosomas acrocéntricos y luego fusionarse los extremos rotos, quedando un cromosoma con dos centrómeros y un fragmento acéntrico. En ambos casos, el cromosoma con dos centrómeros es posible que no dure muchas mitosis, ya que los centrómeros tirarán hacia polos opuestos en anafase. Otra posibilidad es que ocurra una ruptura próxima al centrómero, en el brazo largo de uno de los cromosomas acrocéntricos, y una ruptura cerca del centrómero en el pequeño brazo corto del otro cromosoma, seguido por una translocación mutua. De esta manera se forman un cromosoma metacéntrico (o submetacéntrico) con un solo centrómero y un pequeño cromosoma con centrómero y heterocromatina, que se pierde luego de varias divisiones.

En nuestro caso, la fusión entre los cromosomas 2 y 17 parece haber ocurrido por simple fusión de los extremos de los dos cromosomas acrocéntricos, con probable pérdida de uno de los centrómeros, a pesar de observarse dos masas de heterocromatina pericentromérica. El cromosoma formado por la fusión entre los cromosomas 1 y 10, en cambio, presenta claramente un centrómero y por lo tanto debe haber ocurrido por ruptura y fusión.

Las líneas C4L1 y C4L2, derivadas del mismo tumor, y la línea C7L1, derivada de otro tumor con un comportamiento biológico diferente, presentaron las mismas fusiones céntricas. Es posible que los cromosomas involucrados posean sitios sensibles a ruptura y fusión, al producirse la fusión por el mecanismo de reordenamiento Robertsoniano. No hemos visto datos bibliográficos que indiquen que estas fusiones sean comunes en los adenocarcinomas mamarios de ratón. Sí se observó la aparición de una fusión entre dos cromosomas acrocéntricos de similar tamaño en una línea de linfoma de ratón (Ohno et al. 1960).

Nos pareció lógico que C4L1 y C4L2 compartieran marcadores comunes, porque ambas líneas derivan del mismo cultivo de un tumor mamario (C4-HD) y estos marcadores probablemente hayan estado presentes en el tumor original. Estudios

comenzados en el laboratorio sobre el cariotipo de cultivos primarios de este tumor habrían revelado la presencia de estos marcadores en el tumor parental. Lo que nos llamó la atención fue que la línea C7L1, originada a partir de un tumor también inducido por MPA en 1985 (C7-HI), pero que a pesar de expresar receptores hormonales mantenía un comportamiento progestágeno-independiente (Lanari et al. 1997), presentara los mismos marcadores. Estos resultados sugieren que estos marcadores podrían estar relacionados con el origen común de estos tumores, es decir, que estén relacionados al agente inductor (MPA). Para comprobar esta hipótesis, se estudiará el cariotipo de otros tumores mamarios también inducidos por MPA, así como de controles espontáneos. Se utilizará la técnica de FISH usando las sondas que reconocen al cromosoma 1, 2, 10 y 17. Si los cromosomas están fusionados aparecerán las marcas juntas y ésto será visible no sólo en metafase, sino también en núcleos interfásicos, haciendo posible realizar el estudio en cultivos primarios de los cuales se obtienen pocas metafases.

Si bien el MPA es un progestágeno sintético de amplio uso (Campio et al. 1983; Sun, 1984), se ha demostrado que induce un aumento del intercambio de cromátides hermanas (García Heras et al. 1982) y de ser teratogénico en altas dosis en primates (Prahdala et al. 1985).

En la bibliografía existen muchos trabajos donde se correlaciona la acción de carcinogénes químicos con la formación de aductos o de mutaciones puntuales como en el caso del oncogen ras en la glándula mamaria tratada con NMU o DMBA en ratas (Clarke, 1996). No hay mucha bibliografía en la cual se demuestre una asociación como la que se pretende en este trabajo entre la acción de un carcinógeno y la presencia de un marcador determinado. En estudios en carcinogénesis química en ratas se planteó la posibilidad que hubieran sitios sensibles al carcinógeno que resulten en la producción de las alteraciones cromosómicas observadas (Holecek et al. 1989; Debiec-Rychter et al. 1991). Sin embargo los datos son contradictorios, ya que los sarcomas inducidos en ratas por DMBA o por el virus del sarcoma de Rous poseen la misma histología pero alteraciones del cariotipo diferente en uno y otro caso, sugiriendo una asociación con el agente inductor (Rowley, 1974), mientras que timomas en ratón, ya sean espontáneos o inducidos por radiación o químicos, poseen la misma alteración cromosómica,

sugiriendo que el cambio está asociado con el tipo de tumor (Au et al. 1977). En estudios clínicos también se ha planteado la posible relación entre carcinógenos y defectos cromosómicos, tales como delecciones y trisomías, en ciertas neoplasias. Los estudios más detallados se realizaron en leucemia, en pacientes con historia de exposición a mutágenos, pesticidas, derivados de petróleo o productos químicos, donde se encontraron alteraciones consistentes en los cromosomas 5, 7 y 8 (Yunis, 1983).

Líneas celulares establecidas de células neoplásicas uroteliales de rata inducidas con NMU, mostraron la pérdida del brazo corto del cromosoma 3. Esto se correlacionó con la tumorigenidad de dichas células "in vivo", ya que esta alteración no estaba presente en las líneas no tumorigénicas (Debiec-Rychter et al. 1991). En adenocarcinoma de próstata de rata, alteraciones en los cromosomas se asociaron con la habilidad para metástasis, tasa de crecimiento y desdiferenciación (Wake et al. 1982).

En nuestro estudio, no se encontraron marcadores específicos para cada línea, si bien se las puede diferenciar por su número modal y por el número de fusiones. Son más los marcadores que comparten las tres líneas, si bien puede observarse que las líneas C4L2 y C7L1 con morfología, respuesta hormonal y patrón de metástasis similares, poseen igual número de fusiones. Habría que ver las otras líneas no estudiadas y con características similares a la línea C4L1 si poseen un cariotipo similar al de ésta.

Nuestra atención siempre estuvo puesta en el rol de los progestágenos en el crecimiento tumoral. En este sentido, el receptor de progesterona mapea en el cromosoma 9, que se encuentra en trisomía y tetrasomía en las tres líneas. El receptor de estrógenos alfa está localizado en el cromosoma 10, que se encuentra formando parte de uno de los marcadores y también está alterado su número. Desconocemos si esto tiene significado en la regulación de dichos genes. El oncogen *c-myc* mapea en el cromosoma 15 de ratón (Adams et al. 1983), que se observó en trisomía y tetrasomía en dos de nuestras líneas. En líneas celulares de hepatoma de rata inducidos por dietilnitrosamina también se observó la amplificación del oncogen *c-myc* por la presencia de trisomías y tetrasomías del cromosoma 7, donde se encuentra localizado, y por estudios de DNA y RNA (Holecek et al. 1989). Por otra parte, el oncogen erbB-2 se encuentra amplificado en cáncer de mama humano (Xing et al. 1996) y en el tumor

C4-HD (resultados no publicados) y estaría también amplificado en nuestras líneas, por el hecho de observarse trisomías, tetrasomías y pentasomías del cromosoma 11, donde está localizado. Otros estudios mostraron la amplificación de este oncogen en dos de las líneas, en las cuales se observaron pentasomías en una gran proporción de metafases, si bien todas las metafases de las tres líneas presentaron más de tres cromosomas de este par.

Por último, es necesario enfatizar que este trabajo de Tesis de Licenciatura abre una puerta a un campo de estudio no muy explorado y ha contribuido a la caracterización de líneas celulares de cáncer de mama murinas. En este trabajo se han encarado los estudios de tres de dichas líneas, pero hasta la fecha se están caracterizando 6, 5 de las cuales derivan del mismo tumor. Las principales características de cada una se muestra en el Cuadro 1. Estas líneas son únicas en cuanto que expresan receptores hormonales y pueden ser reguladas para su crecimiento "in vitro" en el caso de la C4L2 y C7L1 o "in vivo", como es el caso de la C4L1 (resultados no publicados). Ofrecen la ventaja, con respecto a las líneas equivalentes humanas, que son transplantables en ratones BALB/c, o sea que no es necesario requerir de ratones inmunológicamente suprimidos para realizar xenotransplantes. Debido a que son metastásicas, son útiles para estudiar mecanismos asociados a invasión y metástasis. Por otra parte, al disponer de los tumores parentales, los cultivos primarios y varias líneas derivadas de un mismo tumor, se pueden estudiar los cambios citogenéticos ligados a la inmortalización.

En la práctica, el conocimiento del cariotipo y del número cromosómico modal nos permite realizar un seguimiento de la evolución de las líneas celulares.

# CONCLUSIONES

En este trabajo de seminario se estudió el cariotipo de tres líneas celulares, dos de ellas originadas a partir de un adenocarcinoma mamario murino progestágeno-dependiente y la otra derivada de un tumor progestágeno-independiente, ambos originados por MPA.

Podemos concluir que:

- Las tres líneas celulares analizadas poseen alteraciones estructurales y numéricas en su cariotipo.
- Las tres líneas celulares comparten marcadores cromosómicos.
- Los eventos que originaron a los marcadores podrían estar relacionados con una etiopatogenia común.
- No habría una asociación aparente entre respuesta hormonal y marcadores diferenciales.

# BIBLIOGRAFÍA

- Adams J, Gerondakis S, Webb E, Corcoran LM, Cory S. Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to the immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *Proc Natl Acad Sci* 80: 1982-1986, 1983.
- Afify A, Bland KI, Mark HFL. Fluorescent in situ hybridization assesment of chromosome 8 copy number in breast cancer. *Breast Can Res Treat* 38: 201-208, 1996.
- Ali IU, Lidereau R, Thelliet C, Callahan R. Reduction to homozygosity of genes on chromosome 11 in human breast neoplasia. *Science* 238: 185-188, 1987.
- Alonso DF, Farías EF, Urtreger A, Ladeda V, Vidal MC, Bal de Kier Joffé E. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg. Onc.* 62: 288-297, 1996.
- Au W, Soukup SW and Mandubur TI. Excess chromosome 4 in ethylnitrosourea-induced neurogenic tumor lines of the rat. *J. Nat. Cancer Inst.* 59: 1709-1716, 1977.
- Bal de Kier Joffé E, Puricelli L, Vidal MCC, Sacerdote de Lustig E. Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability. *J Exp Clin Cancer Res* 2: 151-160, 1983.
- Balsara BR, Varughese T, Bhat AV, Rao RS, Bhisey A. Cytogenetic studies on a patient with prepubertal breast cancer: a case report. *Breast Cancer Res Treat* 39: 343-347, 1996.
- Bianchi M, Larramendy M, Zabala J, Merani S, Bianchi N. Cambios cromosómicos específicos del sarcoma 180 murino. *Mendeliana* 2:25-37, 1977.
- Bianchi NO, Ayres J. Heterochromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from African Green Monkey (*Cercopithecus Aethiops*). *Exp. Cell Res.* 65: 253-258, 1971.
- Bradley CJ, Kledzik GS, Meites J. Prolactin and estrogen dependency of rat mammary cancers at early and late stages of development. *Cancer Res* 36: 319-324, 1976.
- Cairns J. The origin of human cancers. *Nature* 289:353-357, 1981.
- Callahan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: Their potencial relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 39: 33-44, 1996.
- Campio L, Robustelli Della Cuna G, Taylor RW (eds). Role of medroxyprogesterone in endocrine-related tumors, Vol 2. Raven Press, New York, 1983.
- Clarke R. Animal models of breast cancer: Their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res Treat* 39: 1-6, 1996.
- Cooper GM. Oncogenes. Jones and Bartlett Publishers cap 8: 109-119, 1990.
- Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: Standard karyotype of the mouse, *Mus musculus*. *J Hered* 63: 69-72, 1976.
- De Kleim A, Van Kessel AG, Grosfeld G, Bartam CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 300: 765-767, 1982.
- De Salum SB, Suarez HG, Pavlovsky A. Chromosome serial studies of a cultured cell line (GH7) from a human lymphosarcoma. *European J Clin Biol Res.* 16: 711-714, 1971.

- De Salum SB, Larripa I, Damonte EB, Cotto C. Análisis citogenético de líneas celulares vero. Medicina (Buenos Aires) 38: 513-518, 1978.
- Debiec-Rychter M, Azuma M Zukowski K, Oyasu R, Wang CY. Specific chromosome change associated with acquisition in vivo of tumorigenicity in carcinogen-induced rat urinary bladder carcinoma cells. Genes Chromosomes Cancer 3: 221-230, 1991.
- Delpierre MA, Panihel J. In vitro ageing evolution of immunocompetence in long term normal lymphoid cell cultures. Nature 254: 62-63, 1975.
- Dofuku R, Biedler JL, Spengler BA, Old LJ. Trisomy of chromosome 15 in spontaneous leukemia of AKR mice. Proc Natl Acad Scie 72: 1515-1517, 1975.
- Dofuku R, Utakoji T, Matsuzawa A. Trisomy of chromosome #13 in spontaneous mammary tumors of GR, C3H, and noninbred Swiss mice. JNCI 63: 651-656, 1979.
- Doll R., Peto R. The cause of cancer. JNCI 66: 1191-1265, 1981.
- Dougall WC, Quian X, Peterson NC, Miller MJ, Samanta A, Greene MI. The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and envolving therapies. Oncogene 9: 2109-2123, 1994.
- Engel LW, Young NA. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. Cancer Res. 38: 4327-4349, 1978.
- Engel LW, Young NA, Talka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. Cancer Res 38: 3352-3364, 1978.
- Fisher B. A biological perspective of breast cancer: contributions of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Clinical Trials. CA 41: 97, 1991.
- García Heras J, Herrera J, Lovell M, Coco I, Coco R. Induction of sister chromatid exchanges in mouse kidney fibroblasts by medroxyprogesterone acetate. Medicina (Buenos Aires) 42: 250, 1982.
- Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, Gollarhon L, Sakaguchi M, Westerfield M, Kodagoda D, Stasny V, Cunningham HT, Wistuba II, Tomlinson G, Tonk V, Ashfaq R, Leitch AM, Minna JD, Shay JW. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. Int J Cancer 78: 766-774, 1998.
- Gebhart E, Bruderlein S, August M, Siebert E, Feldner J, Schmidt W, Cytogenetics on human breast cancer. Breast Can Res Treat 8: 125-138, 1986.
- Hankey BF. Breast, in Cancer Statistics Review 1973-1989. NIH, Pub. No. 92-2789, IV. 1-20, 1992.
- Hinds PW, Weinberg RA. Tumor supressor genes. Current Opinions in Genetics and Development 4: 135-141, 1994.
- Holecek BU, Kerler R, Rabes HM. Chromosomal analysis of a diethylnitrosamine-induced tumorigenic and a nontumorigenic rat liver cell line. Cancer Res. 49: 3024-3028, 1989.
- Hughes DT. Cytogenetical polimorphism and evolution in mammalian somatic cell populations in vivo and in vitro. Nature 217: 518-523, 1968.

- Kano-Tanaka K, Tanaka T. Specific chromosome changes associated with viral transformation of rat glial cells. *Int. J. Cancer.* 30: 495-501, 1982.
- Kelsey JL, Berkowitz GS. Breast cancer epidemiology. *Cancer Res* 48: 5615-5623, 1988.
- Kerangueven F, Allione F, Noguchi T, Adelaide J, Sobol H, Jacquemier J, Birnbaum D. Patterns of loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 13q suggest a possible involvement of BRCA2 in sporadic breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 13: 291-294, 1995.
- Kerangueven F, Eisinger F, Noguchi T, Allione F, Wargniez V, Eng C, Padberg G, Theillet C, Jacquemier J, Logy M, Sobol H, Birnbaum D. Loss of heterozygosity in human breast carcinomas in the ataxia telangiectasia, Cowden disease and BRCA1 gene regions. *Oncogene* 14: 339-347, 1997.
- Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15: 659-670, 1979.
- Kordon E, Molinolo AA, Pasqualini CD, Dran G, Lanari C. Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between hormone dependence and morphology. *Breast Cancer Res. Treat.* 28: 29-39, 1993.
- Kritchevsky D. Diet and cancer, in *Clinical Oncology*. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 125-132, 1991.
- Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Cancer Lett* 33: 215-223, 1986.
- Lanari C, Montecchia F, Pazos P, Simian M, Vanzulli S, Lamb C, Molinolo AA. Inducción de adenocarcinomas mamarios por progestágenos en ratones BALB/c. Progresión del tumor hormono-dependiente al autónomo. *Medicina (Buenos Aires)* 57 (supl II): 55-69, 1997.
- Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16, 1992.
- Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 21: 1131-1147, 1958.
- Lo YL, Yu JC, Huang CS, Tseng SL, Chang TM, Chang KJ, Wu CW, Shen CY. Allelic loss of the BRCA1 and BRCA2 genes and other regions on 17q and 13q in breast cancer among women from Taiwan (area of low incidence but early onset). *Int J Cancer* 79: 580-587, 1998.
- López-Otín C, Diamandis EP. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocrine Reviews* 19: 365-396, 1998.
- McBain JA, Weese JL, Meisner LF, Wolberg WH, Willson JK. Establishment and characterization of human colorectal cancer cell lines. *Cancer Res.* 44: 5813-5821, 1984.
- McCallum HM, Lowther GW. Long-term culture of primary breast cancer in defined medium. *Breast Cancer Res Treat* 39: 247-259, 1996.
- Mitchell ELD, Santibanez-Koref MF. 1p13 is the most frequently involved band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer. *Genes, Chromosomes Cancer* 2: 278-289, 1990.
- Mitelman F, Levan G. The chromosomes of primary 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat sarcomas. *Hereditas* 71: 325-334, 1972.
- Mitelman F. Catalogue of chromosome aberrations in cancer. *Cytogenet Cell Genet* 36: 1-516, 1983.

- Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 79: 1341-1350, 1989.
- Moller JO, Esteve J, Moller H, Renard H. Cancer in the European Community and its member states. *Eur. J. Cancer* 26: 1167-1256, 1990.
- Muller WJ, Pattengale PK, Wallace R, Leder P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54: 105-115, 1988.
- Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 46: 2203-2207, 1986.
- Ohno S, Kovacs ET, Kinoshita R. A robertsonian type of chromosomal change in L4946 mouse ascites lymphoma. *JNCI* 24: 1187-1197, 1960.
- Pandis N, Heim S, Bardi G, Limon J, Mandahl N, Mitelman F. Improved Technique For short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. *Genes Chromosome Cancer* 5: 14-20, 1992.
- Pathak S. Cytogenetics of epithelial malignant lesions. *Cancer*, suppl 70:1660-1670, 1992.
- Pierce SM, Harris JR. The role of radiation therapy in the management of primary breast cancer. *CA* 41: 85, 1991.
- Prahdala S, Carroad E, Cukierski M, Hendrickx AG. Embriotoxicity of medroxyprogesterone acetate (MPA) and maternal serum MPA concentration in Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Teratology* 32: 421, 1985.
- Rowley JD. Do human tumors show a chromosome pattern specific for each etiologic agent?. *JNCI* 52: 315-320, 1974.
- Ruddon RW. *Cancer Biology*. Oxford University Press cap1: 3-11, 1995.
- Sacco MG, Gribaldo L, Barbieri O, Turchi G, Zucchi I, Collotta A, Bagnasco L, Barone D, Montagna C, Villa A, Marafante E, Vezzoni P. Establishment and characterization of a new mammary adenocarcinoma cell line derived from MMTV *neu* transgenic mice. *Breast Cancer Res Treat* 47: 171-180, 1998.
- Sandberg AA, Turc-Carel C. The Cytogenetics of solid tumors: Relation to diagnosis, clasification y pathology. *Cancer* 59: 387-395, 1987.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* ii: 971-972, 1971.
- Soule HD, Vazquez A, Long A, Albert S, Brennan MA. Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409-1413, 1973.
- Sugiyama T, Kurita Y, Nishizuka Y. Chromosome abnormality in rat leukemia induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Science* 158: 1058-1059, 1967.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatine. *Exp Cell Res* 75: 304-306, 1972.
- Sun M. Panel syas Depo –Provera not proved safe. *Science* 226: 950-951, 1984.
- Steenis HV. Chromosomes and cancer. *Nature* 209: 819-821, 1966.

- Teich NM. Oncogenes and cancer. In Introduction to the cellular and molecular biology of cancer (Franks LM, Teich NM, eds.). Oxford University Press Cap 9: 169-201, 1997.
- Theilen GH, Kawakami TG, Rush JD, Munn RJ. Replication of cat leukemia virus in cell suspension cultures. *Nature* 222: 589-590, 1969.
- Trent JM. Cytogenetic and molecular biologic alterations in human breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat.* 5: 221-229, 1985.
- Tyrkus M, Diglio CA, Gohle N. Karyotype evolution in a transformed rat cerebral endothelial cell line. *Int J Cancer* 32: 485-490, 1983.
- Wake N, Isaacs J, Sandberg AA. Chromosomal changes associated with progression of the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system. *Cancer Res* 42: 4131-4142, 1982.
- Whan-Peng J, Lee EC, Kao-Shan CS, Seibert K, Lippman M. Cytogenetic studies of human breast cancer lines: MCF-7 and derived variant sublines. *JNCI* 71: 687-695, 1983.
- Worton RG, Duff C. Cell culture: karyotyping. *Methods Enzymol.* 58:322-344, 1979.
- Xing WR, Gilchrist KW, Harris CP, Samson W, Meisner LF. FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer. *Breast Can Res. Treat.* 39: 203-212, 1996.
- Yasumura T, Kawakita Y. Vero, monkey cell line. *Nippon Rincho* 21: 1201, 1963.
- Yeung KS, McKeown-Eysse GS, Li GF, Glazer E, Hay K, Child P, Gurgin V, Zhu SL, Baptista J, Aloe M, Mee D, Jazmaji V, Austin DF, Li CC, Bruce WR. Comparisons of diet and biochemical characteristics of stool and urine between Chinese populations with low and high colorectal cancer rates. *JNCI* 83: 46-50, 1991.
- Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221: 227-235, 1983.
- Yunis JJ, Soreng AL. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226: 1199-1203, 1984.