

## Tesis de Licenciatura

# Caracterización morfológica e inmunohistoquímica de líneas celulares obtenidas de adenocarcinoma mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) : Correlación con distintos patrones de comportamiento

Pagano, Eleonora

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:

Pagano, Eleonora. (). Caracterización morfológica e inmunohistoquímica de líneas celulares obtenidas de adenocarcinoma mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) : Correlación con distintos patrones de comportamiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

### Cita tipo Chicago:

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000665\\_Pagano](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000665_Pagano)  
Pagano, Eleonora. "Caracterización morfológica e inmunohistoquímica de líneas celulares obtenidas de adenocarcinoma mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) : Correlación con distintos patrones de comportamiento". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000665\\_Pagano](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000665_Pagano)

**EXACTAS** UBA

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**

*“ Caracterización morfológica e inmunohistoquímica de líneas celulares  
obtenidas de adenocarcinoma mamarios murinos inducidos por acetato  
de medroxiprogesterona (MPA). Correlación con distintos patrones de  
comportamiento. ”*

**Autora : Eleonora Pagano**

**Director: Alfredo Molinolo**

**I B y M E**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**1999**

*A mi hija, Azul*



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer muy especialmente

A Claudia y Alfredo, quienes, no sin una buena dosis de paciencia, me han enseñado mucho en estos dos años. Gracias por darme la oportunidad de iniciarme en la carrera científica.

A mis compañeras de laboratorio, Carolina, Luisa y Victoria. Tengo la sensación de que, en alguna medida, hemos crecido mucho juntas.

A Silvia, siempre dispuesta a darme una explicación hasta el último detalle. Gracias, porque a pesar de no tener ni un minuto libre me salvaste a último momento.

A la gente de la “becucueva”, quienes nunca me negaron una sonrisa ni una “tacita de azúcar”.

A las chicas del laboratorio 213, por la simpatía que siempre me prodigaron. A la Dra. Elizalde por facilitarme el anticuerpo  $\alpha$  c-erbB-2.

A todo el laboratorio del Dr. Calvo, que en más de una ocasión me han ofrecido más que una mano.

Al Dr. Calandra, por permitirme tan gentilmente usar el microscopio de su laboratorio, incluso a cualquier hora, hasta que tuvimos el nuestro.

Al Dr. De Nicola y a su grupo, por facilitarme la toma de fotos en su laboratorio.

A la Dra. Isabel Luthy, por su gentileza en los últimos momentos de stress.

A Nacho, que me brindó su amistad casi sin conocerme.

A Mercedes, quien se merece todo mi respeto, porque además de encontrar en ella una muy buena persona descubrí una mente admirable.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental, que me ha permitido realizar allí este trabajo de seminario.

A la Fundación Sales por su apoyo económico.

A Marce y a Eve, quienes, cada una a su manera, me hicieron ver la vida con una perspectiva distinta, y sobre todo, por ser tan buenas amigas.

A Pau, con quién compartí mi carrera desde el primer día y tantas cosas hemos pasado juntas que he llegado a sentirte como una hermana.

A mi familia.

A mi mamá le agradezco el decir siempre primero “sí” y recién después “qué” y el apoyo que brindó a mi educación durante toda mi vida. Creo que no hubiera podido recibirme si tu ayuda.



A mi abuela, le agradezco todo, el cariño, la confianza, la ayuda que me dio al cuidar a Azul para que yo pudiera estudiar tranquila sabiendo que mi hija estaba en buenas manos, y por supuesto, el bizcochuelo y el mate.

A mi abuelo, quien siempre creyó que yo podía hacer grandes cosas. Me hubiese gustado que llegaras a verme recibida.

A Maxi, por toda su ayuda, aunque jamás comprenda lo que esto significa para mí. Y a su familia.

A mi hija, porque ella también se recibe conmigo. En sus chiquitos pero sabios 5 años la mejor compañía, el mejor estímulo, la sonrisa más linda me la diste vos. Gracias!!!

## RESUMEN

Nuestro laboratorio ha estado trabajando desde hace varios años en el modelo de carcinogénesis mamaria inducida por la administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona (MPA) en ratones BALB/c. Estos adenocarcinomas mamarios murinos son generalmente dependientes de progestágenos (PD) pero se pudieron obtener variantes independientes (PI) que conservan receptores para estrógenos (ER) y progesterona (PR). En muchos trabajos realizados con el fin de conocer el patrón de comportamiento de estos tumores han sido efectuados en cultivos primarios. Así se ha demostrado que el MPA y la progesterona tienen un efecto estimulatorio y el estradiol un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular y que el PR estaría involucrado tanto en el crecimiento autónomo como en el dependiente, en este último a través de factores séricos (como el bFGF).

Dado que los cultivos primarios presentan limitaciones en la evaluación de ciertos mecanismos genéticos, en nuestro laboratorio se han desarrollado 6 líneas celulares de crecimiento *in vitro*, 5 a partir del tumor PD C4HD y 1 a partir del tumor PI C7HI y todas ellas han sido reinoculadas *in vivo*.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica y funcionalmente estas líneas, mediante técnicas de histología convencional e inmunocitoquímica. En cultivos celulares se determinó: el tipo de filamento intermedio para comprobar la estirpe epitelial; la presencia de receptores hormonales para correlacionarla con su respuesta hormonal; la presencia de c-erbB-2 y caderina como marcadores de diferenciación celular y malignidad. En las líneas celulares creciendo *in vivo* se evaluaron el patrón de crecimiento, la capacidad metastásica, y la secreción de mucopolisacáridos neutros o ácidos. Todas las líneas fueron de estirpe epitelial y expresaron PR y ER en cultivo y en tejido; algunas adquirieron la expresión de vimentina posiblemente a causa de la dediferenciación que han sufrido al ser cultivadas. A diferencia de la línea C7L1, las líneas provenientes del tumor C4HD expresaron intensamente c-erbB-2, tal como el tumor parental. Todas las líneas expresaron caderina. Las líneas C4L2 y la C7L1 mostraron los fenotipos histológicamente más agresivos, la primera de aspecto sarcomatoide y la segunda, indiferenciado; ambas metastatizaron en múltiples sitios. El resto de las líneas sólo presentó metástasis pulmonares. En definitiva, considerando la poca disponibilidad de

líneas PR+/ER+, estas líneas epiteliales de cáncer de mama murinas auguran ser una herramienta muy útil en la disección de los mecanismos genéticos y moleculares que subyacen a la progresión maligna.

  
**ALFREDO A. BOLINOLO**  
BIOLOGO  
I.N. 52457

  
ELEONORA  
TASANO



## **ABREVIATURAS**

**DMBA:** dimetilbenzantraceno

**E<sub>2</sub>:** estradiol

**ER:** receptor de estrógenos

**ICQ:** técnica inmunocitoquímica

**IHQ:** técnica inmunohistoquímica

**MMTV:** virus del tumor mamario murino

**MNU:** metilnitrosourea

**MPA:** acetato de medroxiprogesterona

**P(1):** pasaje (de tumor en animales singeneicos) número ( )

**PD:** progestágeno-dependiente

**Pg:** progesterona

**PI:** progestágeno-independiente

**PR:** receptor de progesterona

**R(1):** repique (de células en cultivo) número ( )

## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
I. El cáncer de mama .....	1
A. Epidemiología .....	1
B. Incidencia y etiología .....	1
1. Factores Genéticos .....	2
2. Factores Ambientales .....	2
3. Factores Hormonales .....	3
C. Clasificación .....	5
D. Modelos animales .....	8
II. Modelos experimentales del cáncer de mama .....	10
A. Modelos <i>in vivo</i> .....	10
1. Carcinogénesis química .....	10
2. Carcinogénesis viral o biológica .....	12
3. Animales transgénicos .....	13
4. El ratón <i>nude</i> y los xenotransplantes de líneas celulares .....	17
B. Modelos <i>in vitro</i> .....	21
1. Líneas celulares .....	21
a. Receptores hormonales y Respuesta hormonal .....	23
b. Filamentos intermedios .....	26
c. C-erbB-2 .....	28
d. Caderina .....	30
III. Modelo de carcinogénesis experimental inducida por MPA .....	32
A. Características morfológicas .....	32
B. Características biológicas .....	35
C. Desarrollo de líneas tumorales .....	37
OBJETIVOS .....	38
MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
RESULTADOS .....	47
C4L1 .....	47

C4L2 .....	51
C4L3 .....	56
C4L4 .....	59
C4L5 .....	63
C7L1 .....	67
Tabla de resultados .....	70
 DISCUSIÓN .....	 71
 CONCLUSIONES .....	 78
 BIBLIOGRAFÍA.....	 79



# I N T R O D U C C I O N

## **I. EL CANCER DE MAMA**

### **A. Epidemiología**

El cáncer de mama causa el 20% de las muertes por cáncer entre las mujeres y es la causa principal de muerte entre las mujeres norteamericanas entre los 40 y los 55 años (National Center for Health Statistics, 1990). La incidencia ha venido creciendo sostenidamente desde hace 80 años, de forma tal que del total de la población femenina de E.E.U.U. casi una de cada nueve mujeres desarrollará cáncer de mama en algún momento de su vida, el 12% tendrá un diagnóstico positivo de tumor mamario y el 3.5% morirá a causa de esta enfermedad (Harris et al, 1992a). La tasa ajustada de muerte por edad se ha mantenido estable por los últimos 30 años (actualmente 27/100.000) lo que se debería en parte a estadísticas más completas, una detección más temprana, una mayor incidencia de formas de mejor evolución (tumores localizados y con receptores hormonales)(Glass and Hoover, 1990) o avances en los tratamientos (Harris et al, 1992c). Cada año 43.000 mujeres mueren de esta enfermedad por lo que se explica la atención y la publicidad que ha recibido y el que sea foco de intenso estudio en cuanto a sus orígenes, métodos de diagnóstico y tratamiento. A pesar de que mucho se ha avanzado, particularmente con el diagnóstico temprano, es llamativo que una neoplasia que aparece en un órgano expuesto, accesible por lo tanto a la autoexaminación y al diagnóstico clínico, cobre todavía tantas vidas.

### **B. Incidencia y Etiología.**

El cáncer de mama es raro en mujeres menores de 25 años, excepto en ciertos casos familiares (como en pacientes portadoras del gen BCRA 1) y a partir de la cuarta década donde empiezan a incrementarse las tasas de incidencia. Después de la menopausia la incidencia sigue en aumento, un 2,1% por año (Henderson et al, 1993) pero mucho menos dramáticamente que antes.

Basados en la incidencia de esta enfermedad en los distintos grupos se pueden resumir los factores de riesgo en los siguientes:

- 1. Genéticos**
- 2. Ambientales**
- 3. Hormonales**

## **1. Factores Genéticos**

La magnitud del riesgo está directamente relacionado con el número de parientes que han tenido cáncer de mama y la edad en que lo han desarrollado (cuanto más joven la pariente y/o cuantas más parientes con cáncer bilateral, mayor la predisposición genética). Existen pocas familias con una transmisión de un gen autosómico dominante asociado a carcinomas de mama y ovario, el llamado síndrome de Li-Fraumeni (carcinomas y sarcomas múltiples) en el cual el cáncer de mama afecta al 25% de las pacientes y está asociado a una mutación en el gen supresor p53. El 5% de todos los tipos de cáncer de mama, especialmente el que afecta a mujeres entre los 30 y 40 años, con una probabilidad de heredarlo de 1 en 200, y al haberlo heredado un riesgo del 80 al 90 % de efectivamente desarrollar cáncer, está asociado a la presencia de un gen en el cromosoma 17 (locus 17q21), llamado BCRA1 (*breast cancer region*) (Hall et al, 1990) también ligado al cáncer de ovario (Narod et al, 1991).

## **2. Factores ambientales**

Las grandes variaciones en las tasas de cáncer de mama entre países y a través del tiempo dentro de los países y los incrementos en las tasas migratorias de naciones con baja incidencia a otras con incidencias mayores indican que existen determinantes no genéticos importantes del cáncer de mama. Es necesario conocer estos determinantes para identificar cual es el grupo de mujeres que puede beneficiarse con un control frecuente y tratamientos de profilaxis así como con un posible cambio de las costumbres socioculturales.

En cuanto a la diferencia entre países, es de notar que si bien las tasas mundiales tienden a aumentar, son sorpresivamente bajas en los países orientales respecto de los occidentales (en Japón, por ejemplo, la incidencia total es sólo un quinto de la de E.E.U.U.). Un dato revelador es que hace 200 años las jóvenes de E.E.U.U. tenían su menarca a los 17 años, como las jóvenes chinas, pero hoy en día las primeras la tienen a los 12.8 años mientras que las segundas se mantienen en la misma media.

La composición en grasas de la dieta ha sido tema de discusión, en gran parte debido a las diferencias halladas entre países. Sin embargo, varios estudios epidemiológicos han sido llevados a cabo desmintiendo esta teoría, sólo comprobando que la ingesta total de



calorías está relacionada con el cáncer de mama (Willet et al, 1989 y Willet et al, 1997). En algunos estudios se ha encontrado una relación inversa entre el cáncer de mama y la ingesta total de vitamina A (en Harris et al, 1992a) y se ha comprobado el efecto protector de la lactancia. Las dietas macrobióticas y/o vegetarianas (como las adoptadas por los Adventistas del Séptimo Día) caracterizadas por alimentos como la soja, el tofu y el miso, los cuales contienen un alto porcentaje de fitoestrógenos (compuestos con efectos estrogénicos y antiestrogénicos *in vivo* e *in vitro*) han demostrado tener un efecto anticarcinogénico en tumores experimentales inducidos con NMU o DMBA. Es de notar, sin embargo, que las concentraciones halladas en humanos de ciertos fitoestrógenos, como la genisteína o las isoflavonas, son mucho menores que las que tienen un efecto positivo *in vitro* (en Murkies et al, 1998).

Se ha analizado una gran cantidad de variables en cuanto a su asociación con el riesgo de contraer cáncer de mama, aunque muchas no indican causa en absoluto sino asociaciones, como por ejemplo la clase socioeconómica (mayor riesgo en la clase alta) así como el estado social (mayor riesgo para las solteras), la ingesta de alcohol (riesgo moderado) y de café (sin riesgo asociado), etc.(Harris et al, 1992a). La exposición a radiaciones ionizantes, particularmente entre la pubertad y los 30 años, incrementa sustancialmente el riesgo aunque exposiciones clínicamente importantes raramente ocurren (como lo serían radioscopías repetidas o una bomba atómica).

El rol de los virus ha sido estudiado desde que Bittner descubriera un agente filtrable, transmisible a través de la leche materna a ratones en amamantamiento (Bittner, 1936). Se han encontrado secuencias del MMTV (*mouse mammary tumor virus*), un retrovirus, en algún tipo de cáncer de mama humano (Wang et al, 1995) aunque no existen evidencias para considerarlo un agente etiológico.

### **3. Factores hormonales**

Como principales factores de riesgo se pueden nombrar:

- menarca temprana
- menopausia tardía
- nuliparidad
- primer parto luego de los 30 años

- embarazos sin término
- obesidad
- terapia estrogénica de reemplazo
- anticonceptivos orales

En general, el riesgo es atribuible a la mayor exposición a las hormonas sexuales durante la vida de la persona, debida, por ejemplo a una menarca temprana (variable que tiene gran peso entre las diferencias internacionales) y una menopausia tardía. El primer embarazo a una edad temprana (y el segundo también) reduce el riesgo de contraer cáncer de mama. El efecto protector del embarazo como inductor de la diferenciación de la glándula mamaria ha sido comprobado por varios estudios experimentales en los cuales se le atribuye esta función a la gonadotrofina coriónica sintetizada por la placenta, tanto si la preñez o la administración de la hormona ocurren antes (Russo, 1983) o después (Russo, 1990) de la exposición a un carcinógeno químico. Por tanto, la nuliparidad privaría a la glándula mamaria de diferenciarse y un primer parto tardío retrasaría esta diferenciación.

La idea de que la exposición a los estrógenos aumenta el riesgo de cáncer de mama está muy difundida ya que existen varias evidencias que la apoyan, como el hecho de que una mujer que ha sufrido una ooforectomía de joven raramente desarrolla este cáncer y que, por el contrario, aún la exposición prenatal a este tipo de hormonas afecta las probabilidades de una persona de desarrollarlo (Ekbom et al, 1991). Estudios epidemiológicos realizados en mujeres postmenopáusicas tratadas con estrógenos como terapia de reemplazo (ERT) muestran que su riesgo de contraer cáncer es un 40% más elevado que el de las mujeres que nunca han tenido ese tratamiento y que el riesgo disminuye una vez que se abandona el mismo (Harris et al, 1992a). En otros estudios, sin embargo, poniendo de manifiesto lo controvertido del tema, la utilización de ERT contribuye con un factor de riesgo del 3,5% por año de uso al cáncer de endometrio y con un 2,1% al cáncer de mama, con un riesgo que dura de por vida luego de 5 años de uso (Henderson et al, 1993). La utilización de anticonceptivos combinados orales (COC) aumenta el riesgo de cáncer de mama en un 3,1% por año de uso en mujeres tratadas por debajo de los 45 años y produce un incremento del 9% en la incidencia, pero por encima de esta edad no se observa un cambio en el grado de riesgo con el uso de COC (Henderson et al, 1993). La combinación de progestágenos con la terapia estrogénica para prevenir el

riesgo de cáncer de endometrio no sólo no disminuye el riesgo de cáncer de mama sino que le añade (Bergkvist et al, 1989) con varias líneas de evidencia experimentales, sugiriendo una acción decididamente carcinogénica de los progestágenos, como el acetato de medroxiprogesterona o MPA, sobre la glándula mamaria (Lanari et al, 1986b y Russo et al, 1989).

Las mujeres premenopáusicas obesas tienen un riesgo de cáncer de mama menor que mujeres de la misma edad pero sin sobrepeso, mientras que las mujeres *postmenopáusicas* con sobrepeso tienen un riesgo mayor. La obesidad premenopáusica se caracteriza por frecuentes ciclos anovulatorios, lo cual disminuye la exposición de la glándula mamaria tanto a los estrógenos como a la progesterona (Henderson et al, 1993). Como la grasa corporal también es una fuente estrogénica debido a la aromatización de la androstenediona que allí tiene lugar (Cotran et al, 1994), después de la menopausia, donde el nivel de hormonas declina, esta contribución podría volverse más importante en el incremento del riesgo de cáncer de mama.

### **C. Clasificación**

Los tumores pueden ser clasificados histológicamente (Harris et al, 1992b y WHO Histologic Typing of Breast Tumors, 1982) como:

1. No invasor
  - a. Carcinoma intraductal
  - b. Carcinoma intraductal con enfermedad de Paget
  - c. Carcinoma lobulillar (o lobular) in situ
2. Invasor
  - a. Carcinoma ductal invasor
  - b. Carcinoma ductal invasor con enfermedad de Paget
  - c. Carcinoma lobulillar invasor
  - d. Carcinoma medular
  - e. Carcinoma coloidal
  - f. Carcinoma tubular
  - g. Carcinoma cístico adenoide
  - h. Carcinoma apócrino
  - i. Carcinoma papilar invasor



## **1. No invasores**

### **1a. Carcinoma intraductal no invasor**

Es definido como una población de células malignas que no han invadido el estroma. Sin embargo estas células pueden diseminarse a través del sistema de conductos y producir extensas lesiones involucrando regiones enteras de una mama. Histológicamente, estos tumores se dividen en cinco subtipos:

- Comedocarcinoma. Caracterizado por un rápido crecimiento de células altamente malignas. Las células en el centro de los conductos se encuentran frecuentemente necróticas y calcificadas. Presentan aspecto de “comedón”.
- Sólido
- Cribiforme. Presenta estructuras tipo conducto dentro de los conductos primarios dilatados (aspecto de “colador”).
- Papilar
- Micropapilar

El comedocarcinoma, y probablemente también los otros subtipos, serían precursores de tumores invasor.

### **1c. Carcinoma lobulillar in situ**

Esta lesión se caracteriza por la proliferación celular de uno o más conductos y/o conductillos (acinos) terminales, por células pobremente cohesivas y un poco más grandes de lo normal, con raras mitosis y núcleos ovales o redondos con pequeños nucleolos.

## **2. Invasores**

### **2a. Carcinoma ductal invasor**

Representa entre un 65 y un 80% de los cánceres de mama siendo el tipo más común. La mayoría exhibe un estroma denso y fibroso, dando al tumor una consistencia dura (carcinoma “escirroso”). Este crecimiento ocurre como nódulos delimitados de consistencia dura, similar a una piedra. Infiltra las estructuras circundantes pudiendo fijarse a la pared del tórax. En casos avanzados presenta característicamente el aspecto de “piel de naranja” a causa del edema entre los folículos pilosos. El pezón frecuentemente está retraído. Histológicamente, el tumor consta de células malignas dispuestas en cordones,

nidos sólidos, túbulos, glándulas y masas anastomosadas. Las células claramente invaden el estroma conectivo. El detalle citológico de estas células varía desde pequeñas células con núcleos regulares moderadamente hipercromáticos a células enormes con núcleos grandes hipercromáticos e irregulares. Frecuentemente se encuentra invasión de los espacios perivasculares y perineurales así como de los vasos sanguíneos y linfáticos. Los tumores son definidos de acuerdo al grado de atipia nuclear, de diferenciación histológica (formación de túbulos) y del número de mitosis por campo de mayor aumento en bien, moderada y pobremente diferenciados.

### **2b. Enfermedad de Paget**

Esta es una forma de carcinoma ductal invasor que aparece en los conductos principales y se extiende intraepitelialmente involucrando la piel del pezón y la areola, que se observa fisurada y ulcerada, rodeados por hiperemia inflamatoria y edema.

### **2c. Carcinoma lobulillar invasor**

Este tipo de cáncer mamario probablemente surge de los conductos terminales del lóbulo mamario. Aunque sólo representa entre un 5 a un 10% de los carcinomas de mama es de interés porque: tienden a ser bilaterales con más frecuencia que el resto y a ser multicéntricos dentro de la misma mama. Histológicamente, consta de líneas de células tumorales infiltrantes, usualmente una célula detrás de otra, dispersas en una matriz fibrosa. Nidos y hojas de formas irregulares suceden al patrón característico de “fila india”.

### **2d. Carcinoma medular**

Está constituido por células muy atípicas y está rodeado por una banda linfocitaria. No tiene la típica desmoplasia (formación de tejido fibroso) del carcinoma común. Los focos de necrosis y hemorragias son grandes y numerosos. Aún cuando hubiese metástasis axilares la tasa de supervivencia a 10 años es mayor al 70%.

### **2e. Carcinoma coloidal o mucinoso**

Esta variedad poco usual se da en mujeres mayores y se desarrolla lentamente con el paso de los años. El tumor es extremadamente blando y tiene la apariencia de una gelatina

gris-azulada pálida. Puede darse en una forma pura, donde al menos el 75% del tumor es mucinoso, o en una forma mixta con otros tipos de carcinomas infiltrantes.

## **D. Modelos animales del cáncer de mama**

### **1. Rata**

La glándula mamaria de la rata es hoy en día uno de los modelos de carcinogénesis mamaria más ampliamente utilizado ya que existen cepas que desarrollan tumores mamarios espontáneos, que responden a una variedad de carcinógenos químicos y a radiación, y que desarrollan tumores hormonodependientes. Los tumores histológicamente más malignos de la rata se asemejan a los carcinomas ductales invasores humanos y su clasificación es similar (IARC, 1990). Las lesiones benignas más comunes son adenomas ductales, tipo papilar, cribiforme o comedo, mientras que las lesiones malignas son principalmente carcinomas invasores papilares, cribiformes, comedos o tubulares. Esta clasificación está basada en las características histogenéticas tumorales, por tanto proporciona información precisa acerca de su identidad biológica, es decir, la respuesta hormonal observada en esos tumores está de acuerdo con el status de los receptores correspondientes, en una palabra, la histología correlaciona con la biología tumoral.

### **2. Ratón**

La carcinogénesis mamaria en el ratón ha sido ampliamente estudiada desde varios ángulos, tales como la susceptibilidad hereditaria, la influencia hormonal sobre la promoción, proliferación y progresión maligna, y la presencia del MMTV (*mouse mammary tumor virus*) como agente causal. Los detalles morfológicos de la glándula mamaria murina son muy simples comparados con los del humano, en particular carece de tejido conectivo denso, presenta lóbulos más simples, numerosos mastocitos y escasas células mioepiteliales, y está libre de glándulas sudoríparas apócrinas y células mucosas. La mayoría de la información acerca del dinamismo de la morfología mamaria en el ratón ha provenido de la técnica de montaje completo. Los acinos representan el sitio de origen más frecuente del cáncer de mama murino, aunque también puede originarse en los conductos intra e interlobulillares, mientras que los conductos principales raramente desarrollan neoplasias. La clasificación de los tumores mamarios ha evolucionado desde la primera realizada por Dunn en 1953, posteriormente revisada y modificada por Dunn y Sass en



1979. En el capítulo de Squartini y Pingitore sobre los tumores de la glándula mamaria en “Tumores del ratón” (IARC, 1994) se ha adoptado esta última clasificación pero carece de utilidad práctica (adenocarcinomas tipo A, B, C, etc.) ya que está basada meramente en la morfología de los tumores y nada dice sobre su identidad biológica. Por ello es que en nuestro laboratorio hemos desarrollado para nuestros tumores una clasificación similar a la existente para los tumores de la rata.

### **3. Hamster**

Los tumores mamarios espontáneos en el hamster son extremadamente raros e incluso la estimulación prolongada con estrógenos sintéticos no ocasiona desarrollo tumoral. Aunque los informes de inducción experimental son pocos se sabe que la administración oral de 3-metilcolantreno (MC) en hamsters induce carcinomas mamarios en breves períodos de tiempo. Dada la escasez de casos su clasificación es muy simple. Semejante a la del ratón, la clasificación morfológica distingue entre carcinoma papilar, cribiforme, folicular y carcinosarcoma (“Tumores del Hamster”, IARC, 1996).



## II. MODELOS EXPERIMENTALES DEL CANCER DE MAMA

### A. Modelos *in vivo*

El uso de modelos animales en la investigación del cáncer es absolutamente necesario para validar cualquier dato obtenido de un sistema generado *ex vivo*. No hay forma de predecir exactamente la toxicidad de un agente antineoplásico, su biodisponibilidad, su metabolismo, su eliminación o acumulación o entender la relación tumor-huésped y su influencia sobre la terapia o tratar de dilucidar las distintas etapas del cáncer, iniciación, promoción y progresión, sin el uso de modelos *in vivo* (Clarke, 1996 a).

#### 1. Carcinogénesis Química

Los modelos de carcinogénesis química en roedores resultan excelentes para estudiar los eventos tempranos de la promoción y la progresión maligna, siendo de vital importancia la elección del carcinógeno. Los dos modelos más ampliamente utilizados en la carcinogénesis mamaria en rata son los inducidos por DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) en ratas Sprague-Dawley (SD) (Russo and Russo, 1978) y por NMU (N- metilnitrosourea) en ratas SD o Fischer 344 (Gullino et al, 1975; Ip, 1996). La latencia tumoral está, en general, inversamente relacionada con la dosis del carcinógeno, mientras que la incidencia tumoral y el n° de tumores/rata están directamente relacionados a la dosis. La biología del tumor también depende de la dosis ya que al aumentarla también lo hace el n° de tumores malignos. La administración intragástrica de 20 mg/kg de DMBA o endovenosa de 50 mg/kg de NMU produce aproximadamente igual número de tumores, incidencia y latencia (8-10 semanas). La capacidad inductora de estos dos agentes químicos depende fuertemente de la edad, alcanzando su máximo cuando son administrados a animales entre los 45 y 60 días, es decir, en su madurez sexual. DMBA se activa en la glándula mamaria en este período de intensa proliferación del epitelio mamario, lo que no parecería ser algo determinante ya que NMU es igualmente eficaz a esta edad y no requiere activación. La mayor incidencia tumoral se alcanza en la etapa de proliferación de los brotes terminales pero la mayor cantidad de tumores se obtiene entre los 40 y 46 días, donde casi el 100% de estos brotes está diferenciando a brotes alveolares (Russo y Russo, 1996).

Los tumores mamarios en la rata son hormono-dependientes tanto para su inducción como para su crecimiento. La ovariectomía causa la regresión tumoral en un 80%

de las ratas SD tratadas con DMBA así como previene la tumorigénesis mamaria causada por radiación. El tratamiento con estradiol o progesterona o una preñez completa y lactancia previos a la exposición al carcinógeno reduce la susceptibilidad de la glándula al aumentar su diferenciación (Russo, 1983). La preñez después de la exposición al carcinógeno reduce la latencia y la incidencia tumoral (Russo et al, 1990). En ambos modelos la administración del tamoxifeno y otros antiestrógenos después del carcinógeno retrasan la aparición del tumor. La mifepristona, un antiprogéstágeno, prolonga la latencia tumoral cuando es administrada inmediatamente después del tratamiento con DMBA, y reduce el crecimiento tumoral en las ratas portadoras de tumor (Russo y Russo, 1996). Debido a su dependencia hormonal, estos dos modelos pueden ser muy útiles en la evaluación del tratamiento antiestrogénico como prevención del cáncer de mama.

Los tumores inducidos por DMBA tienen una expresión relativamente baja de *ras* activado (<25%) mientras que los inducidos por NMU alcanzan una activación del 75% y mayores también (Sukumar et al, 1991), resultando un modelo interesante en el estudio de la transducción de señales mediada por *ras*, aunque dicho oncogen sólo se encuentre activado en menos del 25 % de los carcinomas de mama humanos.

Como desventajas del modelo de la carcinogénesis química mamaria se pueden mencionar:

1. En el modelo de inducción en ratas por DMBA se requiere de la activación hepática de este carcinógeno, con metabolitos que permanezcan en el animal por varios días, por lo que la co-administración de otros tratamientos debe ser examinada cuidadosamente de forma tal que no altere las propiedades farmacocinéticas del DMBA a fin de no obtener resultados confusos (Russo y Russo, 1996).
2. No está claro la influencia dietaria sobre la latencia y la incidencia tumoral, como en muchos otros modelos, ya que en general, una dieta excesivamente rica en grasas reduce la latencia pero aumenta la multiplicidad tumoral, aumentando a su vez la fracción de tumores histológicamente malignos (Russo y Russo, 1996).
3. Es necesario inducir los tumores cada vez, ya que no se mantienen por pasajes singeneicos por tratarse de cepas exocriadas.
4. Ambos modelos son poco metastásicos.



Para concluir, el modelo de carcinogénesis química mamaria es especialmente bueno para dilucidar los eventos tempranos de la proliferación maligna.

## **2. Carcinogénesis Viral o Biológica**

Muchas de las cepas clásicas de ratón (*Mus musculus*), tales como C3H, GR, BR6 y RIII, han sido endocriadas durante los últimos 60 años para lograr una alta incidencia de tumores mamarios, ya que todas tienen el virus del tumor mamario murino (MMTV) insertado en su genoma, al que se denomina provirus. Los ratones de algunas cepas, como la C3H, transmiten a través de la leche partículas altamente infecciosas y son capaces de transmitir el virus infectivo al amamantar a ratones de otra cepa que no lo llevan en su genoma. Las hembras de C3H desarrollan tumores mamarios independientes de la preñez y resistentes a su vez al tratamiento hormonal. Las hembras infectadas con MMTV desarrollan frecuentemente nódulos alveolares hiperplásicos (HAN) que se consideran lesiones preneoplásicas. La cepa GR transmite genéticamente el provirus infectivo (Mtv 2) (Weiss et al, 1982) y sus hembras tienen una alta incidencia de tumores mamarios dependientes de la preñez, que luego de una o más preñeces se vuelven independientes. Las metástasis pulmonares en hembras GR portadoras del virus son muy frecuentes (Callahan, 1996).

El MMTV es un retrovirus transformante no citopático. Un paso obligado de su replicación es la inserción de una copia de su genoma en el DNA de la célula huésped, un evento que es potencialmente mutagénico para la célula, ya que al hacerlo causa la desregulación de la expresión de los genes adyacentes al sitio en el que se inserta, por ejemplo, la familia de los genes *int*. Para identificar los genes celulares afectados se usa el virus como marcador molecular y de esta forma se han encontrado 6 genes *int* (Int1/Wnt1, Int2/ Fgf3, Wnt3, y otros) en cepas murinas con alta incidencia de tumores mamarios y/o portadoras de MMTV. Estos genes no se expresan normalmente en la glándula mamaria sino en otros tejidos, y algunos no se expresan directamente en condiciones normales. El mecanismo por el cual el MMTV activa la expresión de estos genes se debe al efecto “enhancer” de las secuencias LTR (*long terminal repeat*) del genoma proviral sobre el promotor transcripcional del gen adyacente afectado (Weiss et al, 1982). Algunos de los genes Wnt se expresan en tiempos precisos del desarrollo mamario y presentan funciones

interesantes. Wnt1 expresa una proteína asociada a la matriz extracelular y superficie celular, y dado que esta familia de genes está relacionada con los genes *wingless* de *Drosophila*, por mutantes *wg*, existe evidencia para asignarle a Wnt1 la función de aumentar la adhesión celular mediada por  $\text{Ca}^{++}$  en un mecanismo de transducción de señales que regula el “pool” citoplasmático de  $\beta$ -catenina y estabiliza su unión a caderina (Hinck et al, 1994).

Por todo esto, el modelo es una excelente aproximación experimental para disecar a nivel genético los eventos mutacionales que contribuyen a cada etapa del desarrollo tumoral. El aporte más importante del modelo del MMTV es que provee una herramienta para encontrar genes relacionados con la progresión maligna y su punto final, la metástasis, y los mecanismos de transducción de señales subyacentes, tanto en el desarrollo maligno como en la glándula normal.

El modelo murino, sin embargo, en relación con el cáncer de mama humano, presenta sus limitaciones, además de las evidentes, hormonales, metabólicas, etc. La descripción histopatológica de los tumores ha sido tema de discusión entre la comunidad científica ya que la mayoría de las descripciones de los tumores murinos no se corresponde con las formas más frecuentes de tumores humanos. No obstante, Wellings (1980) encontró que la mayoría de las lesiones humanas se hallan en la unidad ducto-lobulillo, y que la lesión lobular atípica tipo A (ALA) es morfológicamente muy similar a la lesión tipo HAN murina. Queda por responder actualmente si la genética de la tumorigénesis en el ratón es relevante en el cáncer de mama humano.

### **3. Ratones Transgénicos**

Los animales transgénicos han sido usados como modelos de la transformación maligna por años (Jaenisch, 1988; Frohman and Martin, 1989) y han producido valiosa información, que como en los otros modelos *in vivo*, no puede ser obtenida de estudios *in vitro*, dado que el cáncer ocurre en el contexto de un organismo vivo, en un ambiente muy complejo (tejidos vecinos, hormonas, sistema inmune, factores dietarios, etc.). Los transgénicos, portadores de genes insertados, y los *knock-outs*, privados de un gen en especial, han sido utilizados principalmente para dilucidar la acción de los genes en cuestión, por su actividad en exceso, los unos, y por defecto, los otros.



Los promotores que se han usado para expresar oncogenes en la glándula mamaria en ratones transgénicos incluyen promotores específicos mamarios como el WAP (promotor de proteínas ácidas del suero), el promotor de  $\beta$ -lactoglobulina y el MMTV-LTR, o no mamarios, como el promotor de la metaloproteína murina (MT) (Amundadottir et al, 1996). Los dos primeros son promotores de genes específicos de la leche, por lo tanto se expresan en las etapas tardías de la preñez y durante la lactancia. El promotor/enhancer del MMTV es activo en la glándula mamaria virgen, actividad que se incrementa durante las preñeces, y también en otros tejidos, como las glándulas salivales y otros órganos reproductivos. El MT1 dirige la expresión en la mayoría de los tejidos epiteliales, incluso en la glándula mamaria.

Un número de oncogenes, factores de crecimiento y genes supresores han sido estudiados aplicando esta técnica, tales como:

- TGF $\alpha$ , un miembro de la familia del EGF, con datos previos obtenidos *in vitro* sugiriendo un rol oncogénico en la tumorigénesis mamaria (Jhappan et al, 1990).
- c-erbB-2/neu, un receptor similar al de EGF que resulta amplificado entre un 15 a un 30% y sobreexpresado entre un 40 a un 50% en los carcinomas mamarios humanos (King et al, 1985) y en el que una sola mutación imita el efecto de unión del ligando, la dimerización e internalización (Perren, 1991); el transgénico que sobreexpresa el proto-oncogen neu desarrolla carcinomas mamarios capaces de dar metástasis (Guy et al, 1992a).
- c-myc, un proto-oncogen que codifica para una fosfoproteína nuclear que cuando las células son activadas por un mitógeno se encuentra un aumento significativo de su expresión (Meichle et al, 1992); más aún, se encuentra amplificado en un 25 a un 30% de los casos de cáncer de mama y rearreglado y sobreexpresado en muchos más casos (Bonilla et al, 1988); por otro lado se sabe que esta sobreexpresión predispone al animal transgénico al cáncer de mama pero no es suficiente para inducirlo por sí mismo.
- Antígeno “middle T” del poliomavirus, probablemente transforma a las células activando un número de mecanismos intracelulares de transducción de señales, uniéndose a moléculas como Src, Yes, fyn tirosinas quinasas, PI 3'quinasa y protein fosfatasa 2A; un alto número de animales transgénicos de ambos sexos que expresan este antígeno, además de desarrollar adenocarcinomas multifocales, mostraron metástasis pulmonares a los 3 meses de edad, implicando que el antígeno middle T podría ser importante en la generación

de metástasis y a Src como un mediador relevante de esta transformación (Guy et al, 1992b).

- Antígeno “large T” del virus SV40, cuyo producto proteico se une a la proteína supresora p53 aliviando sus efectos restrictivos sobre el avance en el ciclo celular y promoviendo la formación de tumores en la glándula mamaria de hembras transgénicas (Tzeng et al, 1993) aunque no es suficiente para inducir la tumorigénesis por sí mismo, en consistencia con la hipótesis “multi hit” para el cáncer, donde se necesita que ocurra más de un evento antes de que el cáncer aparezca.

- Ras, una familia de proteínas pequeñas que unen nucleótidos de guanina, cuya expresión de mRNA y niveles de proteína han demostrado estar aumentados en un gran número de tumores humanos aunque no por amplificación, rearrreglos ni mutaciones puntuales, sino por una alta frecuencia de alelos raros (Theillet et al, 1986); como la mayoría de los oncogenes sobreexpresados en transgénicos, a pesar de que induce tumores mamarios, no es capaz por sí solo de hacerlo en un único paso, en contra de lo que se ha sugerido en algunos estudios *in vitro* (Sinn et al, 1987).

- Los genes int, descubiertos por la integración del MMTV, han demostrado ser importantes en el cáncer mamario murino ya que todos los transgénicos realizados, como ser wnt-1, int-2, int-3 (Stamp et al, 1992; Muller et al, 1990; Robbins et al, 1992) desarrollaron hiperplasias mamarias o adenocarcinomas tanto en machos como en hembras; aunque es cierto que no están asociados al cáncer humano llama la atención que en el amplicón amplificado donde mapean algunos genes de esta familia se ha descubierto el gen de la ciclina D1.

- Los genes supresores del crecimiento, como p53 y TGF $\beta$ , siendo el primero la alteración genética más frecuente encontrada en los cánceres humanos, donde cualquier mutación causa un cambio conformacional de la proteína aumentando su estabilidad, impidiendo que se una al DNA y reprima la proliferación celular, lo que puede conducir a la transformación maligna (Levine, 1993); ratones deficientes en uno o los dos alelos de p53, desarrollan linfomas y sarcomas múltiples, pero no tumores mamarios, probablemente porque fallecen antes, por lo que sería útil en este caso valerse de la técnica de glándula mamaria transgénica (y no todo el animal transgénico) descrita más adelante, para evitar las complicaciones por la falta de p53 en otros órganos; en cuanto a TGF $\beta$ , un inhibidor del



crecimiento y/o promotor de la diferenciación de células epiteliales *in vitro*, su expresión podría revertir o retrasar la acción de otros agentes transformantes ya que en el transgénico TGF $\beta$  inhibe el desarrollo ductal y lobulillar, según el promotor usado para dirigir la expresión del gen (Jhappan et al, 1993; Pierce et al, 1993).

- Los genes reguladores del ciclo celular, las ciclinas, las cuales al asociarse y activar a una familia de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), provocan una cascada que dirige a la célula a la síntesis de DNA y/o mitosis; se piensa que las ciclinas involucradas en la carcinogénesis mamaria humana son las D y E (fase G<sub>1</sub> del ciclo celular); ratones transgénicos que dirigen la expresión de D1 en la glándula mamaria desarrollan hiperplasias tempranamente y adenocarcinomas después de 18 meses (Wang et al, 1994), lo que indica que la ciclina D1 está de hecho involucrada.

#### Limitaciones:

1. El uso de construcciones que no alcanzan el órgano específico, por ejemplo, si se considera la secreción del producto de determinado gen, hace difícil la distinción entre los efectos autócrinos, parácrinos, intrácrinos y endócrinos.

2. Donde la expresión es constitutiva durante toda la vida, el momento exacto en el que ocurren los eventos más críticos puede ser difícil de establecer, especialmente si no hay cambios morfológicos evidentes asociados.

3. El nivel de expresión del transgen puede producir, o fallar en producir, efectos biológicamente importantes porque el nivel de expresión es muy bajo o muy alto (Clarke, 1996).

4. El sitio de integración del transgen puede tener un rol en el fenotipo obtenido.

5. Una variación de la técnica consiste en crecer *in vitro* células epiteliales mamarias primarias de un donador a las que se les introduce, por infección o transfección, el gen de interés. Después de seleccionar las células que llevan el gen, se transplantan en el pániculo adiposo de un animal aceptor (el cual ha sido privado del epitelio mamario antes de que penetrase el pániculo, DeOme et al, 1959), donde crecen para formar una glándula mamaria transgénica (Edwards et al, 1988). La ventaja de este método es que no aparece la complicación de la expresión del transgen en otros órganos. La desventaja es que como el

transgen no es transmitido a la descendencia cada animal debe ser preparado independientemente.

6. Dado que los oncogenes inactivan de distintas formas para conducir a la proliferación maligna, cooperativa, aditiva o sinérgicamente (Amundadottir et al, 1995) para obtener un panorama más claro es necesario revisar los efectos de dobles o triples transgénicos, donde la forma más fácil de lograrlo es por cruces entre transgénicos simples, algunos de los cuales ya fueron obtenidos, revelando que ras-myc y TGF $\alpha$ -myc son poderosas combinaciones de genes que pueden producir la tumorigénesis mamaria en ratones.

#### **4. El ratón *nude* y los xenotransplantes de líneas celulares**

Un modelo experimental que se aproxime al ambiente *in situ* del cáncer de mama debería poder imitar los factores que influyen a o son influenciados por las células malignas, con el fin de entender la relación tumor-huésped y llevar a cabo una rápida evaluación de los efectos fisiológicos de los nuevos tratamientos. Desde su aparición en 1969 (Rygaard y Povlsen, 1969) el ratón *nude* ha sido ampliamente utilizado en la investigación del cáncer de mama humano, debido a que una aplasia tímica genética permite que el animal acepte tejido heterólogo (xenotransplante), incluso el humano, permitiendo así el estudio del crecimiento y la metástasis en un modelo *in vivo*.

Dado que de lo que carece el *nude* es de un sistema inmune competente (es homocigota en una mutación que afecta a la maduración de la estirpe linfóide), más exactamente la inmunidad mediada por células T (Pantelouris, 1962), no resulta apropiado para estudiar la respuesta humoral a la presencia de un tumor, pero la inmunidad mediada por células (IMC) puede ser modelada al menos en parte *in vivo* (aunque la maduración de linfocitos B es también defectiva). Existen cepas de ratones con distintas clases de inmunocompromiso en los que puede estudiarse este tema, como los *scid* (*severe combined immune deficiency mutation*), los *bg/nu* (mutaciones *beige* y *nude* en combinación), y los *bg/nu/xid* (las dos mutaciones anteriores más la inmunodeficiencia ligada al X). La inmunidad independiente de células T se compone de varias células linfoides, como los *natural killer* (NK) y los *lymphokine activated killer* (LAK), las cuales además de estar presentes en gran número en el *nude*, pueden infiltrar tumores sólidos revelando una clara



actividad antitumoral. Dado que los NK pueden contribuir al control de las metástasis esto podría explicar el hecho de que los xenotransplantes que crecen en *nude* sean pobremente metastásicos. Los LAK pueden matar células neoplásicas, incluso las resistentes a los NK, aunque algunos tumores son capaces de evadir a ambos efectores citolíticos (Clarke, 1996a). La habilidad de las hormonas para influir en la IMC debe ser considerada en el diseño experimental, ya que, por ejemplo, concentraciones farmacológicas pero no fisiológicas de estrógenos pueden inhibir la actividad de los NK en ratones *nude*, razón por la cual se ha postulado que el tratamiento con estrógenos favorecería el crecimiento de xenotransplantes ER- (Clarke, 1996a). La respuesta hormonal de los xenotransplantes ER- parecería ser endócrina y no inmunológica porque: 1) los estrógenos tienen una acción bifásica sobre los NK, donde primero aumentan sus niveles, lo que coincide con el momento en que un xenotransplante de MCF-7 ya es palpable, y recién luego de esto empiezan a decaer; 2) las concentraciones de estrógenos necesarias para inhibir los NK son mayores que las requeridas por un xenotransplante de MCF-7 para crecer; 3) las células MCF-7 aún requieren de estrógenos para crecer cuando son crecidas en ratones *bg/nuxid*, los cuales presentan una muy baja actividad de NK en comparación con los *nude* (Clarke, 1996a). Aún así, todavía no está claro por qué las células que carecen de ER crecen más con estrógeno.

El transplante de biopsias es efectivo pero lento en tanto que las líneas celulares obtenidas a partir de ellas resultan ser altamente tumorigénicas y metastásicas en los ratones *nude*. Este modelo ha servido para estudiar la progresión tumoral, la expresión de genes relacionados, la adquisición de resistencia a los antiestrógenos, etc., pero la mayor falencia ha sido la falta de líneas celulares metastásicas con un fenotipo ER+ y hormono-dependiente (sin considerar, por supuesto, las transfectadas). Existen 3 líneas celulares humanas respondedoras a hormonas ampliamente utilizadas: MCF-7 (Soule et al, 1973), T47D (Keydar et al, 1979) y ZR-75-1 (Engel et al, 1978a). Estas líneas ER+ presentan una diferenciación glandular mayor que las ER-, requieren la suplementación con estrógenos para crecer como xenotransplantes, pero mientras que la mayoría de los tumores ER+ invaden localmente y metastatizan, éstas líneas son pobremente invasivas y raramente metastatizan en ratones *nude*.

Los xenotransplantes son útiles en el modelaje de distintas etapas de la enfermedad:

- En la adquisición de la hormono-independencia. El requerimiento estrogénico es curioso si se considera que las tres líneas celulares mencionadas anteriormente, si bien son ER+, fueron obtenidas de derrames pleurales de pacientes postmenopáusicas, por lo que Clarke y otros (1994) seleccionaron variantes de estas líneas que no requieren de estrógeno para crecer pero mantienen la expresión de receptores y muestran un potencial metastásico muy incrementado, patrón que refleja mejor el fenotipo ER+/PR+ y antiestrógeno respondedor de las pacientes con cáncer de mama postmenopáusicas. Aunque la mayoría de las líneas celulares son ER- y por lo tanto consideradas no respondedoras tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado la estimulación estrogénica en ratones *nude* de una línea ER- (MDB-MB-231) que no se debería a un efecto inmunológico, es decir descendiendo los niveles de NK, los cuales tienen un efecto antitumoral, sino a la menor pérdida de células tumorales (Friedl y Jordan, 1994).

- En la adquisición de la resistencia a los antiestrógenos. Mientras que más del 70% de los tumores ER+/PR+ responden a los antiestrógenos, la mayoría finalmente se volverá resistente. Hay dos formas de modelar este pasaje: con una selección *in vitro* por tratamiento con altas dosis del antiestrógeno o por selección seriada, o también *in vivo* por exposición continua a la droga, lo cual usualmente termina con un fenotipo dependiente de tamoxifeno, inhibible por estrógeno, no muy frecuente en la clínica. A partir de la línea MCF-7 se ha podido obtener, por selección *in vivo* seguida por una selección seriada *in vitro* contra 4-hidroxytamoxifeno (el metabolito activo del tamoxifeno) la variante MCF-7/LCC2, resistente a trifeniletlenos (familia de compuestos a la que pertenece el tamoxifeno) pero no a antiestrógenos esteroides, un fenotipo relevante para la clínica (Brünner et al, 1993). Parece ser que independientemente de si la selección fue *in vitro* o *in vivo*, las líneas celulares retienen la expresión de ER y cierto grado de respuesta hormonal. Basados en estos resultados experimentales podría haber varias formas en que los tumores se vuelven resistentes a los antiestrógenos.

- En la resistencia a drogas. Probablemente la línea más usada a este efecto es la MCF-7<sup>ADR</sup>, que fue seleccionada *in vitro* contra doxorubicina y que sobreexpresa la glicoproteína P (gen humano MDR1) (Zyad et al, 1994). También se volvió ER- y resistente a los antiestrógenos. Últimamente se reportaron líneas que sólo tienen como mecanismo de resistencia la gp170, ya que la MCF-7<sup>ADR</sup> presenta varios otros.



- En la metástasis. Se han reportado dos líneas celulares ER- (MDA-MB-231 y MDA-MB-435) que producen, desde un tumor sólido creciendo como xenotransplante en ratones *nude*, metástasis en pulmón y otros órganos (Price et al, 1990). Mientras que el tiempo de diseminación es largo, la incidencia es suficiente como para proveer un modelo reproducible de metástasis (Clarke, 1996b).

Ventajas del modelo de los xenotransplantes:

1. Reproducibilidad y estabilidad.
2. Las semejanzas con la clínica son sustanciales: a) la histología de los xenotransplantes muy frecuentemente refleja la de los adenocarcinomas humanos; b) la relación inversa entre los receptores de EGF y estrógenos, es decir, el fenotipo ER+/EGF- es en principio de buen pronóstico, mientras que el opuesto tiene pobres perspectivas; c) la asociación entre agresividad y menor diferenciación, en cuanto a que un tumor poco diferenciado es frecuentemente agresivo y viceversa.

Desventajas:

1. La inoculación subcutánea (s.c.) no es la más adecuada, si bien conveniente, ya que hay evidencia en aumento de que las interacciones tumor-huésped y tumor-estroma son sumamente importantes en la progresión tumoral. Por lo tanto, el sitio más apropiado para los xenotransplantes de carcinomas de mama es el pániculo adiposo mamario (el sitio ortotópico). La transplantación ortotópica puede aumentar significativamente la tasa de prendimiento del tumor y ocasionalmente favorecer la diseminación de metástasis.
2. Resultan un modelo adecuado para el estudio *in vivo* de las líneas celulares pero la fisiología del animal no es realmente representativa de la enfermedad humana, ya que las pacientes con cáncer de mama no son inmunodeficientes.
3. Finalmente, en algún momento de su génesis estas líneas celulares fueron adaptadas a vivir *in vitro*, por lo tanto, los cambios metabólicos, celulares, y genéticos, pueden o no, reflejar fielmente la enfermedad humana, pudiendo diferir, a su vez, los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* de una misma línea celular.

## **B. Modelos *in vitro***

### **1. Líneas celulares**

Las líneas celulares de carcinomas de mama humanos siempre han sido vistas como una necesidad en la investigación multidisciplinaria de esta enfermedad, y fue difícil obtener líneas permanentes hasta que en 1958, Lasfargues y Ozello reportaron el éxito de su cultivo de células tumorales a largo plazo (línea BT20). Aunque mucho se ha avanzado, la *dificultad* de obtener líneas a partir de tejido primario de cáncer de mama y no de derrames pleurales o fluídos ascíticos, como se ha hecho tradicionalmente, es bien conocida (Amadori et al 1993). Las dificultades técnicas son muchas:

1. El número de células malignas en las muestras puede ser bajo y su viabilidad, frecuentemente baja.
2. La mayor parte del tejido resecado de las pacientes está formado por estroma y células de soporte, que tienden a crecer mucho más rápido que las epiteliales.
3. Los informes respecto del medio adecuado varían desde sustratos de tejido conectivo, como mucopolisacáridos y colágeno, hasta requerimientos nutricionales y aditivos séricos (con el lógico desconocimiento de los esteroides requeridos y sus dosis óptimas).
4. Más frecuentemente se han obtenido líneas de derrames que de tumores sólidos, por varias razones: 1) proveen gran número de células epiteliales disociadas sin contaminantes estromales; 2) se pueden sembrar a concentraciones extremadamente altas, sabiendo que su crecimiento puede ser densidad-dependiente. Pero es razonable pensar que la población de células seleccionada en estos derrames no sea representativa del tumor primario.

Más aún la mayoría de los estudios *in vitro* realizados en líneas celulares de cáncer de mama se basan en unas pocas líneas celulares bien caracterizadas, las hormono-dependientes, como MCF-7 (Soule et al, 1973), T47D (Keydar et al, 1979) y ZR-75-1 (Engel et al, 1978), las cuales llevan establecidas más de 20 años, y las hormono-independientes MDA-MB-231 (Cailleau et al, 1974), BT20, etc. En la tabla 1 se describen las principales características de estas líneas.

De hecho, la utilidad de las líneas como modelos de la enfermedad reside en el conocimiento de sus características y su pedigree. El criterio utilizado para establecer el origen humano, mamario, y maligno de estas líneas incluye:



- Diagnóstico anátomo-patológico confiable
- Especificidad interespecífica establecida por varios métodos: a) antigenicidad de superficie determinada por inmunofluorescencia al reaccionar con antisuero específico de especie; b) patrones de movilidad electroforética de isoenzimas; c) análisis de preparaciones cromosómicas.
- Especificidad intraespecífica demostrada por evidencia genética de un único dador humano distinto de las células HeLa
- Especificidad de órgano avalada por evidencia morfológica de la estructura epitelial, actividad secretoria y expresión de funciones indicadoras de diferenciación, las que incluyen: receptores de hormonas esteroideas, respuesta hormonal, producción de proteínas y/o antígenos específicos de la leche, ácidos grasos, etc.
- Estirpe celular indicada por el tipo de filamentos intermedios, microscopía óptica y electrónica.

Tabla 1. Líneas celulares de cáncer de mama ampliamente difundidas

Línea	Especie	Origen	Diagnóstico Histopatológico	Número modal	Morfol.	Crecto. in vivo	Desmosomas Tonofibrillas Vacuolas citoplasm.	ER	PR	Vim	Invasi- vidad
MCF7	humana	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante	88	epitelial	Ratón nude	+/+/+	+	+/-	-	++
T47D	humana	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante	66	epitelial	Ratón nude	+/+/+	+	+++	-	+
ZR-75-1	humana	Fluido ascítico	Carcinoma ductal infiltrante	71-72	epitelial	Ratón nude	+/+/+	+	+/-	-	+
BT-20	humana	Tumor original		49	epitelial	Ratón nude- hamster	+/+/+	-	-	ND	ND
MDA- MB-231	humana	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante	69-70	epitelial	Ratón nude	+	-	-	+	++++ +

Aunque no se realizará una descripción exhaustiva aquí de todas las líneas celulares de tumores mamarios existentes, se hará hincapié en los aspectos más relevantes de cada una de las mencionadas anteriormente y de los criterios utilizados para caracterizarlas.

La especificidad intraespecífica es requerida desde que Gartler (1967) propuso la contaminación extendida de varias líneas celulares humanas con células HeLa, como por ejemplo, varias sublíneas de HBT. De varias líneas se ha reportado un origen único argumentando clonación pero no todas lo han demostrado (Engel y Young, 1978). La especificidad de órgano puede ser demostrada por estudios morfológicos ya que la ultraestructura (como la presencia de ciertas organelas) de las células *in vivo* puede ser retenida después de un largo tiempo de crecimiento *in vitro* (Buehring y Hackett, 1974), de manera que existen tres marcadores estructurales para identificar las células mamarias: desmosomas, tonofibrillas (las cuales pueden encontrarse también en células endoteliales y mesoteliales) y vacuolas intracitoplasmáticas semejantes a ductos (frecuentemente halladas en tumores de mama y ocasionalmente en células mamarias *in vivo*). La presencia de estas estructuras sugiere como origen el epitelio mamario aunque el epitelio secretorio de otros tejidos es teóricamente un origen posible (Buehring y Hackett, 1974).

Los estudios bioquímicos no son concluyentes ya que la demostración o no de que una línea sintetiza cierta proteína característica de la leche deja muchas explicaciones posibles, por ejemplo: 1) las células seleccionadas en el tiempo de existencia de esa línea pueden o no ser las secretorias; 2) como resultado de la transformación maligna y/o la inmortalización de las células al ser cultivadas *in vitro* ciertas funciones de diferenciación pueden haberse perdido, o por el contrario, ganado otras normalmente reprimidas; 3) la síntesis de  $\alpha$ -lactalbúmina o caseína puede ser dependiente de otros factores, como la prolactina, la cual puede no estar suministrada en el medio de mantenimiento o su receptor pudo ser afectado de alguna forma durante la tumorigénesis; etc.

#### **a. Receptores hormonales y Respuesta hormonal**

La presencia de receptores hormonales, tales como ER y PR, y otros, como EGFR y HER-2, en un tumor de mama humano es capaz de predecir la respuesta al tratamiento hormonal y constituye una invaluable herramienta de pronóstico, por lo tanto la determinación de los mismos es de suma importancia en la clínica (Allegra et al, 1980; Clark et al, 1983; Nicholson et al, 1988; Perren 1991). Los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR) pertenecen a una gran familia de factores de transcripción nucleares clásicamente activables por unión al ligando que incluye también al receptor de



andrógenos, de gluco y mineralocorticoides, así como al de la hormona tiroidea, los retinoides, la vitamina D, y los receptores huérfanos, un grupo de receptores cuyos ligandos no se conocen y/o su función es todavía desconocida (Carson-Jurica et al, 1990). El mecanismo de acción para los receptores esteroides básicamente es semejante para todos los miembros de este grupo: en ausencia de la hormona, los receptores se encuentran asociados con complejos proteicos pre-ensamblados que incluyen a la hsp90 (*heat shock protein* de 90 kd) y a la hsp70 que, en el caso de los PR y ER, se localizan predominantemente en el núcleo; la unión del ligando causa la disociación de las hsp, la dimerización del receptor y la unión al DNA a través de un elemento respondedor a hormona (HRE) cuya secuencia consenso es una *inverted repeat* separada por tres nucleótidos; el dímero así formado interacciona con factores de transcripción basal, otras proteínas que se unen al DNA y co-activadores, resultando en la activación o represión de la transcripción del gen blanco (Weigel, 1996).

Estos receptores son también fosfoproteínas y sus funciones, así como su traslocación al núcleo, unión al DNA, interacciones con otras proteínas y transactivación están reguladas por fosforilación. El RP posee cuatro sitios de fosforilación con el consenso Ser-Pro, con estudios *in vitro* que sugieren que uno es un sitio para la caseína-quinasa II y los otros tres son sustratos de la ciclina A-CDK2. Del ER se ha comunicado que contiene varios sitios fosforilables con distintas secuencias consenso, como Ser y Tyr; las diferencias halladas en los patrones de fosforilación del ER humano expresado en células transfectadas MCF-7 y COS pueden deberse a un efecto célula-específico (Weigel, 1996).

Algunos receptores pueden ser activados, en ausencia de hormona, por estimulación de las vías de las quinasas, sugiriendo la existencia de mecanismos alternativos en la activación de los mismos y conversaciones cruzadas con otras vías de transducción de señales. La existencia de múltiples sitios fosforilables por tan variadas quinasas sugieren una dependencia del estado fisiológico de la célula (Weigel, 1996).

La detección de los receptores de las hormonas que influyen el crecimiento y desarrollo de la mama respalda fuertemente su origen en el epitelio mamario y permite la comparación entre la línea celular establecida y el tumor que le dio origen, así como su uso potencial como modelo *in vitro* de respuesta hormonal.



La línea MCF7 es ER+, responde positivamente a estrógenos *in vitro* con un aumento de crecimiento, aunque no es dependiente de estrógenos para crecer a diferencia de lo que le ocurre *in vivo* en ratones *nude*. La especificidad de estimulación por estrógenos de la MCF7 y la ZR-75-1 ha sido comprobada por el efecto inhibitorio que tiene el tamoxifeno, y la habilidad de estrógenos para revertir ese efecto. La línea ZR-75-1 crece en ratones *nude* sólo si portan pellets de estrógeno y los antiestrógenos, tamoxifeno y toremifeno, inhiben su crecimiento (Warri et al, 1991). La sensibilidad de varias líneas al estradiol (E<sub>2</sub>) fue revisada evaluando su respuesta por inhibición de la actividad estrogénica intrínseca con la adición de un anticuerpo anti-E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub> exógeno. Las líneas ER+, ZR-75-1 y T47-D, al agregarles E<sub>2</sub> aumentaron su proliferación, y al tratarlas con el anticuerpo, la disminuyeron, mientras que en la MCF-7 y la MDA-MB-231 (ER-) el agregado de la hormona no tiene efecto sobre la proliferación pero sí el anticuerpo, demostrando que si bien todas las líneas son sensibles las dos últimas parecen utilizar el E<sub>2</sub> en una forma autócrina o parácrina (Camby y Kiss, 1993). Sin embargo, un estudio más reciente confirma que, si bien un antiestrógeno puede disminuir la proliferación inducida por E<sub>2</sub> en las líneas ER+, MCF-7, ZR-75-1 y T47-D, no puede bajar el nivel de proliferación basal, demostrando la ausencia de actividad estrogénica intrínseca en estas líneas, incluso en la MCF-7 (Simard et al, 1997). Cuando la línea estrógeno-dependiente, ZR-75-1, y la estrógeno-respondedora, T47-D, son crecidas *in vitro* deprivadas de esteroides, pierden la sensibilidad a estrógeno aunque no la inhibición causada por antiestrógenos (Daly y Darbre, 1990). La deprivación prolongada (5 meses) de estrógenos del medio de cultivo de la ZR-75-1 produjo una variante, la ZR-PR-LT, la cual aunque no expresa ER de tipo  $\alpha$ , presenta un nivel de expresión de PR comparable al obtenido por inducción con estradiol, y es inhibida por E<sub>2</sub>, 4-HO-tamoxifeno y MPA (van den Berg, 1990). Estos datos revelan que la adquisición de un fenotipo estrógeno-independiente no necesariamente resulta en la resistencia a antiestrógenos. En la línea ZR-PR-LT se ha estudiado la respuesta del PR a progestágenos (MPA) y antiprogestágenos (RU 38.486 y ZK 98.299) y su modulación a través del receptor de glucocorticoides. El MPA y el RU, con actividad glucocorticoide y antiglicocorticoide, respectivamente, a bajas concentraciones disminuyen la expresión del PR, y la dexametasona, a concentraciones en las que no interactúa con el PR, también (van den Berg et al, 1993). Sin embargo, la línea más utilizada en relación con el PR es la T47-D

(Vegeto et al, 1990). Por ejemplo, uno de los antiprogestágenos más utilizados hoy en día por su acción dual agonista/antagonista, el RU 38.486, fue probado en la sublínea T47-D<sub>co</sub> (Horwitz, 1985), la cual tiene un alto nivel de expresión de PR, es resistente tanto a estrógenos como a antiestrógenos y su PR es estrógeno-independiente, lo que permite el estudio de los progestágenos en un sistema libre de estrógenos. Otro agente antineoplásico, el RU 58.668, un antiestrógeno, fue probado en las líneas T47-D y MCF-7, donde logró inhibir el crecimiento estimulado por insulina en la primera, y el estimulado por estradiol u otros factores de crecimiento en la segunda, en esta última, además, indujo regresión a largo plazo de xenotransplantes en ratones *nude* (van de Velde, 1994).

### **b. Filamentos intermedios**

Los filamentos intermedios son fuertes fibras proteicas, estables e insolubles en soluciones salinas concentradas o detergentes aniónicos, que se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células animales. Se denominan “intermedios” porque su diámetro, por microfotografías electrónicas, resulta intermedio entre los delgados filamentos de actina y los gruesos filamentos de miosina de las fibras musculares (Osborn y Weber, 1983). Son particularmente prominentes en células que están sujetas a un estrés mecánico, formando un intrincado complejo que rodea al núcleo y se extiende hasta la periferia celular donde interactúa con la membrana plasmática, participando en las uniones especializadas célula-célula. La estructura primaria se compone de largas repeticiones en tandem de un motivo aminoacídico (*heptad repeat*), que al dimerizar, enfrentan los residuos hidrofóbicos en el interior de la molécula mostrando un exterior hidrofílico. La unidad básica se compone de un tetrámero formado por dos dímeros en posición antiparalela, lo que hace que la molécula sea despolarizada (a diferencia de los microtúbulos y filamentos de actina que son polarizados y su función depende de eso), permitiendo la alineación de un gran número de filamentos en un patrón helicoidal. La célula puede regular el número, la longitud, y la posición de los filamentos, por ejemplo a través de la fosforilación de residuos específicos de serina, siendo el caso más dramático el desensamblaje total de la lámina basal (filamentos intermedios que subyacen a la membrana nuclear) durante la mitosis.

Se han descrito cinco tipos de filamentos intermedios (Osborn y Weber, 1983), los cuales son: las **citoqueratinas**, características de los epitelios verdaderos; los



**neurofilamentos**, característicos de muchas neuronas pero no de todas; la **proteína ácida de la glía fibrilar**, en células de la glía, tales como astrocitos y células de Bergmann; **desmina**, típica de las células musculares; **vimentina**, característica de las células no epiteliales, especialmente las de origen mesenquimático.

### **Citoqueratinas**

Es la más diversa familia dentro de los filamentos intermedios y son características de las células epiteliales y sus derivados (pelo y uñas, los cuales poseen por lo menos ocho citoqueratinas específicas llamadas *hard keratins*). Existen más de veinte tipos de queratinas en el epitelio humano, las cuales están subdivididas en dos clases: las de *tipo I (ácidas)* y las de *tipo II (neutrales/básicas)*. Las citoqueratinas siempre son heteropolímeros formados por igual número de polipéptidos de tipo I y II. Una sola célula epitelial puede sintetizar varias citoqueratinas distintas las cuales copolimerizan todas juntas en un único sistema de filamentos. Los filamentos de queratinas están ligados a las uniones celulares especializadas, tales como desmosomas (los cuales unen células vecinas) y hemidesmosomas (los cuales anclan las células a la lámina basal subyacente), por lo que forman un complejo sistema a través de todo el epitelio. La mayor diversidad de estas moléculas se encuentra en la piel, donde cada capa sintetiza un subconjunto distinto.

También existen queratinas típicas de células epiteliales activamente proliferantes, cualidad que es de suma utilidad en el diagnóstico del cáncer epitelial o carcinoma, donde el patrón particular de expresión de queratinas ayuda a determinar el tejido donde se originó el tumor (Osborn y Weber, 1983) y a decidir el tratamiento más adecuado. En el caso particular de las líneas celulares, el diagnóstico positivo para citoqueratinas permite confirmar el origen epitelial de las mismas y descartar contaminaciones fibroblásticas (Osborn y Weber, 1983).

### **Vimentina**

Este tipo de filamento intermedio, a diferencia de las queratinas, puede formar homopolímeros, y está presente en muchas células de origen mesodérmico, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y células blancas de la sangre. Las vimentinas co-



polimerizan con otros filamentos intermedios relacionados, tales como desmina, característica de las células musculares, filamentos gliales y neurofilamentos.

Recientemente la expresión de vimentina en el cáncer de mama humano ha sido asociado a la falta o pérdida del ER, a una pobre diferenciación histológica y a una fracción de gran crecimiento, particularmente en el carcinoma ductal invasor (CDI), sugiriendo que podría tener algún valor de pronóstico (Catoretti et al, 1988). En un estudio donde se analizó la capacidad invasora (por ensayos de quimioinvasión en cámara de Boyden) en relación a la presencia del ER y la expresión de vimentina en varias líneas celulares conocidas, se encontró que la progresión del cáncer de mama humano resulta primero en la pérdida del ER y subsecuentemente la adquisición de la expresión de vimentina, esta última asociada a un mayor potencial metastásico a través de una invasividad estimulada (Thompson et al, 1992). De esta forma las líneas ER+/vim-, MCF-7, T47D y ZR-75-1 típicamente poco invasoras y metastásicas, mientras que las ER-/vim+, MDA-MB-231 y MCF-7ADR, entre otras, han demostrado ser significativamente más agresivas, considerando que la última, a diferencia de su progenitora, ha perdido la expresión del ER y se ha vuelto capaz de crecer en ratones *nude* independientemente de la suplementación con estrógenos.

### **c. C-erbB-2**

Este oncogen fue aislado en 1985 por dos grupos independientes por hibridación cruzada con una sonda erbB1 en una línea celular originada en un carcinoma de mama en la que estaba amplificado (King et al, 1985) y en una carcinoma de glándula salival (Semba et al, 1985). Codifica para un fosfoglicoproteína con gran similitud de secuencia con el receptor de EGF, lo que sugiere una función análoga en el crecimiento celular: su dominio extracelular une ligandos transduciendo la señal a través de una actividad tirosina kinasa de su dominio intracelular. Es el homólogo humano del oncogen **neu**, descubierto por primera vez en neuroblastomas inducidos por etilnitrosourea en ratas. Su potencial transformante en ratones transgénicos se ha demostrado por el hecho de que una sola mutación puntual imita el efecto de unión del ligando previo a la dimerización e internalización del receptor (Perren, 1991), por sobreexpresión en células NIH-3T3, y además por el hecho de que el tratamiento con un anticuerpo anti-erbB2 inhibe la

formación de colonias de estas células transformadas. Esta sobreexpresión y/o amplificación del gen, más que la aberración genética parece ser la causa de su capacidad transformante, ya que c-erbB-2 ha sido encontrado sobreexpresado en casi el 30% de las pacientes con cáncer de mama, tanto en el tumor primario como en las metástasis. c-erbB-2 correlaciona con un diagnóstico histopatológico maligno en líneas celulares de carcinomas de mama caninas pero no con invasión local o metástasis distales, sugiriendo su participación en el desarrollo maligno (Ahern et al, 1996). Además, la sobreexpresión de p185<sup>erbB2</sup> está asociada a la resistencia celular a varias drogas citotóxicas, incluyendo agentes quimioterapéuticos como cys-platino, TNF, tamoxifeno y la acción de las células NK (Lupu y Lippman, 1993).

El 40 % de los casos de cáncer de mama que sobreexpresan c-erbB-2 son ER+, en los cuales la respuesta a tamoxifen está realmente reducida y tienen un mal pronóstico. Muchos estudios en líneas celulares demuestran la interacción entre c-erbB-2 y el receptor de estrógenos: la línea MCF-7 transfectada con erbB2 es resistente al tamoxifeno (Borg et al, 1991); en la misma línea celular, conocida por tener altos niveles de ER y un PR inducible por estradiol, el tratamiento con estrógenos disminuye tanto los niveles de erbB2 mRNA como los de p185<sup>erbB2</sup>, mientras que en la línea T47D, la cual tiene bajos niveles de RE pero altos de PR, el tratamiento con estrógenos o progestágenos o antiprogestágenos no tuvo efecto alguno en los niveles de mRNA o proteína, indicando que los estrógenos y no los progestágenos modulan la expresión de erbB2 en las líneas de cáncer de mama (Read et al, 1990); el tratamiento de células ER+/erbB2+ con ligandos de erbB2 tales como gp30 resulta en un detrimento en la expresión de ER y un bloqueo de la inducción del PR, y así mismo, el tratamiento con estradiol disminuye la expresión de erbB2 (Colomer et al, 1992), indicando que la activación de erbB2 modula la función del ER, sugiriendo además una regulación cruzada entre ambas vías (Lupu and Lippman, 1993).

Dado que un número significativo de casos de cáncer de mama exhiben expresión simultánea de ER y erbB2 y que varios trabajos han sugerido que en esas células el estradiol disminuye la expresión de c-erbB2, varios grupos han utilizado distintas líneas celulares, como MDA-MB-361 y BT-474, para tratar de establecer la relación entre estos dos receptores y la progresión maligna; en esta líneas se sabe que la



proliferación es reducida por la privación hormonal (suero charcoalizado) pero la adición de estradiol produce tiempos de duplicación similares a los obtenidos con suero sin tratar; así mismo el crecimiento de estas células es modulable por gp30, como en la línea SK- Br-3 (Lupu y Lippman, 1993).

La evidencia citada anteriormente sugiere que la determinación de la presencia del erbB2 en líneas celulares de cáncer de mama, así como en los tumores primarios, es de suma importancia para tratar de entender los mecanismos de proliferación celular en este tipo de cáncer.

#### **d. Caderina**

Las caderinas son las responsables de la adhesión célula-célula dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) en los tejidos animales. Las primeras tres fueron nombradas por el tejido en el que fueron encontradas, pero actualmente existen más de una docena: E-caderina (en células epiteliales); N-caderina (en células nerviosas y musculares); y P-caderina (en placenta y epidermis). Casi todas las células expresan una o más clases de caderinas, y cada conjunto en particular es característico de un tipo celular. Experimentos hechos tanto *in vivo* como *in vitro* demuestran que las caderinas son las principales moléculas de adhesión que mantienen las células embrionarias juntas. La mayoría de las caderinas son glicoproteínas de un solo paso transmembrana y con una gran parte extracelular. Cuatro de sus cinco dominios extracelulares contienen sitios de unión a  $\text{Ca}^{++}$  que en ausencia de éste sufren un cambio conformacional tan grande que son degradadas rápidamente por enzimas proteolíticas. La caderina E es la mejor caracterizada. Es la primera expresada durante el desarrollo embrionario donde causa la compactación en el estadio de 8 células. Se encuentra concentrada en las uniones intercelulares de las células epiteliales maduras conectando los citoesqueletos de actina de las células que mantiene unidas.

El dominio intracelular de las caderinas, el cual se encuentra altamente conservado, interactúa con por lo menos tres proteínas de adhesión llamadas *cateninas* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Es conocido que alteraciones en las uniones intercelulares y las proteínas del citoesqueleto pueden subyacer a algunas de las propiedades morfológicas, invasivas y metastásicas del cáncer. En un estudio reciente realizado sobre 18 líneas celulares de cáncer de mama humano se halló que las alteraciones en la expresión de caderina E y



cateninas  $\alpha$  y  $\beta$  y mutaciones en los respectivos genes son frecuentes en este tipo de líneas, argumentando que la pérdida de función del mecanismo caderina E-catenina puede ser crítico en el desarrollo de este tipo de cáncer (Pierceall et al, 1995). En el mismo trabajo no se encontró relación entre la expresión de caderina E y la de erbB2/HER-2/NEU.

### III. MODELO DE CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR MPA

#### A. Características morfológicas

Desde hace ya casi 15 años nuestro laboratorio ha estado desarrollando y caracterizando un modelo experimental de adenocarcinomas mamarios murinos en ratones BALB/c inducidos mediante la administración de acetato de medroxiprogesterona (MPA) o progesterona (Pg), o bien, de la administración conjunta de MPA con un carcinógeno químico como la nitrosometilurea (NMU). Los tumores inducidos por MPA presentan una incidencia actuarial del 76% y una latencia media de 52 semanas (Lanari et al, 1986 a y b).

El MPA, o 17- $\alpha$ -acetoxi-6- $\alpha$ -metil-4-pregnano-3,20-diona es un progestágeno sintético con actividad antiestrogénica en concentraciones séricas mayores a las usadas en la terapia tumoral. También tiene actividad estrogénica pero a nivel del eje hipotálamo-hipofisiario, ya que bloquea la secreción de gonadotrofinas. El MPA se une al receptor de progesterona y puede unirse también al de andrógenos y al de glucocorticoides. En la clínica tiene una serie de usos distintos: como droga anticonceptiva (depot), en el tratamiento de amenorrea secundaria, metrorragia uterina, endometriosis, en embarazos con bajos niveles de progesterona, en carcinomas endometriales, carcinomas mamarios avanzados, dismenorrea, aborto recurrente, tensión premenstrual, infertilidad luteal y pubertad precoz.

Los tumores originados en ratones tratados exclusivamente con MPA son mayoritariamente carcinomas ductales, que expresan altos niveles de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (PR) y niveles no detectables de receptores de crecimiento epidérmico (R-EGF) (Molinolo et al, 1987). Estos tumores mantenidos por pasajes subcutáneos singeneicos manifiestan un comportamiento *progestágeno dependiente* (PD), es decir, crecen sólo en animales tratados con MPA, y dan metástasis en el pulmón y en el ganglio axilar homolateral (Lanari et al, 1989). Esencialmente por pasajes sucesivos (ver Figura 1) en ratones sin tratar se pudieron seleccionar variantes capaces de crecer sin un aporte exógeno de progestágenos, por lo que se las ha denominado *progestágeno independiente* (PI) (Lanari et al, 1989; Kordon et al, 1990). En la figura 2 se muestra el

patrón de crecimiento típico de un tumor ductal y la forma en que aparece el fenotipo independiente. En la tabla 2 se resumen las características principales de estos tumores.

Figura 1. Mantenimiento de las líneas tumorales a través de pasajes singeneicos y obtención de líneas hormono-independientes.

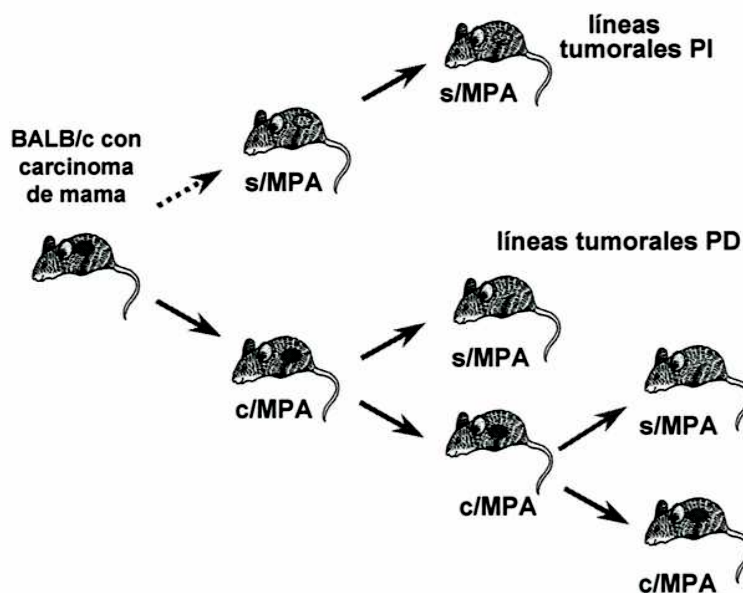
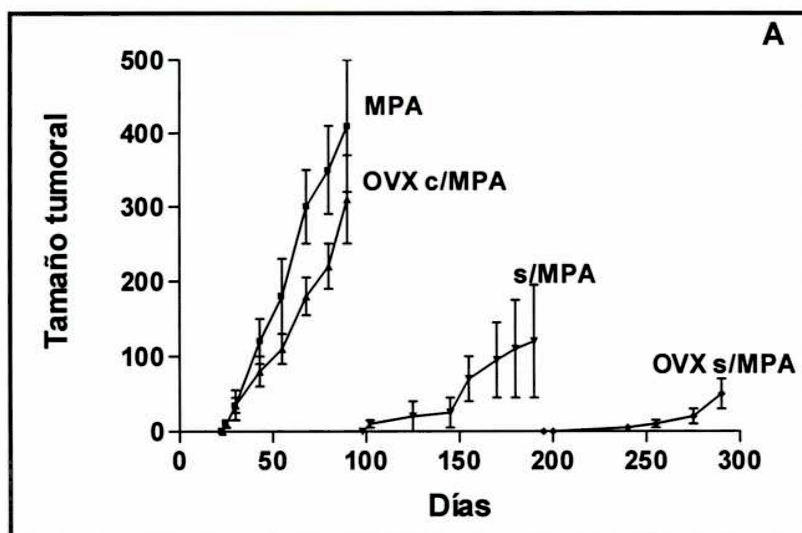


Figura 2. Patrón de crecimiento de un tumor ductal progestágeno-dependiente y obtención de una variedad independiente a partir del mismo.





En una proporción menor el MPA también induce tumores de tipo lobulillar, caracterizados por la ausencia de receptores hormonales aunque sí expresan R-EGF. Son típicamente autónomos o PI, si bien algunos pueden ser hormonorespondedores (responden al tratamiento hormonal modificando su tasa de crecimiento) en los primeros pasajes. Histológicamente, remedan los carcinomas mamarios que surgen espontáneamente en hembras multíparas BALB/c.

Tabla 2. Características morfológicas y biológicas de los carcinomas ductales.

PARAMETRO	CARCINOMAS DUCTALES
<b>Inducción</b>	MPA, ocasionalmente Pg
<b>Receptores Hormonales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RP: 50 - 1000 fmol/mg proteína.</li> <li>• RE: 20 - 200 fmol/mg proteína.</li> </ul> <i>La expresión de receptores se mantiene en pasajes singeneicos.</i>
<b>R-EGF</b>	No detectables.
<b>R-Prolactina</b>	Entre 6 y 32 fmol/mg proteína.
<b>Preneoplasias</b>	Hiperplasias ductales.
<b>Sensibilidad a hormonas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Progestágeno-dependientes. <i>Se pueden originar variantes progestágeno-independientes</i></li> <li>• Retrogradan con estrógenos y antiprogestágenos. <i>Se pueden originar variantes insensibles a estrógenos.</i></li> </ul> Todas las variantes conservan los RP y RE.
<b>Crecimiento <i>in vivo</i></b>	Crecimiento lento. Sobrevida > de 2 meses.
<b>Crecimiento <i>in vitro</i></b>	<i>Organoides</i> ; los fibroblastos interfieren con el crecimiento epitelial.
<b>Estroma</b>	Abundante, fibroblástico, poca necrosis, infiltración linfomonocitaria e histiocitaria.
<b>Metástasis</b>	Ganglios regionales, pulmón, hígado.

Cada una de las lesiones tumorales descriptas está precedida por alteraciones morfológicas particulares, comparables a las lesiones preneoplásicas del cáncer de mama humano, y son lo suficientemente específicas como para poder predecir el tipo de neoplasia a la que darán origen (Molinolo et al, 1987).

Hemos comprobado que la ovariectomía y la sialoadenectomía previas al tratamiento con MPA disminuyen la incidencia tumoral y que la administración exógena de

EGF restaura el fenotipo de la glándula mamaria previa a la sialoadenectomía (Kordon et al, 1994 y Molinolo et al, 1998).

Es necesario mencionar que en la cepa BALB/c aparecen tumores espontáneos en hembras multíparas, que, como las lesiones neoplásicas inducidas por progesterona, son de estirpe lobulillar. Esto sugiere que los altos niveles de progesterona de la preñez podrían *jugar un rol importante* en la inducción de tumores mamarios. Si bien es conocido que la cepa en la que hemos desarrollado nuestro modelo tiene una alta probabilidad de estar infectada con el virus del tumor mamario murino (MMTV), resultados preliminares sugieren que este virus no estaría directamente involucrado en la aparición de adenocarcinomas ductales (PD) inducidos por MPA. Asimismo existen otros argumentos a favor del potencial carcinogénico independiente del MPA, como ser: a) el MPA también induce neoplasias en perros (Concannon et al, 1980) y favorece la carcinogénesis en otros modelos (Russo et al, 1989) y b) los tumores espontáneos de multíparas inducidas por MMTV en BALB/c presentan un comportamiento biológico y marcadores bioquímicos distintos de los inducidos por MPA.

## **B. Características biológicas**

A lo largo del tiempo el interés del laboratorio se fue centrando en estudiar los mecanismos involucrados en varios componentes de la biología del modelo, como por ejemplo el control del crecimiento, la dependencia hormonal y la reversibilidad de este fenómeno. Para ello, se ha avanzado en los diseños experimentales desde cultivos primarios (para disecar aspectos tales como el rol de los factores de crecimiento, EGF, FGF, TGF  $\alpha$  y  $\beta$ , y factores séricos en la modulación del crecimiento celular estimulado por MPA o inhibido por estrógenos) hasta la obtención de líneas tumorales. Nuestro grupo ha logrado desarrollar cultivos primarios enriquecidos en células epiteliales tumorales o en fibroblastos de diferentes tumores ductales tanto PD como PI. En la línea tumoral ductal C4-HD se ha demostrado que los progestágenos MPA o Pg en presencia de 1-5% de suero fetal bovino charcoalizado (SFB ch), tienen un efecto estimulatorio sobre la incorporación de H<sup>3</sup>-timidina. El antiprogestágeno mifepristona (MF) inhibe completamente la proliferación celular, incluso inhibe la proliferación que se obtiene en ausencia de progestágeno, mientras que el antiandrógeno flutamida por el contrario, no tiene efecto sobre la proliferación



celular. Por lo tanto, en nuestro modelo el efecto del MPA sobre los cultivos primarios estaría mediado por RP y no por receptores de andrógenos y la proliferación no dependiente del progestágeno podría involucrar factores que interactúan con la vía del RP. Al estudiar los efectos del agregado exógeno de distintos factores de crecimiento (EGF, IGF I, IGF II, TGFβs y FGFs), en presencia y ausencia de progestágeno, sólo se observó estimulación con FGFs, mientras que los TGFβ demostraron ser inhibitorios. El MPA carece de efectos mensurables sobre el crecimiento de fibroblastos estromales en cultivo, mientras que todos los otros factores ensayados, incluyendo los TGFβs, tienen efectos estimulatorios (Lanari, 1997).

Para estudiar la regulación del crecimiento autónomo y la posible participación del RP, se trataron animales portadores de tumores PI (como el C7HI) con antiprogestágenos teniendo en cuenta que se mantiene la expresión de estos receptores aún cuando aparentemente los tumores no requieren de la hormona para crecer. Los resultados demostraron que los antiprogestágenos inducen regresión tumoral en estos ratones (Vanzulli et al, 1997), al igual que el estradiol (Kordon et al, 1991), mientras que la flutamida (antiandrógeno) no modificó el crecimiento tumoral, sugiriendo la posibilidad de que los RP estén involucrados en la proliferación tumoral autónoma. Asimismo para confirmar este rol del RP se inhibió su actividad a través de la supresión de su síntesis mediante el uso de secuencias antisentido. Utilizando un oligonucleótido antisentido dirigido contra la isoforma A del RP nuestro laboratorio ha logrado inhibir la proliferación inducida por bFGF y otros factores séricos, disminuyendo también el número de receptores, demostrando así la especificidad del efecto (Lamb et al, manuscrito enviado para su publicación). La administración de estrógenos a animales portadores de tumores ductales PD o PI no sólo inhibe su crecimiento sino que también induce regresión tumoral (Kordon et al, 1991). Para finalizar, nuestro laboratorio también ha desarrollado líneas tumorales resistentes al tratamiento estrogénico (Montecchia en prensa y Lanari, 1997).

Así el modelo experimental de carcinogénesis mamaria murina desarrollado por nuestro laboratorio cubre el espectro morfológico característico de las lesiones humanas, son tumores metastásicos y desde el punto de vista biológico abarca todas las etapas: lesiones preneoplásicas, hormono-dependencia, hormono-independencia y resistencia al tratamiento antihormonal.



Para seguir disecando los mecanismos involucrados en todas las etapas de la enfermedad y contar con un material más accesible es que hemos desarrollado líneas tumorales a partir de algunos de los tumores con los que contamos en el laboratorio.

### **C. Desarrollo de líneas tumorales**

Las líneas celulares han sido herramientas muy valiosas para la disección de ciertos aspectos específicos del comportamiento de una progenie celular aislada de los efectos moduladores de su medio natural. Existen muy pocas líneas humanas con una dependencia estable a progesterona, y ninguna de las características de las nuestras en ratones.

De esta forma en nuestro laboratorio se han obtenido cinco líneas celulares de crecimiento *in vitro* del tumor progestágeno-dependiente C4HD y una del progestágeno-independiente C7HI, las cuales han sido reinoculadas *in vivo* a fin de comparar el desarrollo de las mismas en ambos sistemas. Todas expresan receptores tanto de estrógeno como de progesterona y son de estirpe epitelial. La caracterización en profundidad de estas líneas es imprescindible para poder comenzar a trabajar en los mecanismos moleculares que subyacen a la progresión maligna en el modelo de este laboratorio.

# O B J E T I V O S

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

a) El objetivo de este trabajo es la caracterización morfológica y funcional, mediante técnicas de histología convencional e inmunohistoquímica, de una serie de líneas celulares obtenidas de adenocarcinomas mamarios murinos desarrolladas en nuestro laboratorio.

### **Objetivos particulares:**

a) Estudiar las características morfológicas de las líneas en su crecimiento en cultivo e inoculadas en ratones singeneicos, así como evaluar su capacidad y patrón metastásico.

b) Caracterizar los filamentos intermedios con el fin de establecer el origen epitelial de las líneas celulares:

- Evaluar la presencia de citoqueratina, el filamento intermedio característico de las células epiteliales.
- Evaluar la presencia de vimentina, cuya expresión pudo haberse adquirido durante el establecimiento de la línea.

c) Establecer la expresión de distintos antígenos como marcadores de diferenciación celular epitelial y/o malignidad, tales como caderina y c-erbB-2.

d) Correlacionar la respuesta hormonal de las líneas con la expresión de RE y RP.



M A T E R I A L E S

Y M E T O D O S

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Mantenimiento *in vitro* de las líneas celulares

Se han obtenido 5 líneas celulares de crecimiento *in vitro* del tumor progestágeno-dependiente C4HD y 1 del progestágeno-independiente C7HI (tabla 3). Las líneas celulares se mantienen en medio DMEM F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12, Sigma Chemicals CO, #cat D-2906) sin rojo fenol ni antibióticos, con 10% de suero fetal bovino (Gen S.A., Buenos Aires) y progesterona (Sigma)  $10^{-8}$  M en estufas de CO<sub>2</sub> gaseadas a 37°C. El medio se cambia cada 48 h. Las células se repican al llegar a confluencia, generalmente una vez por semana y en una dilución 1:20, con una solución de tripsina al 0,25% (GIBCO BRL, #cat 27250-042).

### B. Crecimiento *in vivo* de las líneas celulares

Se inoculó una concentración mínima de  $10^6$  cél/ml de las líneas C4L1 (Repique 12), C4L2 (R9), C4L3 (R16), C4L4 (R9) y C4L5 (R10), provenientes del tumor PD, en ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c, tratados con 40 mg depot subcutáneo de MPA contralateral al tumor. Las líneas se mantienen por pasajes s.c. del tumor en ratones tratados y no tratados con MPA, a fin de controlar la dependencia a progestágenos. La línea C7L1 (proveniente del tumor HI, inoculada en el R14) se mantiene en ratones sin tratar siguiendo el patrón de comportamiento independiente del tumor que le dio origen.

### C. Animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c provenientes del bioterio de la Academia Nacional de Medicina, mantenidos en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, a los que se les proporcionó alimentos y agua *ad libitum*. Fueron inyectados con la suspensión de células tumorales de las respectivas líneas hasta lograr el establecimiento de la línea respectiva *in vivo*. Se mantienen por pasajes singeneicos realizados con trócar en el flanco derecho a una edad promedio de 1-2 meses.

Tabla 2. Características de las líneas tumorales parentales C4-HD y C7-HI

Características	C4-HD	C7-HI
Origen	1985. En ratones BALB/c tratados con depot MPA 40mg cada 3 meses. Experimento publicado JNCI 1986;77:157-164 . El grupo C, caja 4 en el caso del C4-HD, caja 7 en el caso del C7-HI. La terminación HD o HI se agregó de acuerdo a su capacidad de crecer en presencia o ausencia de MPA en pasajes singeneicos.	
Histología	ductal	
Crecimiento en pasajes singeneicos	Progestágeno-dependiente (PD)	autónomo
Metástasis	Pulmonares después de 4-5 meses	Axilar homolateral y pulmonares antes de los 2 meses.
Receptores estrogénicos	63±20 (n=6)	34±8(n=6)
Receptores de progesterona	171±54(n=6)	160±48(n=6)
Receptores de glucocorticoides	negativo	
Receptores de andrógenos	negativo	
Receptores de EGF	negativo	
Amplificación de c-erbB2	Si	No
Amplificación de ciclinas(D1,E,B)	No	D1 y E

#### D. Preparado del material para estudios morfológicos e inmunocitoquímicos

Líneas celulares en cultivo: Se sembraron células en portaobjetos multicámaras (“chamber slides”, Nunc). Una vez crecidas a confluencia se fijaron en alcohol absoluto (etanol o metanol) o en formalina al 15%, dependiendo del antígeno a marcar. Para la identificación de filamentos intermedios del citoesqueleto se prefirió la fijación en alcohol, mientras que para receptores hormonales y antígenos de membrana, como caderina E por ejemplo, la fijación en formalina.

Tumores: Los tumores originados en la inoculación *in vivo* de las líneas celulares se fijaron inmediatamente después de ser extraídos (con un tamaño aproximado de 100mm<sup>2</sup>), utilizando un criterio similar que para los cultivos. El material se deshidrató en alcoholes de graduación creciente, se aclaró en tolueno o xileno y se incluyó en parafina. Se obtuvieron cortes de aproximadamente 5µm que se almacenaron



a temperatura ambiente hasta su procesado. Se colorearon cortes y cultivos representativos de cada tumor con hematoxilina-eosina para su evaluación morfológica.

### **E. Técnicas inmunocitoquímicas**

Líneas celulares en cultivo: Los portaobjetos multicámara se lavaron 3 veces con PBS 1X y luego se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.25% o se trataron con tripsina. Se realizaron otros tres lavados (siempre con PBS 1X y de 5 min. cada uno) y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente entre 24 y 48 hs., a temperatura ambiente o a 4°C. Después de esta incubación se lavaron los preparados y se incubaron 30 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con biotina. Se prosiguió con otros tres lavados y se incubó 30 min. con el reactivo ABC (complejo avidina-biotina) según la técnica desarrollada por Hsu y colaboradores (1981) a temperatura ambiente preparado 30 min. antes de usar. Se lavó tres veces con PBS y se reveló con DAB (diaminobenzidina-ClH, Sigma o Fluka) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µl/ml, controlando la reacción bajo el microscopio. Se detuvo el revelado con agua destilada y se montaron los preparados con glicerina.

Tumores: Se desparafinizaron los cortes con tolueno o xileno y se hidrataron luego en alcoholes de graduación decreciente. Se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con agua oxigenada al 3% durante 20 minutos y se completó la hidratación con PBS. Se realizó un breve bloqueo con suero normal por 30 minutos y sin lavar, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente. A partir de esto la técnica fue similar a lo descrito para las líneas celulares. Los preparados se deshidrataron en alcoholes, se aclararon en xileno y se montaron con bálsamo sintético (DPX, Fluka BioChemika, #cat 44581).

Controles: En todos los casos se efectuaron controles: del anticuerpo primario (reemplazándolo por PBS); un control positivo y un control negativo, por lo general en el mismo portaobjetos donde se hallaba la muestra que será sometida a la inmunohistoquímica.

### **F. Reactivos utilizados:**

- Anticuerpos anti-receptor de Progesterona

En cultivo se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (PgR Ab-7 MS-197-P, Neo Markers), el cual reconoce al receptor en sus dos isoformas. Dilución 1:250.

En tejidos se prefirió un anticuerpo policlonal (PR c-20: cat #sc-539, Sta Cruz Biotechnology, Inc.) obtenido por inmunización en conejos con la región 545-564aa del receptor humano. Dilución 1:200.

- Anticuerpo anti-receptor de Estrógeno

Tanto para cultivo como para tejidos se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra la secuencia 580-599 de la región carboxiterminal del receptor de ratón (ER MC-20:cat #sc-542, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Dilución 1:100 (en cultivo) y 1:50 (en tejido).

- Anticuerpo anti-citoqueratinas

Se utilizó un anticuerpo policlonal de amplio espectro (Dako Corporation CA93013) dirigido contra la queratina epidérmica bovina. Dilución 1:500 (en cultivo) y 1:250 (en tejidos)

- Anticuerpo anti-Vimentina

Se utilizó un anticuerpo monoclonal (Biogenex). Dilución 1:500 (en cultivo) y 1:250 (en tejidos).

- Anticuerpo anti-Caderina E

Se utilizó un anticuerpo monoclonal (Sigma Chemical CO). Dilución 1:800

- Anticuerpo anti-cerbB-2/neu/HER-2

Se utilizó un anticuerpo policlonal (Neu C-18:cat#sc-284, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) dirigido contra la región 1169-1186 del extremo carboxiterminal de Neu gp 185 humano. Dilución 1:250

- Anticuerpos secundarios

Se utilizaron anticuerpos biotinilados (IgG- biotina) antiraton (Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010, #cat BA-9200) y anticonejo (Vector, #cat 1000). En cultivos la dilución óptima fue 1:200 y en tejidos 1:100. Eventualmente se utilizó el anticonejo que incluye el kit ABC de Vector preparado según las especificaciones del fabricante.

- **Kit ABC**

El reactivo ABC (Vectastain Elite ABC kit, Vector, PK-6101) se preparó, como es indicado, mezclando una gota del reactivo A (avidina) con una gota de reactivo B (biotina- peroxidasa) en 2.5ml de PBS 1X media hora antes de usar.

- **DAB**

Se utilizó indistintamente 3-3'diaminobencidina (Sigma #cat ,1 tableta en 15 ml. de TBS, o Fluka Chemika, #cat 32741) con 1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml DAB, o el peroxidase substrate kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA 94010).

Se siguieron los siguientes protocolos:

### **G. Inmunocitoquímica de los receptores hormonales (PR y ER)**

#### Cultivo de células

1. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a temperatura ambiente (TA)
2. Se fija en formalina ( formol al 15%) 45' a 4°C
3. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a temperatura ambiente
4. Se permeabiliza con Tritón al 0,25% 20'a TA
5. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
6. Se incuba con el Ab 1° a 4°C 48 hs.:  
RE 1:100 ( Sta. Cruz)  
RP 1:200 ( Sta. Cruz)  
RP 1:250 ( Neo Markers, monoclonal)
7. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
8. Se incuba con el Ab 2° 30' a TA 1:200
9. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
10. Se incuba con el complejo ABC de Vector, preparado como es indicado por el fabricante ( 2 gotas A + 2 gotas B en 5ml PBS 1X preparado 30'antes de usar) 30' a TA
11. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
12. Se revela con DAB (no más de 2')
13. Se corta el revelado con agua destilada
14. Luego de un breve pasaje por alcohol 70°, se monta con un cubreobjeto en glicerina.

#### Tejidos

##### Secciones en parafina

1. Se desparafiniza con 3 pasajes por xileno de 10'c/u
2. Se hidrata con pasajes de 5'c/u por alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°, H<sub>2</sub>O dest)
3. Se inhibe la actividad de peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS 15'
4. Se realiza un lavado de 5' con PBS 1X 3 veces
5. Se incuba con suero normal (kit ABC: 150µl de suero en 10 ml PBS)



6. Se descarta (sin lavar) el suero. Se incuba con el Ab 1° a TA 48hs.  
RE 1:50  
RP 1:100
7. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
8. Se incuba con el Ab 2° conjugado a biotina 30' a TA 1:100
9. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
10. Se incuba con el complejo ABC 30' a TA
11. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
12. Se revela con DAB (de rutina)
13. Se deshidrata por pasajes en alcoholes de graduación creciente terminando con un pasaje por xileno y se monta con un bálsamo sintético (DPX).

## **H. Inmunocitoquímica de los Filamentos Intermedios**

### Cultivo de células

1. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
2. Se fija en alcohol absoluto 45' a 4°C
3. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
4. Se digiere brevemente con tripsina al 0,25% a 37°C por 30' (este paso sólo es necesario cuando las células o el tejido están fijados en formalina)
5. Se lava
6. Se incuba con el Ab 1° a 4°C entre 18 y 24 hs. :  
Anti queratina 1:500  
Anti vimentina 1:500
7. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
8. Se incuba con el Ab 2° a TA 1:200
9. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
10. Se incuba con el reactivo ABC a TA por 30'
11. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u
12. Se revela con DAB y se procede como ya se mencionó anteriormente para el montado de portaobjetos de plástico ("chamber slides")

### Tejido

El protocolo es el mismo salvo que, evidentemente, es necesario desparafinar e hidratar los cortes en parafina. Así mismo, se ha observado que se obtienen mejores resultados realizando la incubación del anticuerpo primario a temperatura ambiente.

## **I. Inmunocitoquímica de la caderina E y el c-erbB-2**

### Cultivo de células

1. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
2. Se fija en formalina (formol al 15%) 45' a 4°C
3. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
4. Se incuba con suero normal 20' a TA
5. Sin lavar, se descarta y se incuba con el anticuerpo correspondiente:  
anti caderina E 1:600  
anti c-erbB 2 1:250
6. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
7. Se incuba con el Ab 2° a TA 1:200

8. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
9. Se incuba con el reactivo ABC a TA por 30'
10. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5'c/u a TA
11. Se revela con DAB

## **J. Coloraciones**

Técnica de Gomori: se utiliza para teñir las fibras de *reticulina*. La técnica colorea de negro las fibras de reticulina, las que se disponen rodeando células individuales en el tejido conectivo y grupos de células en el caso de los epitelios. Es una forma rápida de distinguir un carcinoma de un sarcoma. Se colorean de distintas gradaciones de marrón/amarillo otras estructuras. Los núcleos se colorean de negro.

1. Se lava con agua destilada
2. Se sumerge en una solución de permanganato de potasio al 0,5%
3. Se lava con agua destilada
4. Se blanquea rápidamente con ácido oxálico al 5%
5. Se lava con agua destilada
6. Se sumerge en alumbre de hierro 1'
7. Se lava con agua corriente 3'. Lavar bien con agua destilada
8. Solución de plata (Gomori) 1' máximo
9. Se lava con agua destilada
10. Se revela con formol al 10%

Tricrómico de Massón: se utiliza para diferenciar los distintos componentes de un tejido: por ejemplo, las fibras musculares y elásticas se ven de color rojo, las fibras de colágeno de color azul-verde, la fibrina de púrpura, etc.

1. Colorear con hematoxilina de Weigert 10'
2. Virar
3. Fucsina ácida 1-10'
4. Se lava con agua destilada
5. Ácido fosfomolibdico 10'
6. Sin lavar, se colorea con azul de anilina o verde luz
7. Se lava con agua destilada
8. Agua acética 1%

Alcian blue: se utiliza para identificar la secreción de *mucopolisacáridos ácidos*.

1. Alcian blue 1% ( 1 gr. alcian blue en 100 cm.<sup>3</sup> de ác. acético 3%) durante 30'
2. Se lava con agua destilada
3. Hematoxilina de Mayer 10'
4. Virar
5. Se lava con agua destilada

Periodic acid Schiff- PAS: se utiliza para identificar la secreción de *mucopolisacáridos neutros*.

1. Ác. periódico durante 5-10'
2. Se lava con agua destilada
3. Reactivo de Schiff durante 20-30'
4. Se lava con metabisulfito de sodio 0,5%
5. Se tiñe rápidamente (30" a 1') con hematoxilina y se vira.

### **K. Microscopía y Fotografía**

Para la observación de las células “vivas” en cultivo se utilizó un microscopio Olympus IMT2-SFR (Inverted Research Microscope) con cámara Olympus SC35.

Para el revelado de las inmunocito-histoquímicas y para la observación de los portaobjetos una vez montados se utilizó un microscopio Nikon eclipse E400

Para fotografiar los preparados se contó con un microscopio Axioplan Zeiss (Germany) de lentes planos.



## R E S U L T A D O S

## RESULTADOS

Se realizaron estudios morfológicos de las líneas creciendo *in vivo* e *in vitro*; se evaluó su capacidad metastásica espontánea y mediante técnicas inmunohistoquímicas se identificó la estirpe celular y se evaluaron distintos parámetros funcionales.

La técnica de inmunohistoquímica fue puesta a punto para cada uno de los marcadores evaluados, tanto nucleares como citoplasmáticos. Cada uno de ellos y, a su vez, cada una de las líneas ha presentado distintas dificultades a la hora de obtener resultados inequívocamente positivos, los cuales serán descriptos oportunamente en cada caso. A continuación se describen exhaustivamente las líneas estudiadas, tanto *in vivo* como *in vitro*.

### C4L1

Esta línea se caracteriza por tener un crecimiento *in vitro* (en cultivo celular) de tipo epitelioides con células típicamente poligonales (figuras 3-7), las cuales manifiestan una gran adhesión al sustrato (su tiempo de despegue al repicar es >10 minutos). La estirpe epitelial ha sido confirmada por inmunomarcación positiva para queratinas (figura 5). Esta línea presenta un alto nivel de expresión de receptores hormonales (PR y ER), lo cual se ha puesto de manifiesto en todos los ensayos realizados, tanto bioquímicos como inmunohistoquímicos, en estos últimos presentando una marcación positiva en el 100% de las células observadas (figuras 3 y 4). Al repetir la técnica varias veces se concluyó que no era necesario un bloqueo con suero normal antes de la incubación con el primer anticuerpo, aunque sí lo era la permeabilización con tritón X-100 para una buena penetración del anticuerpo ya que se trata de antígenos nucleares. En el caso del receptor de progesterona se prefirió la utilización de un anticuerpo monoclonal con el fin de obtener una clara señal nuclear ya que el policlonal tenía mucha señal citoplasmática (válido para todas las líneas).

La C4L1 presenta una intensa marcación de c-erbB-2, en coincidencia con el resultado obtenido por Southern para el tumor primario C4HD, de donde fue obtenida esta línea y todas las "C4", el cual tiene el oncogen c-erbB-2 amplificado. Este marcador, de mal pronóstico en el cáncer de mama, se localiza en la membrana plasmática (figura 6). La expresión de la molécula de adhesión caderina E también ha sido comprobada en esta línea, mostrando una localización citoplasmática y de

membrana, continua a través de la monocapa celular, como ocurre en el epitelio normal (figura 7).

En su comportamiento *in vivo*, es decir, en el tumor que surge de inocular una suspensión celular de esta línea en ratones BALB/c, la C4L1 se manifiesta como un carcinoma ductal infiltrante, con un patrón de crecimiento cribiforme y tubular, y con metástasis en pulmón. Con un detalle microscópico (figura 8) se puede observar un crecimiento sólido constituido por masas de células neoplásicas de estirpe epitelial. Presenta diferenciación glandular de aspecto cribiforme, con secreción ocasional en las estructuras glandulares. Las células proliferantes son poligonales o aplanadas y muestran un núcleo pálido de cromatina laxa con uno o más nucleolos eosinófilos. Se observan numerosas mitosis y figuras de apoptosis. Presenta además zonas de necrosis que en ocasiones ocupa el centro de las masas sólidas, otorgándole un aspecto de tipo “comedón”. Tiene un estroma escaso e interpuesto, denso y aparentemente bien vascularizado. Se puede observar infiltración de polimorfonucleares por focos. La metástasis infiltra y destruye extensamente el tejido pulmonar adyacente (figura 9). Está compuesta por una masa de células neoplásicas de estructuraseudolobular con grandes núcleos atípicos y citoplasmas apenas visibles.

Al evaluar la presencia de receptores en el tumor se ha encontrado que tanto el PR como el ER son positivamente identificados en los cortes evaluados (figuras 10 y 11). Se utilizaron en ambos casos anticuerpos policlonales ya que el monoclonal producía cierta marcación inespecífica (aclaración válida para todas las líneas). Para evitar el mismo inconveniente se incubó con suero normal antes del primer anticuerpo (también en todas las líneas). Se confirmó nuevamente el origen epitelial de la línea realizando una marcación para queratinas (figura 12).



## C4L1

### Cultivo Celular

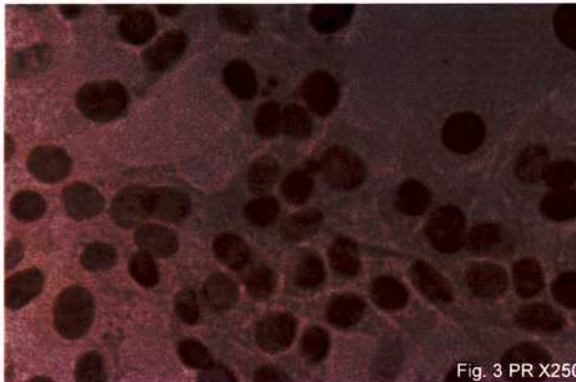


Fig. 3 PR X250

Receptor de progesterona (PR) in vitro: R15. Marcación nuclear positiva en un 100% de las células. X250

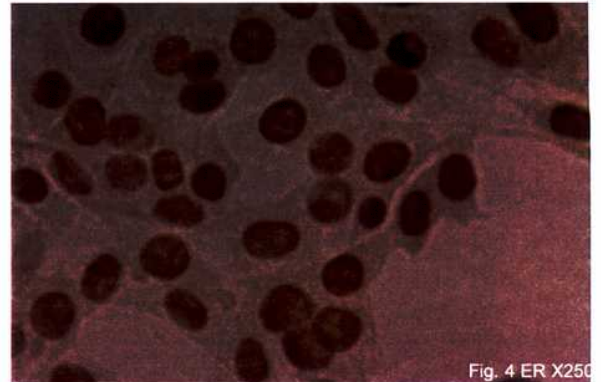


Fig. 4 ER X250

Receptor de estrógeno (ER) in vitro: R15. Marcación nuclear positiva en un 100% de las células. X250

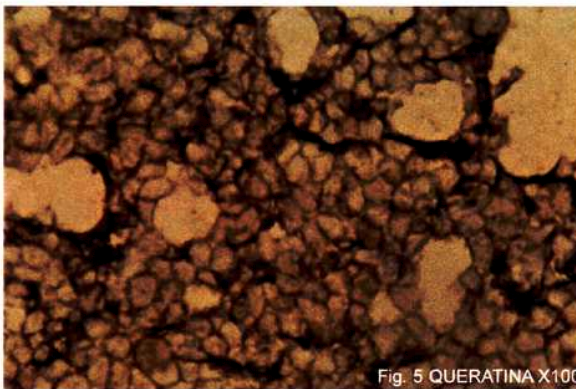


Fig. 5 QUERATINA X100

Queratina in vitro: R16. Marcación citoplasmática positiva aunque también se observa cierta marcación de membrana. Puede verse un desprendimiento de la monocapa celular. X400



Fig. 6 c-erbB2 X100

c-erbB-2 in vitro: R72. Marcación de membrana positiva en un 100%. X100

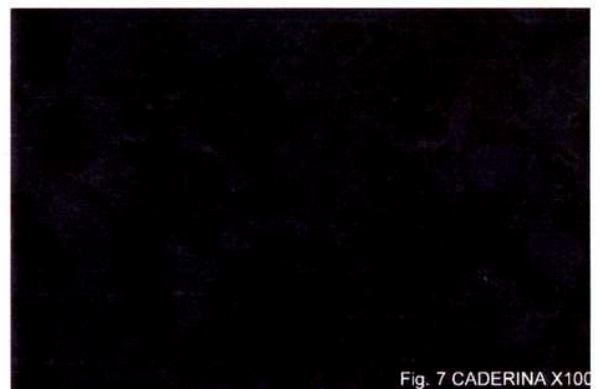


Fig. 7 CADERINA X100

Caderina in vitro: R72. Marcación citoplasmática positiva y continua entre células, en un 100%. X100

## C4L1

### Tejido Tumoral

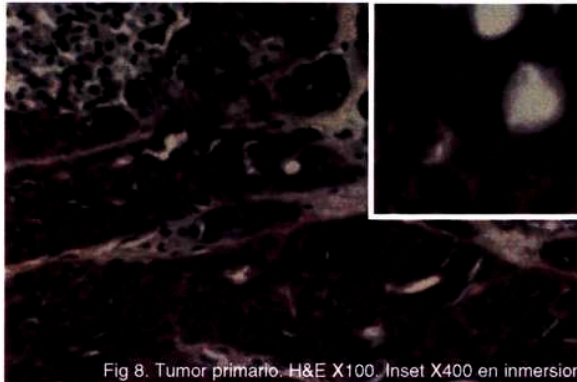


Fig. 8. Tumor primario. H&E X100. Inset X400 en inmersión. H&E (Hematoxilina y eosina): p3 (pasaje 3). X100. Se observan masas celulares con extensa necrosis y apoptosis, cierta diferenciación glandular y un estroma escaso. Inset X400 en inmersión. Observense dos mitosis y una criba.

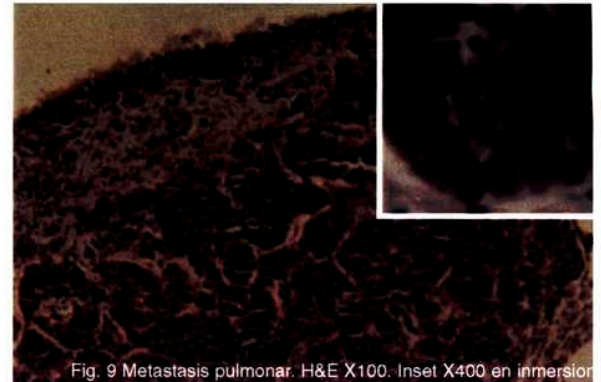


Fig. 9 Metastasis pulmonar. H&E X100. Inset X400 en inmersión. H&E: p3. X100. Se puede observar la cápsula fibrosa que rodea a la metástasis y como ésta infiltra el tejido pulmonar. Inset X400. Se muestran masas de células neoplásicas de estructuraseudolobular.

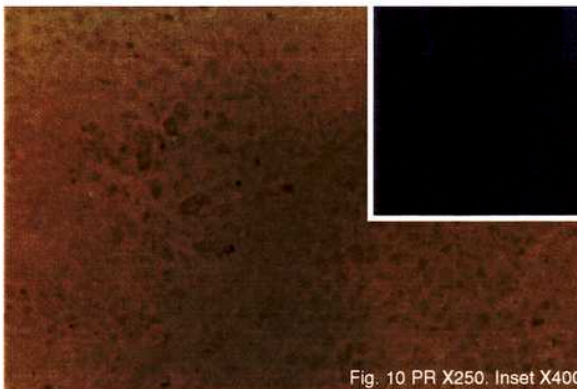


Fig. 10 PR X250. Inset X400. Receptor de progesterona (PR): X250. Tumor originado por inoculación de una suspensión celular de C4L1. Marcación nuclear positiva. Inset X400 (otro preparado).

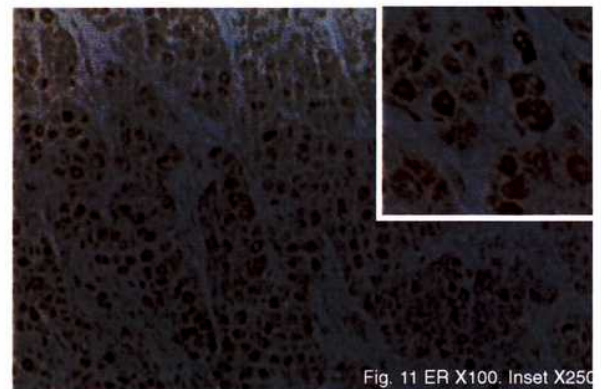


Fig. 11 ER X100. Inset X250. Receptor de estrógeno (ER): X100. Mismo tumor que para PR. Marcación nuclear positiva. Inset X250.

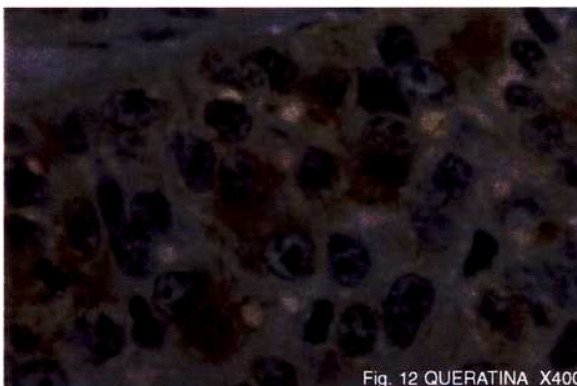


Fig. 12 QUERATINA X400

Queratina: Mismo tumor que para receptores hormonales. Marcación citoplasmática positiva, con mayor intensidad por zonas. El tumor fue fijado en formol y sometido a recuperación antigénica enzimática. Contraste nuclear: hematoxilina. X400.



## C4L2

Esta línea se caracteriza por un crecimiento *in vitro* de tipo fusocelular (figuras 13-17), de rápida adhesión y despegue (<5 minutos), con un crecimiento tridimensional importante (forma como “grumos”). Sus receptores hormonales dan una señal nuclear positiva en todas las células evaluadas (figuras 13 y 14). A pesar de su aspecto fibroblastoide su origen epitelial ha sido confirmado por inmunomarcación positiva para citoqueratinas (figura 15), la cual provee el mismo resultado tanto si se fija en alcohol como si se fija en formalina y luego, durante la inmunohistoquímica, se realiza una digestión enzimática con alguna proteasa, como tripsina, a 37°C. En cortes de tejido se puede realizar esta recuperación antigénica enzimática aunque contribuye a la desintegración arquitectónica y a la pérdida de detalle citológico del corte (Battifora y Kopinski, 1986); además, el sólo hecho de calentar la muestra ayuda a que se despegue más rápidamente del portaobjetos, hecho que ya ocurre debido a los numerosos pasajes por solventes orgánicos, alcoholes y lavados, aunque el vidrio se haya tratado con algún adhesivo como xilano o polilisina. C-erbB-2 y caderina son positivamente identificadas en los cultivos celulares de esta línea (figuras 16 y 17 respectivamente). Como ya se ha mencionado para la línea C4L1, es previsible encontrar una fuerte marcación para c-erbB-2, aunque el patrón de marcación no es exactamente el mismo (en la C4L2 se ve más de membrana) ya que el tumor que le dio origen tiene este oncogen amplificado.

En su crecimiento *in vivo* la C4L2 es realmente distinta de las otras líneas C4 en cuanto a que es de tipo sarcomatoide, con invasión local, axilar y pulmonar. Histológicamente se puede observar (figura 18) un tumor compuesto por células en su mayoría fusiformes, ocasionalmente poligonales, que crece en forma sarcomatoide, formando haces irregulares que infiltran y disocian el tejido muscular. El estroma aparece escaso aunque la lesión parece bien vascularizada; llama la atención la presencia de numerosas células mononucleares, dispuestas a veces en acúmulos, con las características citológicas de mastocitos. Las células proliferantes son sumamente atípicas, con núcleos monstruosos, polilobulados o bien, multinucleados. La cromatina es de distribución irregular y presentan uno o más nucleolos. Hay frecuentes figuras mitóticas anómalas. En focos, la proliferación parece más de tipo epiteliode.



La expresión de sus receptores es comparable a la de cualquier línea *in vivo* (figuras 20 y 21) sin embargo, llama la atención su comportamiento progestágeno-independiente *in vivo*, a diferencia del resto de sus pares C4 y la parental C4HD.

El origen epitelial de la C4L2 ha sido confirmado nuevamente por una marcación positiva para queratina (figura 22). Ha sido bastante difícil obtener resultados positivos convincentes (tanto en esta línea como en casi todas las otras exceptuando la C4L1, la C4L3 y la C7L1) ya que la fijación en formalina de la muestra no favorece la preservación de los filamentos intermedios, lo que sí ocurre al fijar con alcohol (Battifora y Kopinski, 1986) o habiendo fijado el tejido en formalina realizar una digestión enzimática con tripsina. Al aplicar esta técnica los resultados fueron optimizados pero no tan buenos como los obtenidos en cultivo.

Se realizaron también distintas coloraciones como para conocer otros rasgos del tumor, como por ejemplo, si produce o no mucopolisacáridos, y si lo hace, si son ácidos o neutros, el tipo de tejido que infiltran, conectivo o muscular, su origen histológico, si es carcinoma o sarcoma, etc. La coloración con ácido periódico- reactivo de Schiff (PAS) muestra células PAS positivas dispersas con diferenciación glandular, que es donde se secretan los mucopolisacáridos neutros, y las necrosis en un rosa pálido, mientras que la tinción con Alcian blue se manifiesta escasamente en ciertas zonas reducidas del estroma (figura 24). Las fibras de reticulina definen al tumor de tipo carcinoma (figura 25). La coloración con tricrómico de Masson muestra un abundante estroma en verde esmeralda y unos pequeños paquetes musculares, no disociados por el tumor, en rojo (figura 26).

## C4L2

### Cultivo Celular

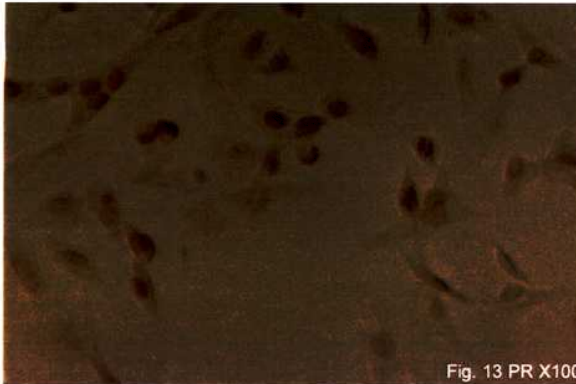


Fig. 13 PR X100

Receptor de progesterona (PR): R15. Marcación nuclear positiva para RP en un 100% de las células (de tipo fusiforme). X250

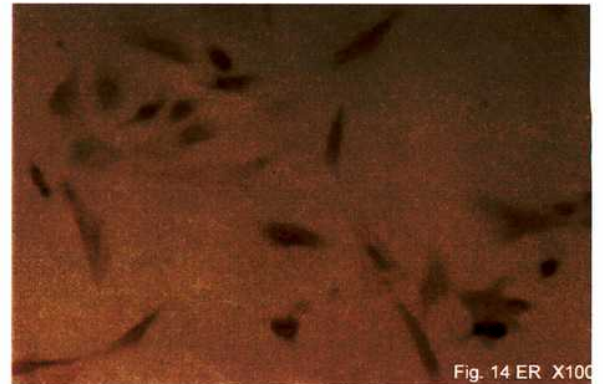


Fig. 14 ER X100

Receptor de estrógenos (ER): R15. Marcación nuclear positiva para ER en un 80% de las células. X250

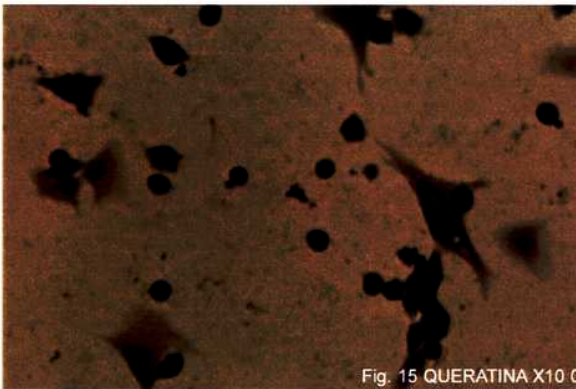


Fig. 15 QUERATINA X100

Queratina: R19. Marcación citoplasmática positiva (contraste: hematoxilina). Se puede observar una célula binucleada. X250

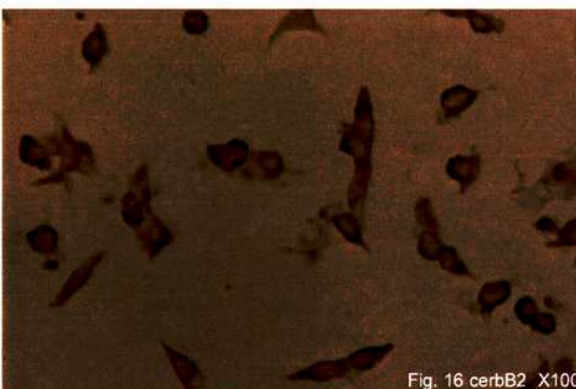


Fig. 16 c-erbB2 X100

c-erbB-2: R22. Marcación de membrana positiva en un 100%. X100.

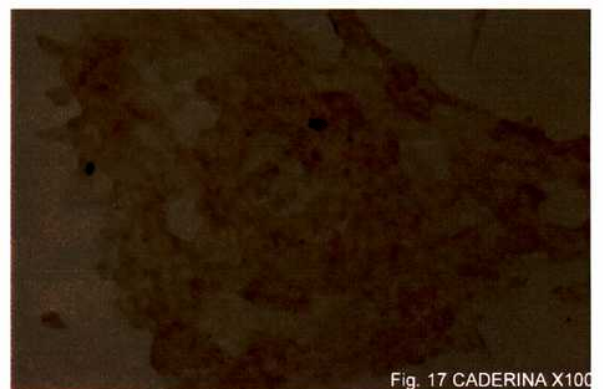


Fig. 17 CADERINA X100

Caderina: R20. Marcación citoplasmática positiva, continua entre células, en un 100%. X100.



## C4L2

### Tejido Tumoral

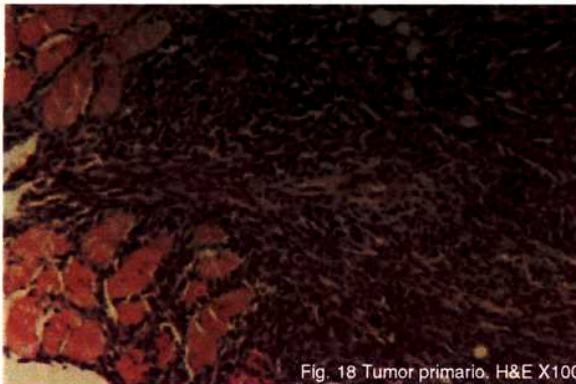


Fig. 18 Tumor primario. H&E X100

H&E: p1. Tumor originado de la inoculación de una suspensión celular de C4L2 en R15. Se observan haces irregulares de células fusiformes que infiltran y disocian el músculo estriado. X100

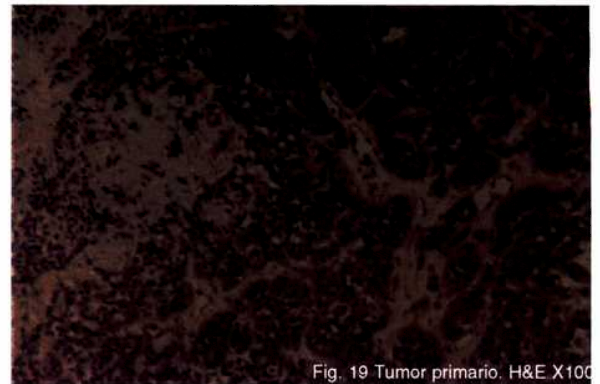


Fig. 19 Tumor primario. H&E X100

H&E: Se observan masas tumorales irregulares, amplias zonas de necrosis, figuras apoptóticas y edema. X100

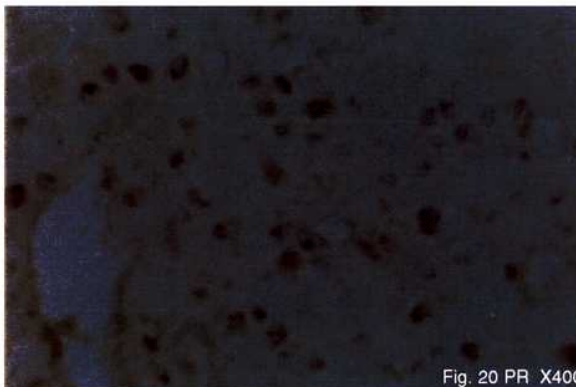


Fig. 20 PR X400

Receptor de progesterona (PR): p5. Marcación nuclear positiva para RP. X400.

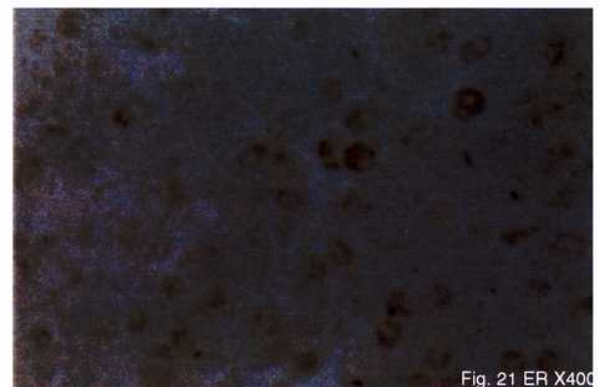


Fig. 21 ER X400

Receptor de estrógenos (ER): p5. Marcación nuclear positiva para ER. X400.

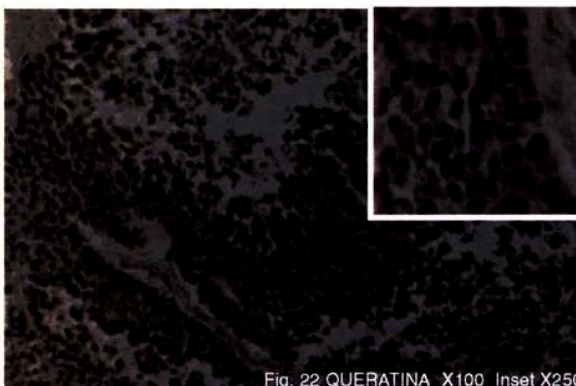


Fig. 22 QUERATINA X100 Inset X250

Queratina: p5. Marcación citoplasmática positiva. Contraste nuclear: hematoxilina. El tumor fue fijado en alcohol. X100. Inset X250



Fig. 23 Control del anticuerpo primario. X100

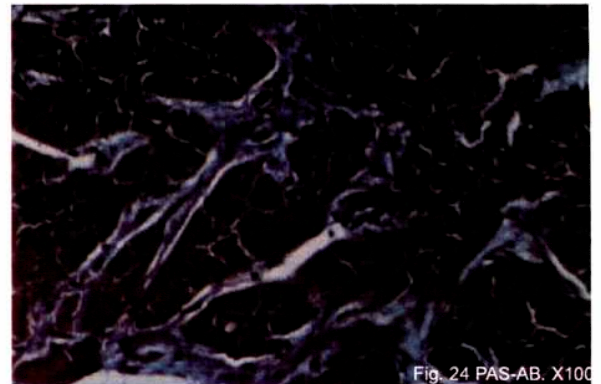
Control del anticuerpo primario: Se muestra un corte de tumor que fue sometido a una IHQ omitiendo la incubación con el primer anticuerpo. Se puede observar la ausencia total de marcación. X100



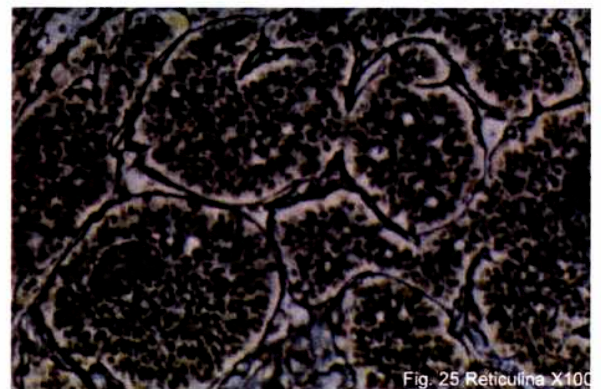
## C4L2

### Tejidos Tumorales-Coloraciones

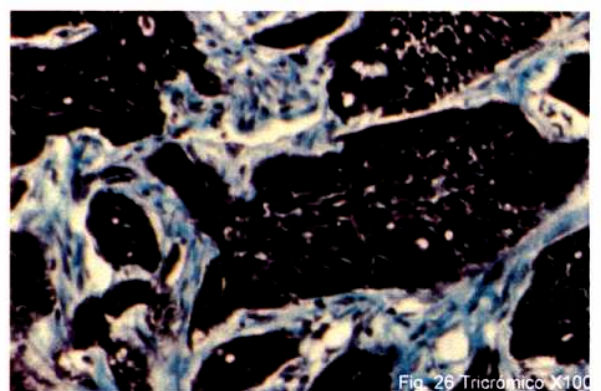
PAS-AB: Se pueden observar escasas células PAS positivas dispersas y áreas de necrosis en un color más pálido. X100



Gomori: Se observa el tramado de las fibras reticulínicas rodeando las masas tumorales. X100



Tricómico de Masson: Las masas tumorales aparecen en azul violáceo y el estroma en verde esmeralda. X100



### C4L3

Esta línea se caracteriza por tener un crecimiento *in vitro* de tipo epitelioides con células típicamente poligonales (figuras 27-32), de lenta adhesión al sustrato (tiempo de despegue >10 minutos). La estirpe epitelial ha sido confirmada por inmunomarcación positiva para queratinas (figura 29). Se ha hallado que también expresa vimentina (figura 30). Esta línea presenta un alto nivel de expresión de receptores hormonales (PR y ER) en la determinación inmunohistoquímica de los mismos, en la cual presenta una marcación positiva en el 100% de las células observadas (figuras 27 y 28). Fue sumamente difícil obtener un resultado positivo en esta línea para los receptores hormonales porque cada vez que se repetía la técnica se observaba una coloración inespecífica de algún tipo de cristal. Esta aparente sobreproducción mucosa o precipitado proteico ya se había observado al ultracentrifugar las células para obtener extractos nucleares para la determinación bioquímica de receptores. Se resolvió el problema lavando exhaustivamente las células antes de fijarlas y también antes y después de tratarlas con tritón X-100.

Así como para la línea C4L1 y C4L2, c-erbB-2 y caderina son positivamente identificadas en los cultivos celulares (figuras 31 y 32).

En su comportamiento *in vivo*, la C4L3 se manifiesta como un carcinoma ductal con un patrón de crecimiento sólido, prácticamente sin signos de diferenciación glandular (figuras 33 y 34). Se observan numerosos islotes de gran tamaño que en la periferia de la proliferación se transforman en lengüetas que infiltran el tejido conectivo adyacente. Las células proliferantes son grandes, con núcleos ovoides y cromatina laxa, con uno o ningún nucleolo, y citoplasmas claros de tamaño variable (figura 33, inset). El estroma es abundante y fibroblástico en áreas. Existen amplias zonas de necrosis y trombosis. Existen focos de marcado pleomorfismo celular, en general, en la periferia del tumor. Tiene numerosas figuras apoptóticas. Presentan receptores hormonales (figuras 35 y 36) y marcación positiva para citoqueratinas (figura 37).

## C4L3

### Cultivo Celular

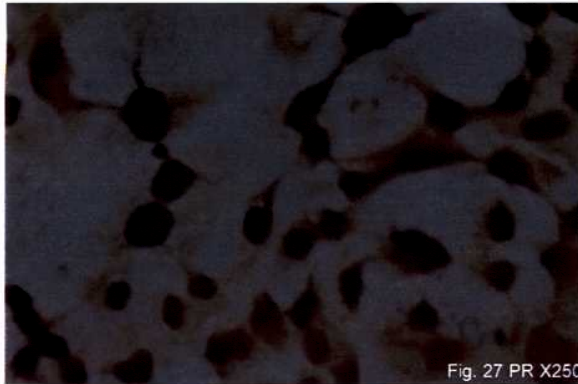


Fig. 27 PR X250

Receptor de progesterona (PR): R23. Marcación nuclear positiva para RP en un 100% de las células. X250

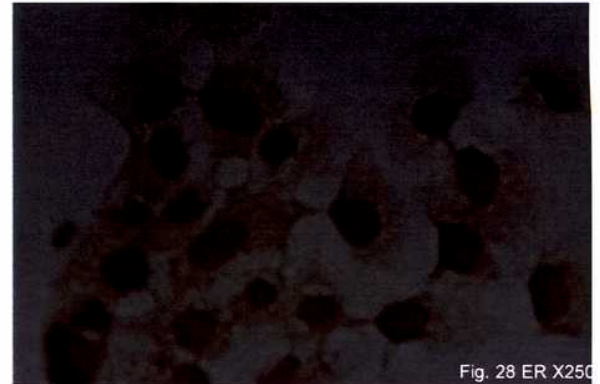


Fig. 28 ER X250

Receptor de estrógenos (ER): R23. Marcación nuclear positiva para ER en un 100% de las células. X250

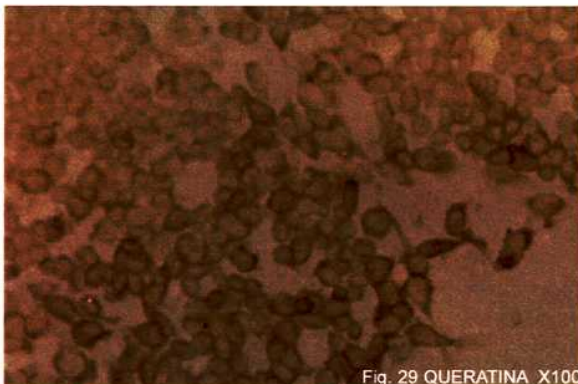


Fig. 29 QUERATINA X100

Queratina: R6. Marcación citoplasmática positiva. X100

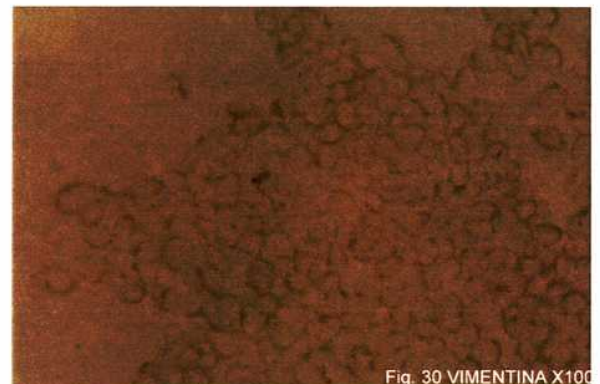


Fig. 30 VIMENTINA X100

Vimentina: R6. Marcación citoplasmática positiva (más tenue que para citoqueratina). X100



Fig. 31 c-erbB-2 X250

c-erbB-2: R14. Marcación de membrana positiva en un 100%. X250



Fig. 32 CADERINA X250

Caderina: R23. Marcación de membrana, continua entre células, positiva en un 100%. X250



## C4L3

### Tejido Tumoral

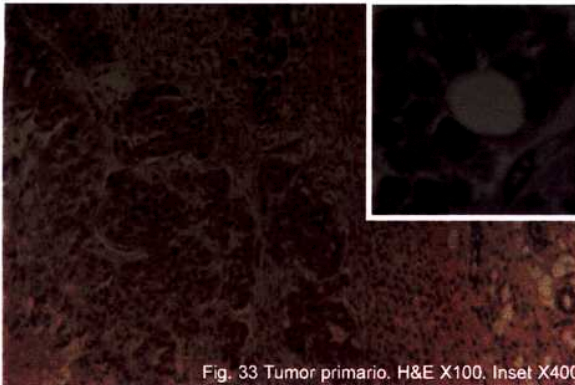


Fig. 33 Tumor primario. H&E X100. Inset X400

H&E: Tumor originado en la inoculación de una suspensión celular de C4L3. X100. El tumor infiltra extensamente los tejidos adyacentes. Se observan restos de conductos de glándula mamaria normal. Inset X400 Se pueden ver núcleos uniformes redondos u ovoides y una criba.

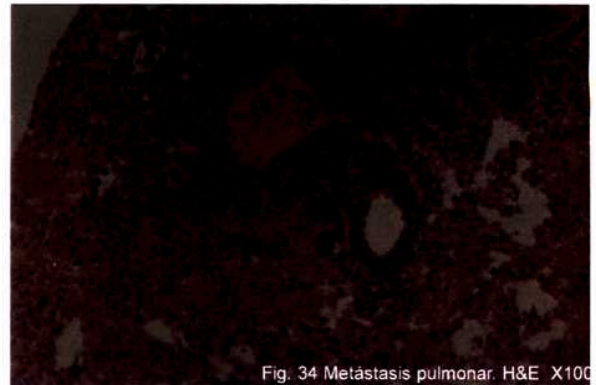


Fig. 34 Metástasis pulmonar. H&E X100

H&E: Metástasis pulmonar creciendo alrededor del sistema broncovascular. El pulmón presenta extensa hemorragia y bronconeumonía. X100

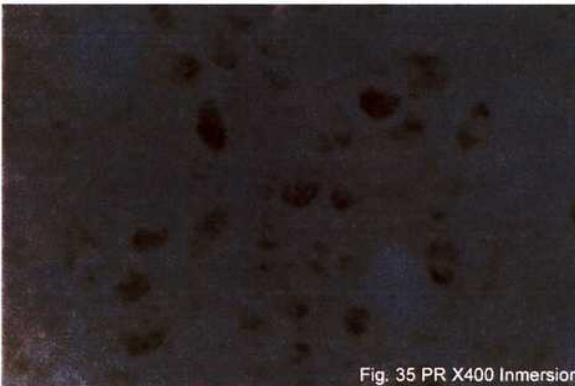


Fig. 35 PR X400 Inmersión

Receptor de progesterona (PR): Tumor originado por la inoculación de una suspensión de células C4L3. Marcación nuclear positiva para PR. X400 en inmersión.

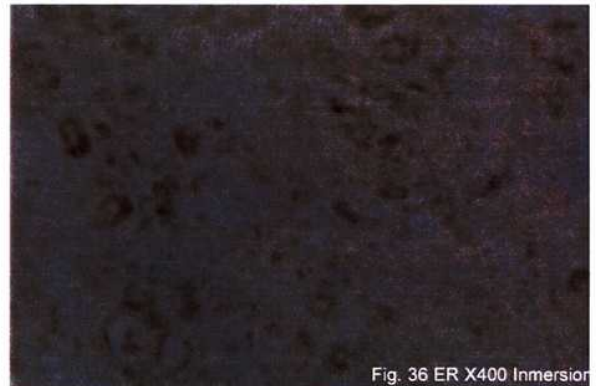


Fig. 36 ER X400 Inmersión

Receptor de estrógenos (ER): Mismo tumor que para PR. Marcación nuclear positiva para ER. X400 en inmersión.

Queratina: Mismo tumor que para PR y ER. Marcación citoplasmática positiva. Se observan láminas de células neoplásicas con ocasional diferenciación glandular, un escaso estroma fibroso interpuesto, marcadas anisocariosis y numerosas figuras mitóticas. Tumor fijado con formol y tratado con enzima. Contraste: hematoxilina. X250

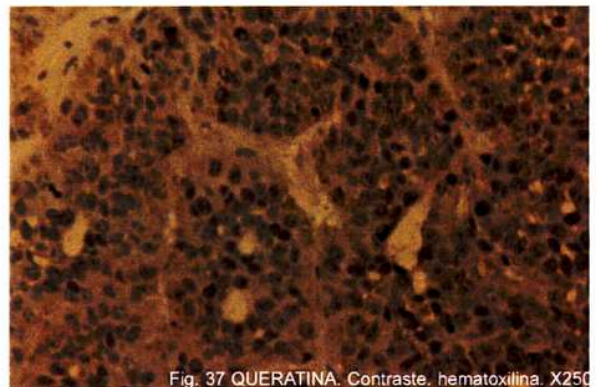


Fig. 37 QUERATINA. Contraste. hematoxilina. X250

#### C4L4

Esta línea se caracteriza por un crecimiento *in vitro* de tipo poligonal (figuras 38-43) y una lenta adhesión al sustrato (tiempo de despegue mayor a 10 minutos). Su origen epitelial ha sido confirmado por marcación positiva para citoqueratinas (figura 40). Sus receptores hormonales dan una señal nuclear positiva en todas las células evaluadas (figuras 38 y 39) aunque esta línea presentó la misma dificultad que la C4L3 para la determinación de los mismos. Así como para la línea C4L1, c-erbB-2 y caderina son positivamente identificadas en los cultivos celulares (figuras 42 y 43).

En su crecimiento *in vivo* la línea C4L4 forma masas sólidas de distinto tamaño y muestra ocasional diferenciación glandular en forma de tubos irregulares con secreción en su interior (figura 44). En otros sectores se observan imágenes vagamente cribiformes con luces glandulares diminutas. Muestra amplias zonas de necrosis. Infiltra extensamente el tejido adyacente. Se pueden distinguir dos tipos de poblaciones celulares, una de una gran relación N/C (núcleo/citoplasma) con núcleos ovoides de cromatina laxa o grumosa con un nucleolo eosinófilo central y citoplasma escaso y eosinófilo. La otra, en general asociada con la diferenciación glandular tubular, está constituida por células de citoplasma amplio y eosinófilo y núcleos ovoides o alargados, con varios cromocentros. A pesar de estas diferencias las células son en general muy atípicas y de tamaño heterogéneo. Se observan más de dos mitosis atípicas por campo así como figuras apoptóticas (figura 44, inset). Existe infiltración del ganglio homolateral (figura 45). Expresa receptores hormonales (figuras 46 y 47) y citoqueratinas (las figuras 48 y 49 muestran epitelio del pulmón con metástasis con marca positiva).

También se realizaron varias coloraciones como para conocer otros rasgos del tumor. La coloración con ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) muestra un tumor uniformemente violáceo, mientras que la tinción con Alcian blue se manifiesta pobremente en el estroma (figura 50). Las fibras de reticulina definen al tumor de tipo carcinoma, con una distribución típicamente epitelial (figura 51). En el estroma la trama reticulínica rodea célula por célula. La coloración con tricrómico de Masson muestra un abundante estroma en verde esmeralda (figura 52).



Receptor de progesterona (PR): R27. Marcación nuclear positiva para RP. X250

Receptor de estrógenos (ER): R27. Marcación nuclear positiva para ER en un 100% de las células. X250

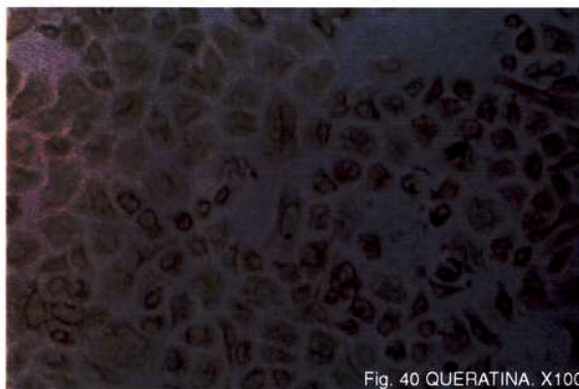


Fig. 40 QUERATINA. X100

Queratina: R21. Marcación citoplasmática positiva. X100

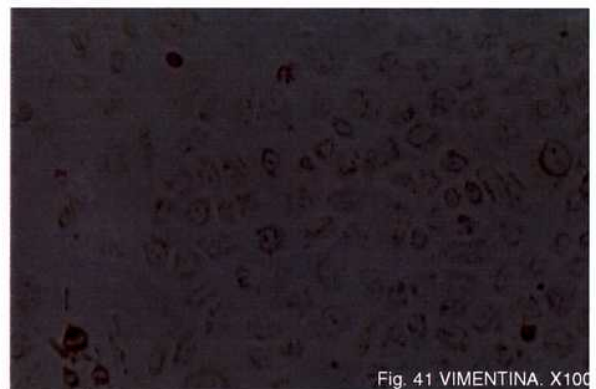


Fig. 41 VIMENTINA. X100

Vimentina: R21. Marcación citoplasmática positiva. X100

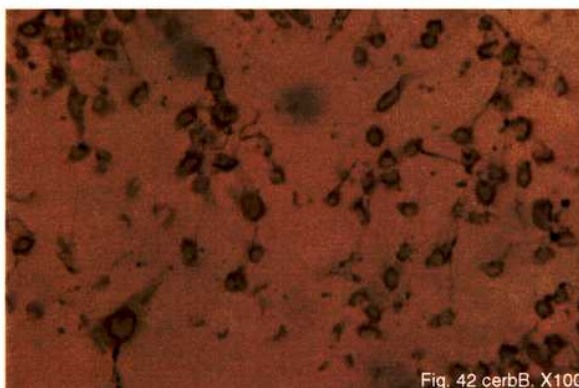


Fig. 42 cerbB. X100

c-erbB-2: R12 Marcación de membrana positiva en un 100%. X100



Fig. 43 CADERINA. X250

Caderina: R27 Marcación citoplasmática positiva (de localización más periférica) en un 100%. X250



## C4L4

### Tejido Tumoral

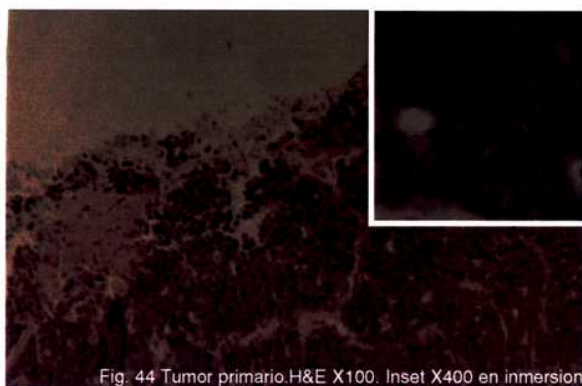


Fig. 44 Tumor primario. H&E X100. Inset X400 en inmersión

H&E: p5. Se observan masas sólidas irregulares de escasa diferenciación glandular y extensas zonas de necrosis. X100. Inset: Se muestran células atípicas de gran relación N/C. Obsérvese la mitosis. X400 en inmersión

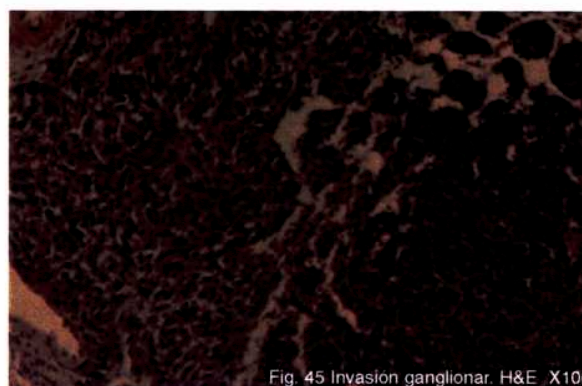


Fig. 45 Invasión ganglionar. H&E X100

H&E: p5. Se puede observar cómo el ganglio es infiltrado por la proliferación de células neoplásicas. Aparentemente no hay diferenciación estructural. X100

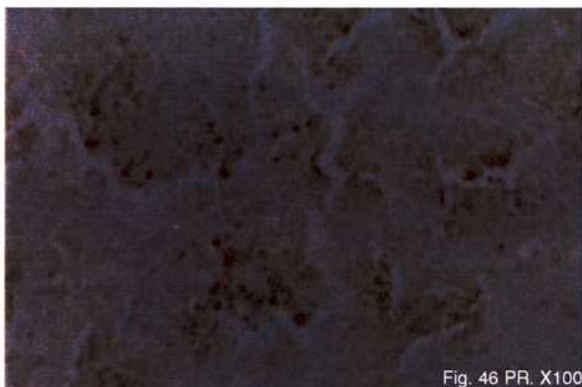


Fig. 46 PR. X100

Receptor de progesterona (PR): p5. Marcación nuclear positiva. X100

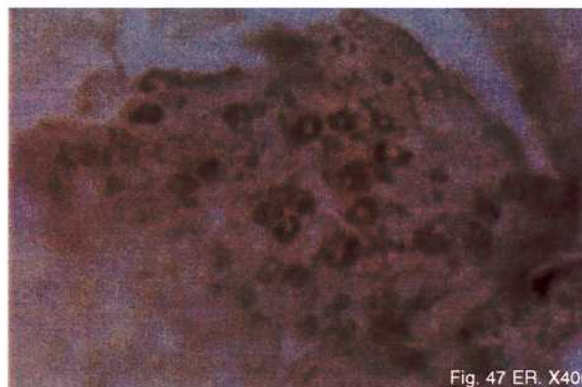


Fig. 47 ER. X400

Receptor de estrógenos (ER): p5. Marcación nuclear positiva. X400



Fig. 48 QUERATINA. X100

Queratina: p5. Marcación citoplasmática positiva (contraste: hematoxilina) del epitelio pulmonar. X100



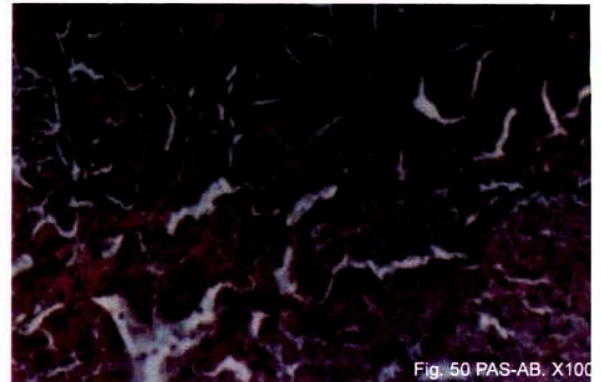
Fig. 49 QUERATINA. X250

Queratina: Mismo preparado anterior pero a mayor aumento. X250

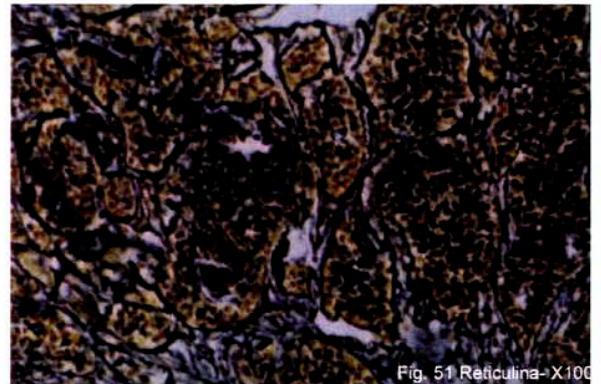
## C4L4

### Tejidos Tumorales-Coloraciones

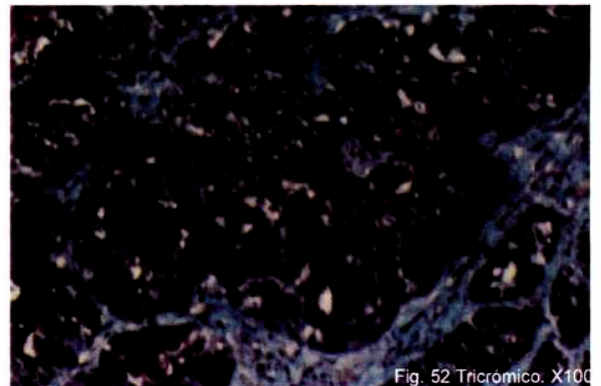
PAS-Alcian Blue: Marcación focal con diferenciación glandular en. X100.



Gomori: Se observan las fibras de reticulina en negro rodeando las masas tumorales. X100



Tricrómico de Masson: Se puede ver una abundante estroma (verde esmeralda). X100



## C4L5

Esta línea se caracteriza por un crecimiento *in vitro* de tipo poligonal (figuras 53-55) y una lenta adhesión (tiempo de despegue >10 minutos). Sus receptores hormonales dan una señal nuclear positiva en todas las células evaluadas (figuras 53 y 54). Así como todas las otras líneas C4, c-erbB-2 y caderina (figura 55) son positivamente identificadas en los cultivos celulares. Aunque no se muestra la foto correspondiente, c-erbB-2 presenta en la C4L5 un patrón muy similar al de la C4L4 (figura 42).

En su crecimiento *in vivo* la línea C4L5 se manifiesta como un carcinoma ductal infiltrante que forma masas sólidas de tamaño irregular con ocasional diferenciación glandular (figura 56). El estroma es escaso. El tumor es de crecimiento relativamente rápido e infiltra extensamente los tejidos adyacentes. Presenta amplias zonas de necrosis. Las células proliferantes son de tipo poligonales, con una alta relación N/C. Los núcleos son ovoides, bien eosinófilos, de cromatina grumosa irregularmente distribuida, y en general, presentan un solo nucleolo. Presenta aproximadamente 1 mitosis por campo de 40X. Se observan metástasis en axila (figura 58), en ganglio (figura 57) pero no en pulmón. Expresa receptores hormonales (figuras 60 y 61) y citoqueratinas (figura 59).

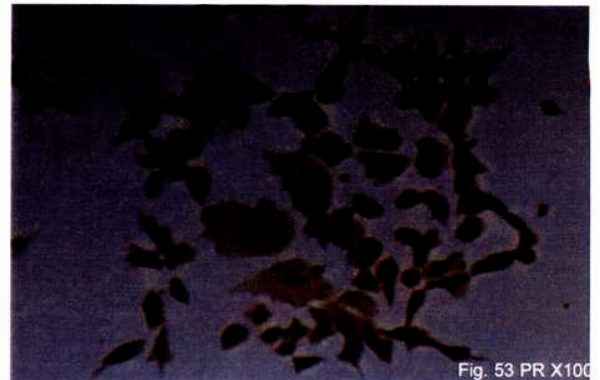
También se realizaron en esta línea varias coloraciones adicionales. La coloración con ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) muestra escasos indicios de secreción de mucopolisacáridos neutros, mientras que la tinción con Alcian blue tiñe pequeñas lagunas entre las células de la masa tumoral (figura 62), un poco más que la línea anterior, la C4L4. Las fibras de reticulina definen al tumor de tipo carcinoma (figura 63). La coloración con tricrómico de Masson muestra un escaso estroma en verde esmeralda, mientras que las masas tumorales aparecen en un violeta-azulado (figura 64).



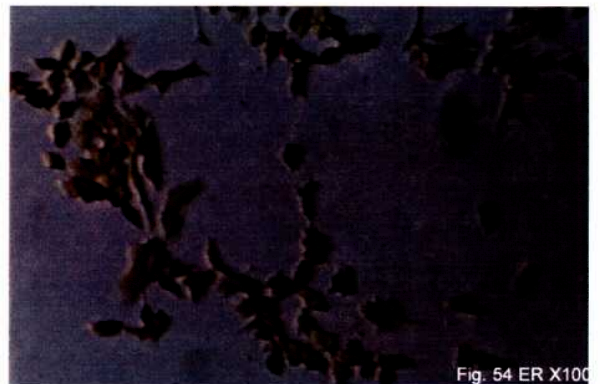
## C4L5

### Cultivo Celular

Receptor de progesterona (PR): R10. Marcación nuclear positiva. X100



Receptor de estrógenos (ER): R10 Marcación nuclear positiva. X100.



Caderina: R10. Marcación citoplasmática positiva aunque de menor intensidad que en las otras líneas. X100



## C4L5

### Tejido Tumoral

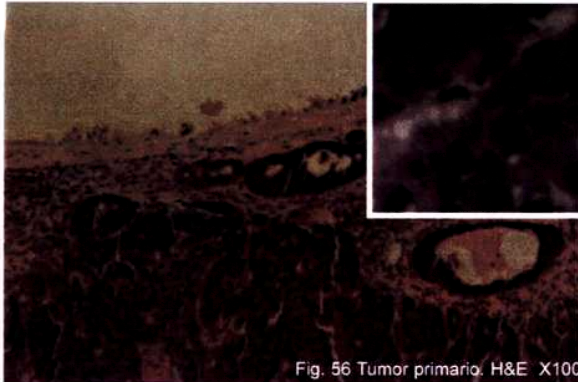


Fig. 56 Tumor primario. H&E X100

H&E: p5. En el tumor primario se pueden observar islotes celulares sólidos con estructuras neoplásicas dilatadas con contenidos serosanguinolentos y zonas necróticas. X100. Inset: núcleos enormes (de alta relación N/C) y nucleolos evidentes. X400 en inmersión.

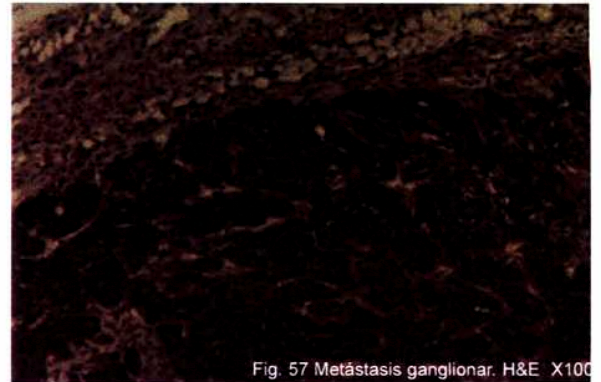


Fig. 57 Metástasis ganglionar. H&E X100

H&E: p5. La proliferación borra completamente las estructuras ganglionares e infiltra el tejido celular de la axila. X100

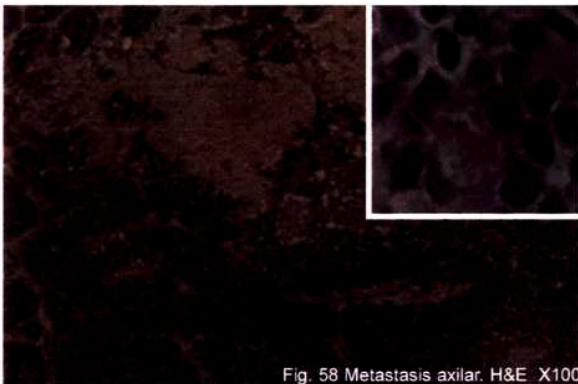


Fig. 58 Metastasis axilar. H&E X100

H&E: p5. Se pueden ver islotes irregulares de células neoplásicas y vastas zonas necróticas. X100. Inset: X400

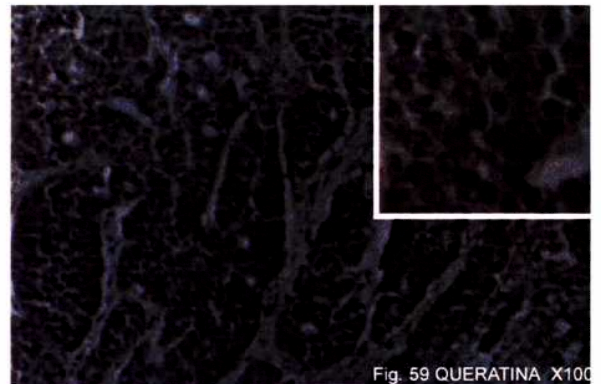


Fig. 59 QUERATINA X100

Queratina: p5. Marcación citoplasmática positiva (contraste: hematoxilina). Se puede observar cierto "background" (el tumor fue fijado en alcohol). X100. Inset: X250.

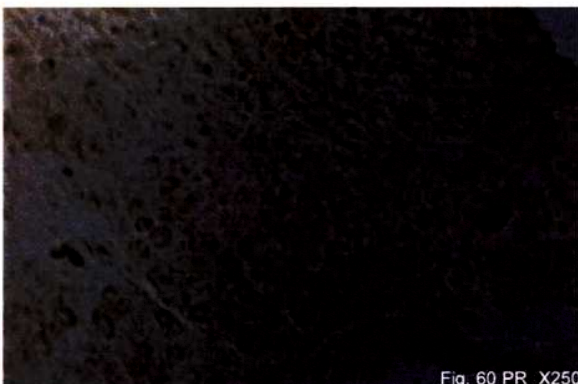


Fig. 60 PR X250

Receptor de progesterona (PR): p5. Marcación nuclear positiva. X250



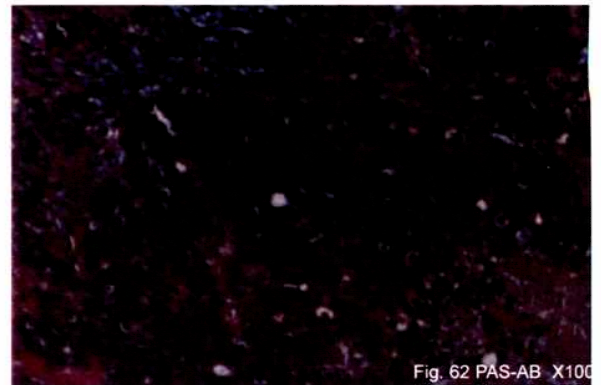
Fig 61 ER X100

Receptor de estrógenos (ER): p5. Marcación nuclear positiva. X250

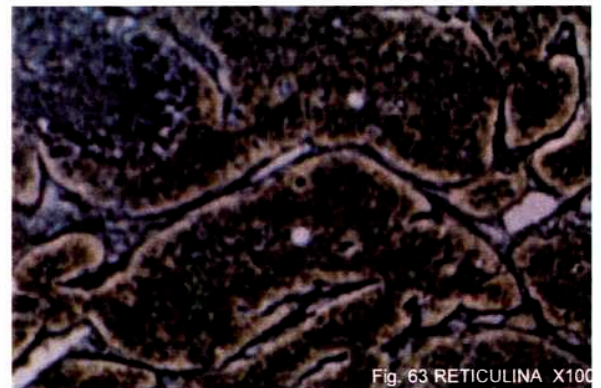
## C4L5

### Tejidos tumorales-Coloraciones

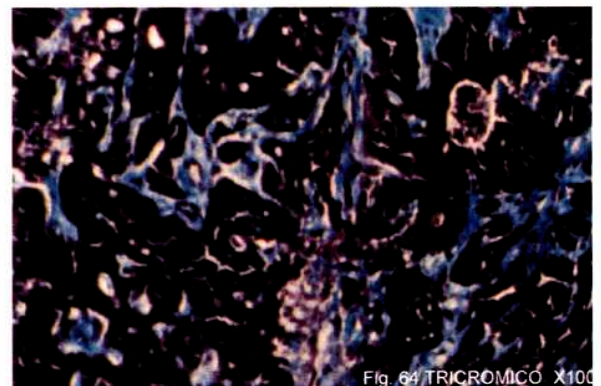
PAS-AB: p5. Se pueden observar pequeñas lagunas de mucopolisacáridos ácidos (en celeste). X100



Gomori: p5. Las fibras de reticulina, en negro, rodean las masas tumorales. Se puede observar una amplia zona de necrosis (en gris) en la esquina superior izquierda. X100



Tricrómico de Masson: p5. Llama la atención el abundante estroma interpuesto, en verde esmeralda. X100





## C7L1

Esta línea se caracteriza por un crecimiento *in vitro* de tipo fusocelular (figuras 65-68), de rápida adhesión y despegue (< 10 minutos). Sus receptores hormonales dan una señal nuclear positiva en todas las células evaluadas (figuras 65 y 66). A pesar de su aspecto fibroblastoide su origen epitelial ha sido confirmado por inmunomarcación positiva para citoqueratinas (figura 67). También muestra expresión de vimentina (figura 68). A diferencia de las otras líneas, c-erbB-2 y caderina no muestran una clara reacción positiva (figuras 69 y 70), lo que será discutido más tarde.

En su crecimiento *in vivo* la C7L1 presenta células poligonales de citoplasma denso y eosinófilo que forman masas sólidas sin signos de diferenciación estructural (figura 71). Su estroma es escaso y el cuadro general impresiona como un carcinoma indiferenciado. Los núcleos son sumamente atípicos, ovoides o circulares con nucleolos, o bien, condensados e hipercromáticos. También presenta formas monstruosas, multinucleadas o polilobuladas. Llama la atención la cantidad de mitosis (hasta más de 20 por campo de 40X) y las amplias zonas de necrosis. El tumor infiltra en napas los tejidos vecinos. En el caso examinado, las metástasis pulmonares observadas (figura 72) muestran más aspecto epitelioide que el tumor primitivo. La proliferación ha infiltrado y metastatizado riñón (figura 73) y ganglios linfáticos. Expresa receptores hormonales (figuras 75 y 76) y citoqueratina (figura 74).

En la tabla 4 (página 70) se resumen los resultados obtenidos para todas las líneas.

## C7L1

### Cultivo Celular

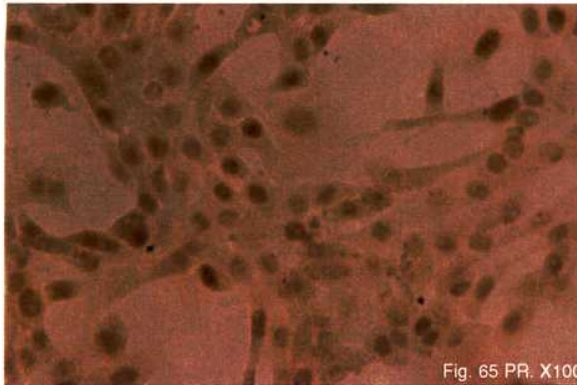


Fig. 65 PR. X100

Receptor de progesterona (PR): R13 Marcación nuclear positiva. X250

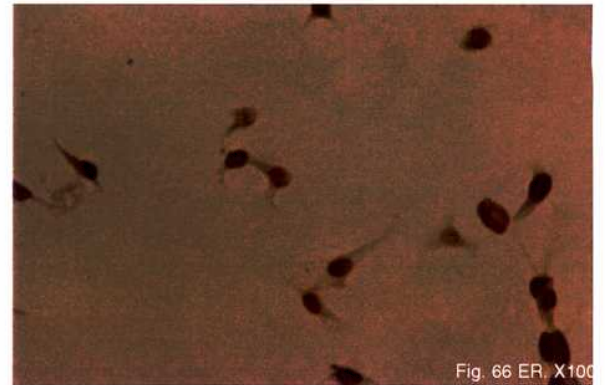


Fig. 66 ER. X100

Receptor de estrógenos (ER): R13 Marcación nuclear positiva. X250

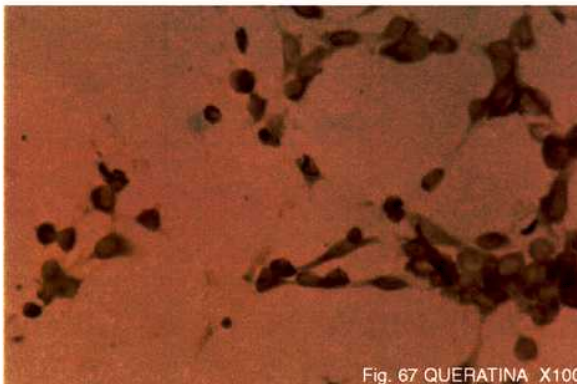


Fig. 67 QUERATINA X100

Queratina en cultivo: R13. Marcación citoplasmática positiva. X100

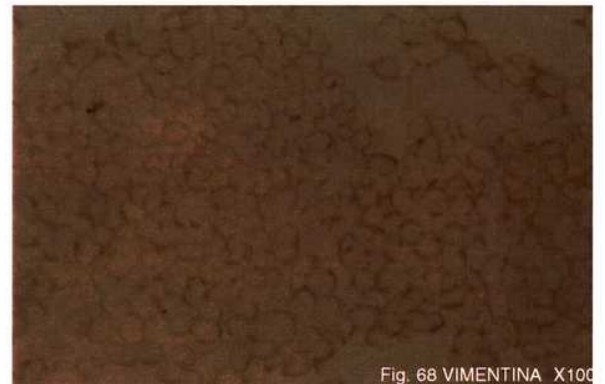


Fig. 68 VIMENTINA X100

Vimentina en cultivo: R13. Marcación citoplasmática positiva (más leve que la marcación de queratinas). 100



Fig. 69 C-erbB-2 X100

c-erbB-2 en cultivo: R33. Marcación de membrana positiva tenue. Se observa también marcación citoplasmática. X100.

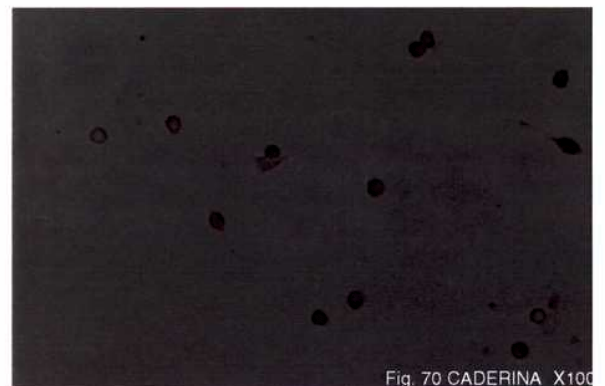


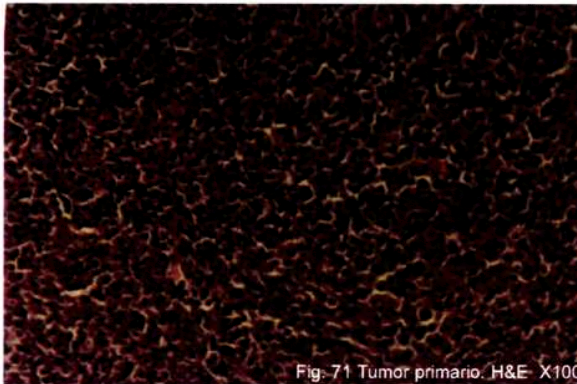
Fig. 70 CADERINA X100

Caderina en cultivo: R33. Marcación citoplasmática poco común para caderina (las células parecen, además, no estar muy vitales). X100.

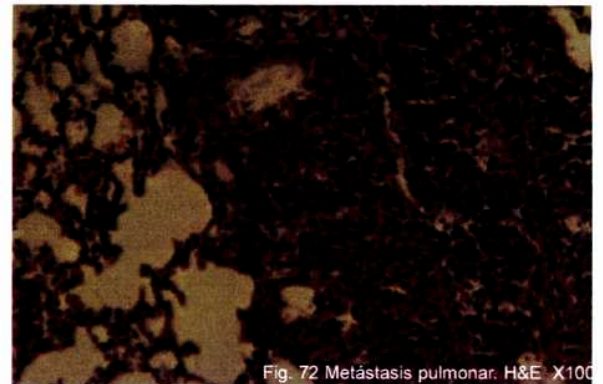


## C7L1

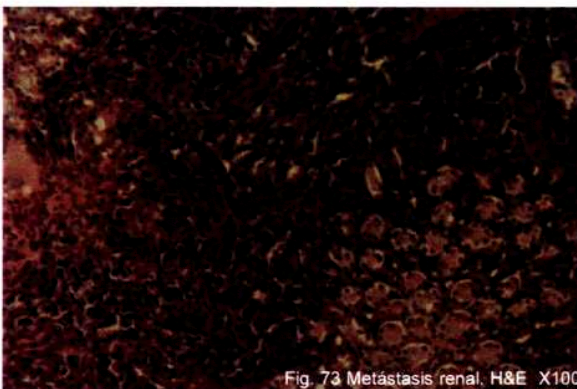
### Tejido tumoral



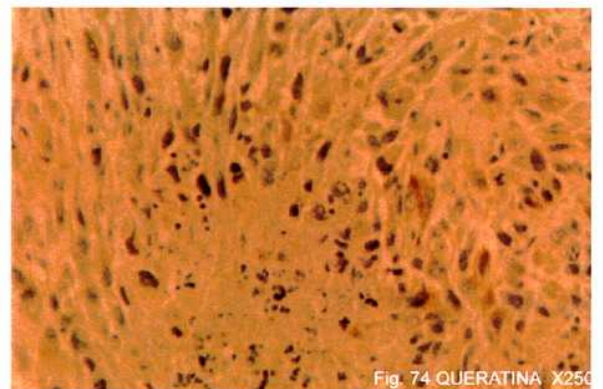
H&E: p1. Se observa una masa homogénea de células muy atípicas. No existe signo alguno de diferenciación histológica. X100



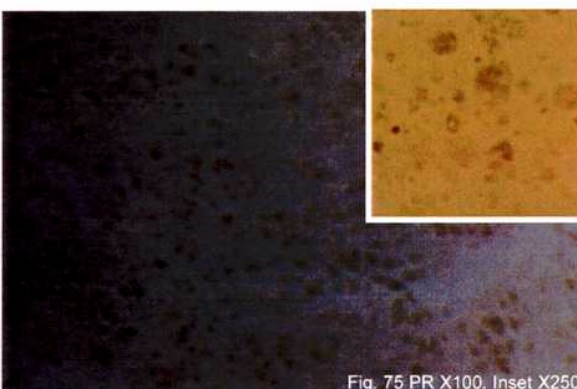
H&E: p1. Se puede observar un grupo de células proliferando dentro de un vaso del pulmón. Las células son, en general, muy atípicas. X100



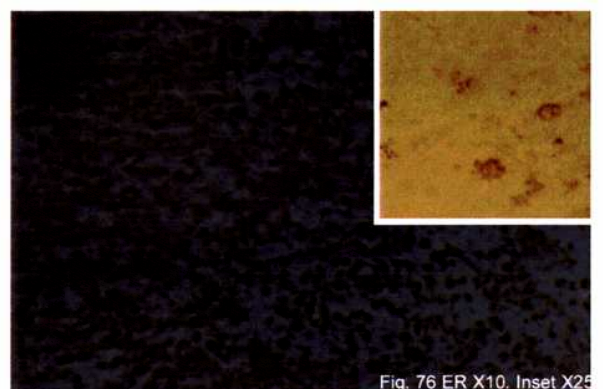
H&E: p1. La proliferación de células muy atípicas infiltra difusamente el parénquima renal, disectando corpúsculos y glomerulos. X100



Queratina: Mismo tumor que para receptores hormonales. Marcación citoplasmática positiva (contraste: hematoxilina). Se observan numerosas células fusiformes con núcleos atípicos, un abundante estroma interpuesto y una zona de necrosis. X250



Receptor de progesterona (PR): p1. Tumor originado por la inoculación de una suspensión celular de C7L1. Marcación nuclear positiva. X100. Inset: en otro preparado. X250



Receptor de estrógenos (ER): p1. Mismo tumor que para PR. Marcación nuclear positiva. X100. Inset: en otro preparado. X250



Tabla 4. Resultados

	Característica evaluada	C4-L1	C4-L2	C4-L3	C4-L4	C4-L5	C7-L1
IN VITRO	Tumor original	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C7-L1
	Morfología	epitelioide	fibroblastoide	epitelioide	epitelioide	epitelioide	fibroblastoide
	Despegado	> 10 min.	< 5 min.	> 10 min.	> 10 min.	> 10 min.	< 5 min.
	RE	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	RP	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Citoqueratinas	+++	+++	+++	+++	ND	+++
	c-erbB2	++	++	++	++	++	+
	Caderina E	++	++	++	++	++	+
	RE y RP	++	++	++	++	++	++
	Citoqueratinas	++	++	++	++	++	++
IN VIVO	Morfología	Carcinoma ductal infiltrante	Carcinoma fusocelular	Carcinoma ductal infiltrante	Carcinoma ductal infiltrante	Carcinoma ductal infiltrante	Carcinoma indiferenciado
	Patrón de invasión y metástasis	Pulmonar	Inv local, axilar y pulmonar	pulmonar	pulmonar	pulmonar	Inv local, axilar y pulmonar

## DISCUSSION

## DISCUSION

Con el objetivo de poder estudiar ciertos mecanismos relacionados con el control de la proliferación en nuestro modelo experimental de cáncer de mama, desarrollamos en nuestro laboratorio seis líneas celulares, a partir de dos carcinomas ductales mamarios murinos. De ellas, cinco provienen del carcinoma hormono-dependiente C4HD, que ha sido mantenido por pasajes en ratones hembra BALB/c tratadas con MPA y fueron denominadas C4L1, C4L2, C4L3, C4L4 y C4L5. La sexta, llamada C7L1, se obtuvo de un tumor hormono-independiente, el C7HI, mantenido por pasajes singeneicos en ratones hembra no tratados.

Nuestro grupo ha estado trabajando con cultivos primarios de estos dos tumores desde hace tiempo (Lanari et al, 1997) pero, si bien este sistema experimental ha provisto valiosa información acerca de la respuesta tumoral a distintas hormonas y factores de crecimiento, presenta sus limitaciones. A diferencia de los cultivos primarios, las líneas celulares ofrecen la oportunidad de disecar mecanismos biológicos a distintos niveles, el hormonal, el bioquímico o el molecular, con la seguridad de que los resultados son reproducibles debido a la relativa homogeneidad de las poblaciones celulares. Los cultivos primarios de tumores presentan varias desventajas, como ser: a) un enorme costo en esfuerzo y en materiales, y una importante porcentaje de fracasos y contaminaciones; b) en general, no suelen sobrevivir más de unas pocas semanas, lo que lo limita a experimentos a un relativo corto plazo; c) cada cultivo primario, si bien se origina del mismo tumor suele presentar además de una posible variedad de subpoblaciones celulares con distintas propiedades en cuanto a capacidad de crecimiento, invasión y metástasis, células contaminantes del estroma tumoral.

La generación de estas líneas no ha sido, por tanto, en absoluto casual. Son el resultado de una enorme inversión de tiempo, paciencia y materiales en un proyecto de gran riesgo. A priori, es imposible saber si alguna de las líneas que se están gestando mantendrán o no el patrón de comportamiento del tumor que le dio origen. La única forma de tomar conocimiento de si alguna de ellas es lo que se esperaba que fuera es la exhaustiva caracterización morfológica y funcional, y de eso trata este trabajo de seminario.

Estas líneas se han comenzado a desarrollar a fines de 1997 y están siendo caracterizadas por distintos miembros del laboratorio. En la Tabla 5 se describen con de-



talle las principales características de todas las líneas incluyendo los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

Curiosamente, de las cinco líneas derivadas del tumor PD, cuatro son muy similares morfológicamente entre sí, en cambio una presenta una morfología fibroblastoide, similar a la única línea obtenida a partir del tumor PI.

La expresión de receptores hormonales fue similar en todas las líneas estudiadas. Cuando se comparó la expresión de receptores observada con la técnica inmunocitoquímica con los valores obtenidos por la bioquímica, se observó una aparente discrepancia. La diferencia en expresión inmunocitoquímica de RP con respecto a RE se evaluó como llamativamente menor a la observada con el otro método. Alrededor de un 100% de las células expresaron RP y alrededor de un 80% RE. Utilizando el método bioquímico, la relación de expresión de PR y ER, es de aproximadamente 10 a 1.

Teniendo en cuenta que no hemos cuantificado verdaderamente los resultados obtenidos con inmunocitoquímica, la validez de cualquier comparación entre técnicas es siempre relativa. La técnica bioquímica evalúa la cantidad de un ligando marcado para identificar la presencia de un receptor, de una forma indirecta porque lo que se mide es la emisión del radioisótopo marcador. Requiere entonces por definición la presencia de una molécula receptora relativamente intacta, ya que debe ser capaz de unirse con relativa afinidad al ligando. La técnica bioquímica utilizada en estos experimentos fue la técnica de célula entera (Dran et al, 1995). Es decir, se agrega la hormona radioactiva en presencia de concentraciones 100 veces mayores de hormona fría y se incuban las células; después de dos horas se las lava exhaustivamente, se las levanta y se cuenta la marca radioactiva correspondiente a cada hoyo. La diferencia de radioactividad entre ambos grupos se considera que es la marcación específica. Es decir, que *in vitro* ambas técnicas evalúan a las células en las mismas condiciones experimentales. Cuando se evalúan los receptores hormonales por la técnica bioquímica o inmunohistoquímica a partir de tumores sólidos, la problemática es otra ya que diversos factores tales como la congelación inmediata de la muestra a  $-70^{\circ}\text{C}$  modifica notablemente los resultados. Con una marcación inmunocitoquímica igual o mayor al 80% de las células, de moderada a intensa, lo esperable hubiera sido una mayor cantidad de receptores en la técnica bioquímica. Estas diferencias podrían indicar; a) que la técnica inmunocitoquímica es más sensible, lo cual parecería ser dudoso porque se ha comunicado en la clínica que niveles menores de 50 fmoles/ mg de proteína pueden ser considerados como negativos por la técnica inmunohistoquímica (Cohen et al, 1991); b) que las células tengan una pobla-

ción de RE con sus determinantes antigénicos preservados pero funcionalmente sean incapaces de ligar hormona. Esta posibilidad deberá estudiarse más profundamente.

En los cultivos celulares, el 80-100% de los núcleos de todas las líneas celulares mostró una marcación específica mientras que en los tumores la proporción fue menor y más variable, si bien fue específica, ya que sólo se marcaron las células epiteliales de mama normal usadas como controles o de los carcinomas no observándose marcación en tejido conectivo o adiposo. La menor marcación observada en los tumores podría deberse a la suma de diversas causas: a) el procesado del material para histología es bastante más deletéreo ya que incluye no sólo la fijación, sino el pasaje por alcoholes de distinta graduación, solventes orgánicos como tolueno, xileno, benceno o cloroformo y finalmente varios baños en parafina a alrededor de 60° C; b) podría existir una expresión diferencial relacionada con la etapa del ciclo celular en la que está cada célula, lo que explicaría la marcación focal de ciertos tumores para PR o ER y c) también existe una simple cuestión técnica, la marcación en los tumores es mucho más complicada precisamente porque se trata de un corte de tejido, compuesto por numerosos tipos celulares con diversas estructuras, restos de fluidos y secreciones, todo lo cual hace que la accesibilidad del anticuerpo esté mucho más restringida que en un cultivo celular. El “background” o la marcación inespecífica obtenidos en los tejidos puede tener distintos orígenes: inactivación deficiente de la actividad de peroxidasa endógena, un posible bloqueo incompleto de sitios inespecíficos de unión por el suero normal, etc. En cualquier caso, éste no ha sido un problema mayor en la caracterización de estas líneas ya que no ocurrió en todas las experiencias ni en todas las líneas repetidamente. Si bien, en los cultivos no ocurrió este efecto de “fondo”, se puede observar que existe también marcación citoplasmática, aunque débil (ver figuras 28, 39, 53 y 65). Aunque es sabido que la localización de estos receptores es predominantemente nuclear (Clarke et al, 1987) podría pensarse que exista una población menor de ellos que se encuentre en el citoplasma, o bien, haya un flujo en equilibrio de receptores entre ambos lugares, siendo que ya ha sido descripto que el anticuerpo policlonal contra el PR efectivamente presenta marcación específica citoplasmática (Silberstein et al, 1996).

Se ha tratado de realizar la detección de RE y RP en estas líneas usando los repiques más tempranos, lo cual se repetirá cada 20 repiques para evaluar la estabilidad de las mismas.

Con el fin de investigar la estirpe celular se encararon distintos enfoques: la evaluación de citoqueratinas, que son los filamentos intermedios característicos de las



células epiteliales (Osborn y Weber, 1983), la expresión de caderina E, característica de células epiteliales aunque se puede perder en procesos neoplásicos o de immortalización *in vitro* (Pierceall et al, 1995), y en tumores sólidos la marcación de reticulina (Satoh et al, 1997). La marcación obtenida para citoqueratinas es típicamente citoplásmica (figuras 15, 29, 40 y 67). La tenue coloración del núcleo que se puede apreciar no se debe a la marcación del mismo sino al hecho de que como la célula en cultivo se encuentra entera muy frecuentemente hay citoplasma por encima del núcleo. La línea C4L1 presenta un patrón un poco distinto al resto (fig. 5), en cuanto a que parece más marcación en la membrana, pero esto podría ser sólo en esta foto en particular.

En los tejidos tumorales, si bien la marca también es citoplasmática, es mucho más difusa e irregular y varía la intensidad de una célula a otra. Esto podría deberse en parte a que la fijación de los tejidos afecta profundamente la estructura de las queratinas de bajo peso molecular, mientras que las de peso mayor parecen resistir mejor este proceso, entonces considerando que el anticuerpo utilizado es policlonal, es decir, es una mezcla de anticuerpos que reconocen distintos epitopes y contiene una mayor proporción contra este tipo de moléculas, sería razonable esperar que algo del anticuerpo reaccionara con el tejido, pero obviamente, de forma difusa. Además es necesario recordar que los filamentos intermedios no resisten muy bien el formol, que es el fijador de rutina en cualquier laboratorio, sino que se preservan mejor al ser fijados en alcohol (Battifora y Kopinsky, 1986). En las muestras fijadas en alcohol se uniformó sensiblemente la marcación aunque aumentó también el fondo (comparar la C4L1, fig. 12, la C4L3, fig. 37, y la C7L1, fig. 74, que fueron fijados en formol y tratados con tripsina, con la C4L2, fig. 22, y la C4L5, fig. 59, que fueron fijados en alcohol y no tratados con enzima). Todas las líneas demostraron ser de origen epitelial, lo cual era esperable para las C4L1, C4L3, C4L4, y C4L5, ya que tenían una morfología en cultivo típicamente poligonal, pero no así las C4L2 y la C7L1, las cuales tenían un fenotipo muy poco diferenciado, de modo que en ellas se hizo necesario la determinación de la presencia de queratinas.

Todas las líneas fueron positivas para caderina E. La única que no mostró el típico patrón de marcación fue la C7L1, pero convendría repetir estos resultados en otras condiciones, para confirmar si la falta de expresión hallada fue debida a la escasez de células y por lo tanto de contacto celular o bien a una verdadera alteración en la expresión (Pierceall et al, 1995).

Las trama de reticulina consiste en una serie de fibras del estroma, correspondientes a colágeno de tipo IV, (Satoh et al, 1997) que se disponen rodeando las estruc-



turas epiteliales (por ejemplo, no existen fibras de reticulina entre las células de una glándula), y en el caso del estroma, rodean cada una de las células. La identificación de estas fibras mediante técnicas de impregnación argéntica fue utilizada durante mucho tiempo como una ayuda en el diagnóstico diferencial de proliferaciones epiteliales de mesenquimáticas, ya que aún en los tumores, las fibras de reticulina conservan su distribución, y también en el análisis histológico de una serie de distintas lesiones de órganos parenquimatosos donde la alteración de estas fibras puede proveer datos importantes (Thiele et al, 1995). En su primer uso, es decir en el diagnóstico diferencial entre carcinoma y sarcoma, fue reemplazada con ventajas por la identificación de un panel de filamentos intermedios con técnicas inmunocitoquímicas, mucho más específicas y que permiten una gama más amplia de diagnósticos. Por otro lado la interpretación semicuantitativa ("todo o nada") de las técnicas inmunocitoquímicas, así como su relativa independencia de factores "artesanales", tan presentes en las técnicas de impregnación argéntica, hace más fácil su realización e interpretación. De todas maneras, las mismas razones que hacen de las técnicas de plata, difíciles de aplicar cuando la rutina diaria exige el "screening" de una gran cantidad de preparaciones, las hacen atractivas para el histólogo que estudia una cantidad limitada de tejido, desea comprobar un mismo hecho por distintos métodos y es consciente de que color y forma constituyen los atractivos esenciales de la morfología. Fue interesante validar de alguna manera, la vigencia de esta vieja técnica (Luna, 1968), ya que todos los tumores creciendo *in vivo* demostraron la típica distribución de la reticulina rodeando grupos de células neoplásicas, en franco contraste con la distribución estromal, demostrando una vez más el carácter carcinomatoso de todas las líneas estudiadas. Debemos agregar que no hemos encontrado trabajos en la literatura que validen la utilidad de la impregnación argéntica para fibras de reticulina con la identificación inmunocitoquímica de queratina.

Como parte de la caracterización de las líneas, se ha realizado en todas ellas el estudio por microscopía electrónica, el cual ha confirmado su origen epitelial y mamario por la presencia de estructuras típicas (resultados no mostrados).

En algunas líneas se estudió también la expresión de vimentina que, si bien es un filamento característico de células mesenquimáticas, se encuentra expresado en algunos tumores epiteliales muy agresivos o en líneas celulares epiteliales. Esta descripción que la marcación positiva parece correlacionar con una mayor capacidad invasora o agresividad del tumor (Thompson et al, 1992). En el futuro mediano se estudiará la expresión de

vimentina de los tumores parentales para corroborar si la expresión observada en las líneas se debe al proceso de inmortalización.

La presencia de c-erbB-2, marcador asociado con agresividad en cáncer de mama (Perren, 1991), fue comprobada en todas las líneas aunque en la C7L1 con una intensidad bastante menor comparada con las demás. Este hallazgo puede considerarse razonable en el sentido de que el tumor C4HD, del cual se obtuvieron los cultivos primarios que originaron las líneas C4, sobreexpresa este gen (resultados no publicados). Si bien esta proteína es de membrana, la marcación pareciera, a primera vista, de tipo citoplasmática. Observando más detenidamente se encuentra que existe un efecto de “borde” (más notorio en las C4L2, C4L3 y C4L4, figuras 16, 31 y 42 respectivamente) y que la razón por la cual el citoplasma parece tener marca, así como en el caso de las queratinas, puede ser el hecho de que *in vitro* la arquitectura de la célula está intacta.

El hecho que dos líneas provenientes de dos tumores biológicamente distintos como lo son la C4L2 y la C7L1 presenten un patrón de respuesta similar *in vivo*, ambas son progestágeno-independientes, e *in vitro*, responden positivamente a la proliferación estimulada por E<sub>2</sub> y MPA en mayor medida que el resto de las líneas, y además la extraña particularidad del fenotipo fibroblastoide y la velocidad de despegue, invita a pensar en una correlación entre la morfología y el patrón de comportamiento, aunque, evidentemente los datos aquí presentados no sean suficientes para demostrarlo. Sería interesante seguir consiguiendo líneas con diferente morfología para profundizar sobre la asociación entre características morfológicas, capacidad invasora y respuesta hormonal en este sistema experimental. Una línea recientemente descrita por Alonso y colaboradores (Alonso et al, 1997) obtenida por clonación a partir de una línea de un adenocarcinoma mamario de BALB/c que no expresa receptores hormonales es también de morfología fibroblastoide y muy invasora dando lugar a tumores sarcomatoides, a diferencia de la parental, menos invasora localmente y de morfología epitelioide.

La importancia de la obtención de estas líneas en el contexto actual de la investigación en el cáncer de mama es considerable. Son líneas epiteliales, que expresan establemente RE y RP, que, en su mayoría, sobre expresan el oncogen c-erbB-2, y cuyo crecimiento puede ser regulado por hormonas. Si bien existen algunas líneas humanas con características similares, hasta la fecha, excepto la transgénica c-erbB-2, MG1361 no existen líneas celulares murinas con estas características. Estas líneas pueden ser una valiosa herramienta en la disección de los mecanismos proliferativos y de invasión y metástasis regulados por estrógenos y progesterona.



Tabla 5. Características principales de las líneas celulares desarrolladas

Característica evaluada	C4-L1	C4-L2	C4-L3	C4-L4	C4-L5	C7-L1
Nº de repique actual	80	47	27	31	24	35
Tumor original	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C4-HD	C7-L1
Morfología <i>in vitro</i>	epitelioide	Fibroblastoide	epitelioide	epitelioide	epitelioide	fibroblastoide
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	65	68	ND	ND	ND	74
RE (TB)	+	+	+	+	+	+
RE (ICQ)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
RP (TB)	++	+++	+++	+++	+++	+++
RP (ICQ)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Citoqueratinas (ICQ) <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 (IHQ) <i>in vivo</i>	++	++	++	++	++	++
Citoqueratinas <i>in vivo</i>	++	++	++	++	++	++
Morfología <i>in vivo</i>	A	b	A	a	a	c
Patrón de invasión y metástasis	Pulmonar	Invasión local; metástasis axilares y pulmonares	Pulmonar	Pulmonar	pulmonar	Invasión local; metástasis axilares y pulmonares
Regresión con mifepristona <i>in vivo</i>	NO	NDβ	SI	ND	SI	NO
Regresión con onapristona <i>in vivo</i>	SI	ND	SI	ND	SI	NO
Regresión con E <sub>2</sub> <i>in vivo</i>	NO	ND	SI	ND	SI	NO

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: no determinado

TB: técnica bioquímica

IHQ: técnica inmunohistoquímica/ ICQ: técnica inmunocitoquímica



## C O N C L U S I O N E S

## CONCLUSIONES

En este trabajo se caracterizaron seis líneas celulares obtenidas a partir de tumores inducidos por acetato de medroxiprogesterona. Cinco de ellas derivan de un tumor progestágeno-dependiente y una de un tumor progestágeno-independiente.

Las seis líneas son tumorigénicas y desarrollan, al ser transplantadas *in vivo* lesiones con la morfología típica de un tumor maligno, alta invasividad y potencial metastásico. Cuatro de las líneas de aspecto epiteliode presentaron imágenes histopatológicas similares al tumor que les dio origen.

Las 6 líneas obtenidas son epiteliales, independientemente de su aspecto morfológico.

Por los datos de su origen y los dos puntos anteriormente establecidos definimos estas líneas como **líneas de carcinomas mamario murinos ductales**.

Las seis líneas expresaron receptores para estrógenos y progesterona que se detectaron tanto en los estudios *in vitro* como en los tumores sólidos que se originaron al transplantarlos *in vivo*. La presencia de estos receptores refuerza su origen mamario ductal.

La capacidad invasora y metastásica fue similar en las cuatro líneas de morfología epiteliode y diferente en las dos fibroblastoides. Las primeras caracterizadas por dar origen a tumores con escasa capacidad invasora local, observándose metástasis pulmonares en todos los casos y las segundas por ser más invasoras localmente además de dar origen a metástasis pulmonares.

Resultados obtenidos en el laboratorio indicarían que las dos líneas fibroblastoides son respondedoras a hormonas *in vitro*, no así *in vivo* y contrariamente las epitelioides son progestágeno-dependientes *in vivo* pero *in vitro* parecerían ser más autónomas.

De los dos puntos establecidos anteriormente podemos concluir que en estos casos, algunas características morfológicas permitirían predecir el comportamiento biológico.

Esta sería la primera descripción de líneas de tumor de mama murinas, no obtenidas por técnicas de transfección, que expresen receptores hormonales y sean respondedoras a hormonas constituyendo una herramienta valiosa en el campo de la oncología experimental.

## B I B L I O G R A F I A



## BIBLIOGRAFIA

1. Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG. Expression of the oncogen c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res.*1996 May; 57 (5): 693-696.
2. Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB. Estrogen receptor status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer.* 1980; 16: 233-331.
3. Alonso DF, Farías EF, Urtreger A, Ladedá V, Vidal MC, Bal de Kier Joffé. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 1996; 62: 288-297.
4. Amadori D, Bertoni L, Flamigni A, Savini S, De Giovanni C, Casanova S, De Paola F, Amadori A, Giulotto E, Zoli W. Establishment and characterization of a new cell line from primary human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28: 251-260.
5. Amundadottir LT, Johnson MD, Merlino G, Smith G, Dickson RB. Synergistic interaction of TGF $\alpha$  and c-myc in mouse mammary gland tumorigenesis. *Cell Growth and Diff* 1995; 6: 732-748
6. Amundadottir LT, Merlino G, Dickson RB. Transgenic mouse model of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39 (1): 119-135.
7. Battifora H and Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1986; 34 (8): 1095-1100.
8. Bergkvist L, Adami HO, Persson I, Hoover R, Scharier C. The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *N Engl J Med* 1989; 321:293-297.
9. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936; 84: 162-163.
10. Bonilla M, Ramirez M, Lopez-Cueto J, Gariglio P. In vivo amplification and rearrangement of c-myc oncogen in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 665-671.
11. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H. ErbB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. *Oncogen* 1991 Jan; 6 (1): 137-143.
12. Brüner N, Frandsen TL, Holst-Hansen C, Bei M, Thompson EW, Wakeling AE, Lippman ME, Clarke R. MCF7/LCC2: a 4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer variant which retains sensitivity to the steroidal antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res* 1993; 53: 3229-3232.
13. Buehring GC and Hackett AJ. Human breast tumor cell lines: Identity evaluation by ultrastructure. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 621-629

29. DeOme KB, Faulkin LJ Jr., Bern HA, Blair PB. Development of mammary tumors from hiperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 1959; 78: 515-520
30. Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Montecchia F, Charreau EH, Pasqualini CD and Lanari C. Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 173-186
31. Edwards PA, Ward JL, Bradbury JM. Alteration of morphogenesis by the v-myc oncogen in transplants of mamary gland. *Oncogen* 1988; 2: 407-412
32. Ekblom A. Evidence of prenatal influences on breast cancer risk. *Lancet* 1991; 310: 1015.
33. Engel LW and Young NA. Human Breast Carcinoma Cells in Continuous Culture: A Review. *Cancer Research* 1978b; 38: 4327- 4339
34. Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* 1978a; 38: 3352- 3364.
35. Friedl A, Jordan VC. Oestradiol stimulates growth of receptor negative MDA-MB-231 breast cancer cells in immunodeficient mice by reducing cell loss. *Eur J Cancer* 1994; 30a : 1559-1564.
36. Frohman MA, Martin GR. Cut, paste and save: New approaches to altering specific genes in mice. *Cell* 1989; 56: 145-147.
37. Gartler SM. Genetic markers as Tracers in Cell Culture. *Natl Cancer Inst. Monograph* 1967; 26:167-195
38. Glass AG and Hoover RN. Rising incidence of breast cancer: relationship to stage and receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 693-696
39. Gullino P, Pettigrew H, Grantham F. N-nitrosourea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54: 401-404.
40. Guy C, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. Expression of the neu oncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992a; 89: 10578-10582.
41. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of poliovirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 1992b; 12: 954-961
42. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science* 1990 Dec 21; 250 (4988):1684-1689.
43. Harris J.R., Lippman M.E., Veronesi U., Willet W. "Breast Cancer". *N. Engl. J. Med.* 1992; 327: 319-28 (first of three parts)-a-; 327: 390-98 (second of three parts)-b-; 327: 373-80 (third of three parts)-c-
44. Henderson BE, Ross RK, Pike M.C. Hormonal Chemoprevention of Cancer in Women. *Science* 1993 Jan; 259:633-638.



45. Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ.  $\beta$ -catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 538-542.
46. Horwitz KB. The antiprogesterone RU38 486: Receptor-mediated progesterone *versus* antiprogesterone actions screened in estrogen-insensitive T47-D<sub>co</sub> human breast cancer cells. *Endocrinol* 1985; 116 (6): 2236-2244.
47. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin- biotin- peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 816-821
48. IARC 1990 International Agency for Research on Cancer (WHO). Pathology of tumors in laboratory animals. Vol 1. Tumors of the rat. Second edition. N° 99. Lyon 1990. Pp47: "Tumors of the mammary gland" by Russo and others. Editors Turusov and Mohr
49. IARC 1994 International Agency for Research on Cancer (WHO). Pathology of tumors in laboratory animals. Vol 2. Tumors of the mouse. Second edition. N° 111. Lyon 1994. Pp 47: "Tumors of the mammary gland" by Squartini and Pingitore. Editors Turusov and Mohr
50. IARC 1996 International Agency for Research on Cancer (WHO). Pathology of tumors in laboratory animals. Vol 3. Tumors of the hamster. Second edition. N° 126. Lyon 1996. Pp 45: "Tumors of the mammary gland" by Fernandez, Cardesa and Kamino. Editors Turusov and Mohr
51. Ip C. Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *J Mammary Gland Biol Neopl* 1996; 1 (1): 37-47.
52. Jaenisch R. Transgenic animals. *Science* 1988; 240: 1468-1474.
53. Jhappan C, Geiser AG, Kordon EC, Bagheri D, Hennighausen L, Roberts AB, Smith GH, Merlino G. Targeting expression of a transforming growth factor  $\beta$ 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J* 1993; 12: 1835-1845.
54. Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith GH, Merlino GT. TGF $\alpha$  overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 1990; 61:1137-1146
55. 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 carcinoma origin. *Eur J Cancer* 1979; 15: 659-670.
56. King CR, Krauss MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in human mammary carcinoma. *Science* 1985; 229:974-976.
57. Kordon E, Lanari C, Meiss R, Elizalde P, Charreau E, Pasqualini CD. Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced *in vivo* by medroxyprogesterone acetate. *Breat Cancer Res Treat* 1990; 17: 33-43.
58. Kordon E, Lanari C, Molinolo AA, Elizalde P , Charreau EH Pasqualini CD: Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int J Cancer* 1991; 49: 900-905.
59. Kordon E.C., Guerra F., Molinolo A.A., Elizalde P., Charreau E.H., Pasqualini C.D., Montecchia F., Pazos P., Dran G., Lanari C.L.M. Effect of sialoadenectomy on



medroxyprogesterone- acetate induced mammary carcinogenesis in BALB/c mice. Correlation between histology and epidermal-growth-factor receptor content. *Int J Cancer* 1994; 59: 196-203.

60. Lanari C, Luthy I, Lamb C, Pagano E, Helguero L, Fabris V, Molinolo AA. Obtención de líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos sensibles a progestágenos. *Nuevas Tendencias en Oncología. Revista de la European School of Oncology*. 1998. Pp.52.

61. Lanari C.L.M., Kordon E., Molinolo A.A., Pasqualini C. D., Charreau E.H. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: Hormone dependance and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int. J. Cancer* 1989; 43: 845-850.

62. Lanari C.L.M., Molinolo A.A., Pasqualini C. D. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Cancer Letters* 1986 b; 33: 215.

63. Lanari C.L.M., Molinolo A.A., Pasqualini C. D. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *JNCI* 1986a; 77: 157-164.

64. Lanari C.L.M., Montecchia MF, Pazos P, Simian M, Vanzulli S, Lamb C, Molinolo AA. Inducción de adenocarcinomas mamarios por progestágenos en BALB/c. Progresión del tumor hormono-dependiente al autónomo. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57 (Supl II): 55-69.

65. Lasfargues EY and Ozzello L. Cultivation of Human Breast Carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1958; 21: 1131-1147

66. Lee G. Luna HT. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institutes of Pathology*. The Blackstone Division, McGraw-Hill Book Company, 1968.

67. Levine AJ. The tumor supresor genes. *Ann Rev Biochem* 1993; 62: 623-651

68. Lupu R and Lippman ME. The role of erbB2 signal transduction pathways in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1993; 27: 83-93

69. Meichle A, Phillip A, Eilers M. The functions of the myc proteins. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1114: 129-146.

70. Molinolo A.A., Lanari C.L.M., Charreau E. H., Sanjuan N., Pasqualini C.D. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: Immunohistochemistry and Hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1341-1350.

71. Molinolo A.A., Simian M., Vanzulli S., Pazos P., Lamb C., Montecchia F., Lanari C.L.M. Involvement of EGF in medroxyprogesterone acetate (MPA) -induced mammary gland hyperplasia and its role in MPA- induced mammary tumors in BALB/c mice. *Cancer Letters* 1998; 126: 49-57.

72. Muller WJ, Lee FS, Dickson C, Peters G, Pattengale P, Leder P. The int-2 gene product acts as an epithelial growth factor in transgenic mice. *EMBO J* 1990; 9: 907-913.

73. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Phytoestrogens. *Clinical Review* 92. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; 83 (2): 297-303.

74. Narod SA, Familial Breast-Ovarian Cancer Locus on Chromosome 17q12-q23. *Lancet* 1991; 338: 82.
75. National Center for Health Statistics. Vital Statistics of the United States, 1987. Vol 2. Mortality. Part A. Washington, DC: Government Printing Office, 1990. (DHHS publication no. (PHS) 90-1101.)
76. Nicholson S, Sainsbury JRC, Needham GK, Chambers P, Farndon JR, Harris AL. Quantitative assays of epidermal growth factor receptor in human breast cancer: Cut-off points of clinical relevance. *Int J Cancer* 1988; 42: 36-41.
77. Osborn M and Weber K. Biology of disease: Tumor Diagnosis by Intermediate Filament Typing: A Novel Tool for Surgical Pathology. *Lab Invest* 1983; 48 (4): 372-394.
78. Osborne CK and Arteaga CL. Autocrine and paracrine growth regulation of breast cancer: Clinical implications. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 15: 3-11.
79. Pantelouris EM. Absence of thymus in a mutant mouse. *Nature* 1968; 217: 370-371.
80. Perren TJ. C-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 328-332
81. Pierce DF, Johnson MD, Matsui Y, Robinson SD, Gold LI, Purchio AF, Daniel CW, Hogan BL, Moses HL. Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing TGF-beta-1. *Genes Dev* 1993; 7: 2308-2317.
82. Pierceall WE, Woodard AS, Morrow JS, Rimm D, Fearon ER. Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta- catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1995 Oct 5; 11 (7): 1319-1326.
83. Price JE, Polizos A, Zhang RD, Daniels LM. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* 1990; 50: 717-721.
84. Read LD, Keith D Jr, Slamon DJ, Katzenellenbogen BS. Hormonal modulation of HER-2/neu protooncogene messenger ribonucleotid acid and p185 protein expression in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1990 Jul 1; 50 (13): 3947-51.
85. Robbins J, Blondel B, Gallahan D, Callahan R. Mouse mammary tumor gene int-3: a member of the notch gene family transformas mammary epithelial cells. *J Virol* 1992; 66: 2594-2599.
86. Russo I.H., Gimotty P., Dupuis M, Russo J. Effect of medroxyprogesterone acetate on the response of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Br J Cancer* 1989; 59: 210-216.
87. Russo IH, Koszalka M, Gimotty PA, Russo J. Protective effect of chorionic gonadotropin on DMBA-induces mammary carcinogenesis. *Br J Cancer* 1990; 62: 243-247.
88. Russo IH, Russo J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 1439-1442.
89. Russo J. and Russo, I. H. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 39 (1): 7- 20.



90. Russo J. Basis of cellular autonomy in the susceptibility to carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 1983; 11: 149.
91. Rygaard J. y Povlsen C.O. Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 77: 758-760.
92. Satoh T, Takeda R, Oikawa H, Satodate R. Immunohistochemical and structural characteristics of the reticular framework of the white pulp and marginal zone in the human spleen. *Anat Rec* 1997 Dec; 249 (4): 486-94.
93. Semba K, Kamata N, Totoshima K, Yamamoto T. A v-erb-B related proto-oncogen, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 6497-6501.
94. Shi YE, Liu YE, Lippman ME, Dickson RB. Progestins and antiprogestins in mammary tumour growth and metastasis. In: Beier HM, Spitz IM (eds). *Progesterone antagonists in Reproductive Medicine and Oncology. Human Reproduction Vol 9, Suppl 1* New York: Oxford University Press, 1994. p. 162-173.
95. Silberstein GB, Van Horn K, Shyamala G, Daniel CW. Progesterone receptors in the mouse mammary duct: distribution and developmental regulation. *Cell Growth Differ* 1996 Jul; 7 (7): 945-52.
96. Simard J, Labrie C, Belanger A, Gauthier S, Singh SM, Merand Y, Labrie F. Characterization of the effects of a novel non-steroidal antiestrogen EM-800 on basal and estrogen-induced proliferation of T-47D, ZR-75-1 and MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 1997 Sep 26; 73 (1): 104-112.
97. Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 1987; 49: 465-475.
98. Soule H.D., Vasquez J., Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 1409-1416.
99. Stamp G, Fantl V, Poulson R, Jamieson S, Smith R, Peters G, Dickson C. Nonuniform expression of a mouse mammary tumor virus-driven int-2/Fgf-3 transgene in pregnancy-responsive breast tumors. *Cell Growth & Diff* 1992; 3: 929-938.
100. Sukumar S, Armstrong B, Bruyntjes J, Leav I, Bosland M. Frequent activation of ki-ras oncogen at codon 12 in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat prostate adenocarcinomas and neurogenic sarcomas. *Molecular Carcinogenesis* 1991; 4: 362.
101. Theillet C, Lidereau R, Escot C, Hutzell P, Brunet M, Gest J, Schlom J, Callahan R. Loss of a c-H-ras-1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. *Cancer Res* 1986; 46: 4776-4781.
102. Thiele J, Kvasnicka HM, Niederle N, Kloke O, Schmidt M, Lienhard H, Zirbes T, Meuter RB, Leder LD, Fischer R. *Diseases of the Liver and Biliary System* by Sheila Sherlock and James Dooley, 10th edition, Blackwell Science Inc., 1997. Clinical and histological features retain their prognostic impact under interferon therapy of CML: a pilot study. *Am J Hematol* 1995 Sep; 50(1): 30-9.



103. Thompson EW, Soomyoung P, Br uner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME, Martin GR, Dickson RB. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1992; 150: 534-544.
104. Tzeng Y, Guhl E, Graessmann M, Graessmann A. Breast cancer formation in transgenic animal induced by the whey acidic protein SV40 T antigen (WAP-SV40 T) hybrid gen. *Oncogene* 1993; 8: 1965-1971.
105. van de Velde P, Nique F, Bouchoux F, Br maud J, Hameau MC, Lucas D, Moratille C, Viet S, Plilibert D, Teutsch G. RU 58668, a new pure antiestrogen inducing a regression of human mammary carcinoma implanted in nude mice. *Steroid Biochem Molec Biol* 1994; 48 (2/3): 187-196.
106. van den Berg HW, Lynch M, Martin JH. The relationship between affinity of progestins for the progesterone receptor in breast cancer cells (ZR-PR-LT) and ability to down regulate the receptor: evidence for heterospecific receptor modulation via the glucocorticoid receptor. *Eur J Cancer* 1993; 29 A (12): 1771-1775.
107. van den Berg HW, Martin J, Lynch M. High progesterone receptor concentration in a variant of the ZR-75-1 human breast cancer cell line adapted to growth in oestrogen free conditions. *Br J Cancer* 1990 Apr; 61 (4): 504-507.
108. Vanzulli S, Montecchia MF, Pazos P, Lanari C y Molinolo A. Estrogen and antiprogesterin-induced regression in experimental mammary carcinomas. *Revista Latinoamericana de Mastolog a*.1997.
109. Vegeto E, Cocciolo MG, Raspagliesi F, Piffanelli A, Fontanelli R, Maggi A. Regulation of progesterone receptor gene expression. *Cancer Res* 1990 Sept 1; 50: 5291-5295.
110. Wang TC, Cardiff R, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV. Mammary hiperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 1994; 366: 669-671
111. Wang Y, Holland JF, Bleiweis IJ, Melana S, Liu X, Pelisson Y, Cantarella A, Stellrecht K, Mani S, Pogo BG. Detection of mammary tumor virus env gene like sequences in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55 (22): 5173-5179.
112. Warri AM, Laine AM, Majasuo KE, Alitalo KK, Harkonen PL. Estrogen suppression of erbB2 expression is associated with increased growth rate of ZR-75-1 human breast cancer cell lines in vitro and in nude mice. *Int J Cancer* 1991 Oct 21; 49 (4): 616-623.
113. Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation (Review article). *Biochem J*. 1996; 319: 657-667
114. Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. Molecular biology of tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, 1982, pp 16-18.
115. Wellings S.R. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Path Res Pract* 1980; 166: 515-535.
116. Willet W. Dietary fat intake and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989 Sep 20; 81 (18): 1422-1424.

117. Willet W. Fat, energy and breast cancer. *J. Nutr.* 1997 May; 127 (5 Suppl): 921S-35. Review.

118. World Health Organization Histologic Typing of Breast Tumors. *Breast Cancer*, 2<sup>nd</sup>. ed. *Am J. Clin. Pathol.* 1982; 78:806.

119. Zyad A, Bernard J, Clarke R, Tursz T, Brockhous M, Chouaib S. Human breast cancer cross-resistance to TNF and adriamycin: relationship to MDR1, MnSOD and TNF gene expression. *Cancer Res* 1994; 54: 825-831.