

## Tesis de Posgrado

# Heterogeneidad celular en cáncer de mama

Podhajcer, Osvaldo Luis

1987

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:**

Podhajcer, Osvaldo Luis. (1987). Heterogeneidad celular en cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2080\\_Podhajcer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2080_Podhajcer.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Podhajcer, Osvaldo Luis. "Heterogeneidad celular en cáncer de mama". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2080\\_Podhajcer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2080_Podhajcer.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

Heterogeneidad celular en cáncer de mama

Autor

Oswaldo L. Podhajcer

Director de Tesis

Dr. José Mordoh

Co-director

Dr. José La Torre

Lugar de Trabajo

Hospital Interzonal de Agudos Mariano R. Castex

Tesis presentada para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas

1987

- 2080 -  
y.2

*A Betty, Adil y Paula*

*Al recuerdo de Idán*

## **Agradecimientos**

Al Dr. José Mordoh, por la supervisión y dirección científica de esta tesis.

Al Dr. José La Torre, co-director de tesis.

A mis compañeros de trabajo Inés Bravo, Liliana Dain, Irene Sorín, Cecilia Ballaré y Laura Bover.

A Carlos Smith y Juan Carlos García Tavares fotógrafos del Hospital Castex, responsables del material fotográfico de esta tesis.

Finalmente y en forma especial a mi amiga Liliana Troyano quien a pesar de todas las circunstancias dolorosas vividas durante este año pudo hacerse un pequeño espacio para escribir esta tesis.

Parte de los resultados presentados en esta tesis ha sido publicada en los siguientes artículos:

\* O.L.Podhajcer, A.Bravo, I.Sorín, N. Guman, R.Cerdeiro, J. Mordoh

Determination of DNA synthesis, estrogen receptors, and carcinoembryonic antigen in isolated subpopulations of human breast cancer.

Cancer. 1986:58,118.

\* O.L.Podhajcer, A.Bravo,L.Dain,N. Guman, L. Bover, J. Mordoh.

In vitro analysis of the cellular proliferative response to 17- $\beta$ - estradiol of human breast cancer.

Cancer. 1987 ( en prensa).

\* I. Sorín, A. Bravo, O. L. Podhajcer, L. Bover, J. Loza, F. S. Martínez, N. Guzman, J. Mordoh.

Analysis of DNA-synthesis and CEA expression in human breast cancer.

Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. Aceptado para publicación.

## INDICE

### INTRODUCCION

	<b>Página</b>
<b>I. Heterogeneidad celular en tumores humanos.....</b>	<b>3</b>
<b>I.a.</b> Implicaciones en el estudio de la biología del cáncer.....	4
<b>I.b.</b> Subpoblaciones celulares.....	4
<b>I.c.</b> La organización celular del tejido tumoral.....	7
<b>I.d.</b> Técnicas de detección de células stem.....	12
<b>II. Receptores estrogénicos .....</b>	<b>15</b>
<b>II.a.</b> Estudios en cáncer de mama: relación con la evolución clínica .	15
<b>II.b.</b> Coexistencia de diferentes subpoblaciones celulares en cáncer de mama humano .....	17
<b>II.c.</b> Relación entre la presencia de receptores estrogénicos, potencial proliferativo y diferenciación tumoral.....	19
<b>III. Efectos estrogénicos sobre la proliferación celular y cinética del ciclo celular.....</b>	<b>21</b>
<b>III.a.</b> Estudios sobre líneas celulares de cáncer de mama.....	22
<b>III.b.</b> Inducción del receptor de progesterona.....	23
<b>IV. Oncogenes.....</b>	<b>24</b>
<b>IV.a.</b> Orígenes .....	24
<b>IV.b.</b> Asociación entre oncogenes y retrovirus.....	25
<b>IV.c.</b> Mecanismos de activación de protooncogenes.....	28
<b>IV.d.</b> Transformación por medio de oncogenes.....	32
<b>IV.e.</b> Relación entre factores de crecimiento, oncogenes y proliferación de células stem.....	35
<b>IV.f.</b> Expresión de oncogenes: correlación con el modelo de célula stem.....	39
<b>V. Objetivos de la Investigación.....</b>	<b>41</b>

### MATERIALES Y METODOS

<b>I. Obtención del material.....</b>	<b>44</b>
---------------------------------------	-----------

<b>II. Morfología.....</b>	<b>44</b>
<b>III. Determinación del antígeno carcinoembrionario por inmunohistoquímica.....</b>	<b>45</b>
<b>III.a. En cortes de parafina.....</b>	<b>45</b>
<b>III.b. En cortes por congelación.....</b>	<b>46</b>
<b>IV. Disociación enzimática de los carcinomas mamarios.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.a. Tumores primarios.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.b. Ganglios con metástasis.....</b>	<b>48</b>
<b>V. Índice de marcación con timidina.....</b>	<b>49</b>
<b>V.a. Tumores primarios sin disgregar.....</b>	<b>49</b>
<b>V.b. Tumores disgregados.....</b>	<b>49</b>
<b>VI. Sedimentación por equilibrio de densidades.....</b>	<b>51</b>
<b>VII. Determinación de receptores estrogénicos.....</b>	<b>51</b>
<b>VII.a. Medición del contenido total de receptores estrogénicos .....</b>	<b>51</b>
<b>VII.b. Determinación en suspensión celular por autorradiografía ...</b>	<b>52</b>
<b>VII.c. Determinación en fragmentos de tumores por autorradiografía.</b>	<b>54</b>
<b>VII.d. Determinación en utero de ratón .....</b>	<b>54</b>
<b>VII.e. Conteo de granos: especificidad .....</b>	<b>55</b>
<b>VIII. Ensayos histoquímicos.....</b>	<b>55</b>
<b>IX. Medición del efecto estrogénico sobre el índice de proliferación tumoral.....</b>	<b>56</b>
<b>X. Determinación de la expresión de la proteína ras p-21.....</b>	<b>56</b>
<b>XI. Determinación de la expresión del oncogene c-myc .....</b>	<b>58</b>
<b>XI.a. Clonado y amplificación del c-myc.....</b>	<b>58</b>
<b>XI.b. Transformación de las bacterias.....</b>	<b>59</b>
<b>XI.c. Amplificación del c-myc.....</b>	<b>60</b>
<b>XI.d. Recuperación del plásmido amplificado.....</b>	<b>60</b>
<b>XI.e. Comprobación de la presencia del c-myc en el DNA del plásmido.</b>	<b>61</b>
<b>XI.f. Hibridación in situ .....</b>	<b>63</b>
<b>XI.g. Aplicación simultánea de técnicas de inmunoperoxidasa y de hibridación in situ.....</b>	<b>65</b>

<b>XI.h.</b> Marcación del c-DNA por nick translation.....	65
<b>XII. Cultivo de células.....</b>	67
<b>XIII. Materiales.....</b>	67
 <b>RESULTADOS</b>	
<b>I. Expresión de marcadores de diferenciación y proliferación en carcinoma de mama humano.....</b>	69
<b>I.a.</b> Expresión del antígeno carcinoembrionario y su relación con la proliferación tumoral.....	69
<b>I.b.</b> Expresión de receptores estrogénicos.....	73
<b>II. Determinación de receptores estrogénicos por autorradiografía en cortes histológicos.....</b>	76
<b>II.a.</b> Estudios en útero de ratón.....	76
<b>II.b.</b> Estudios en cáncer de mama humano.....	79
<b>III. Separación de subpoblaciones celulares en cáncer de mama humano.....</b>	83
<b>III.a.</b> Subpoblaciones celulares en gradientes isopícnicos: validación de la metodología utilizada.....	85
<b>III.b.</b> Separación de los tumores primarios.....	89
<b>III.c.</b> Relación entre densidad y superficie nuclear.....	89
<b>III.d.</b> Expresión de CEA, RE y TLI en suspensiones celulares.....	91
<b>III.e.</b> Estudios sobre ganglios metastásicos.....	104
<b>IV. Efecto estrogénico sobre la proliferación tumoral.....</b>	107
<b>IV.a.</b> Inducción proliferativa por diferentes concentraciones de estradiol.....	107
<b>IV.b.</b> Efecto de agonistas y antagonistas estrogénicos.....	116
<b>IV.c.</b> Correlación entre el nivel basal de TLI y el incremento en el TLI por efecto estrogénico.....	119
<b>IV.d.</b> Efecto estrogénico y expresión de ras p-21 y CEA.....	121
<b>V. Caracterización de células transicionales en tumores primarios de mama.....</b>	122
<b>VI. Expresión de ras p-21 en tumores primarios de mama.....</b>	125



<b>VI.a.</b>	Expresión de ras p-21 a diferentes concentraciones del anticuerpo Y13-259.....	129
<b>VI.b.</b>	Correlación entre la expresión de ras p-21 y la diferenciación tumoral.....	129
<b>VI.c.</b>	Correlación entre la expresión de p-21 y el contenido total de RE..	130
<b>VI.d.</b>	Correlación entre la expresión de p-21 y el índice de marcación con timidina (TLI).....	133
<b>VI.e.</b>	Correlación entre la expresión de p-21 y la de CEA.....	135
<b>VI.f.</b>	Identificación in situ de las células positivas para p-21 y para CEA: comparación con las células en activa síntesis de DNA.....	136
<b>VI.g.</b>	Localización intracelular de p-21.....	141
<b>VII.</b>	<b>Expresión de c-myc en cáncer de mama humano.....</b>	<b>141</b>
<b>VII.a.</b>	Detección de la expresión del c-myc por hibridación in situ.....	141
<b>VII.b.</b>	Correlación entre la expresión del c-myc y la diferenciación tumoral.....	144
<b>VII.c.</b>	Correlación entre la expresión del c-myc y el nivel de RE .....	145
<b>VII.d.</b>	Correlación entre la expresión del c-myc y la expresión de CEA ...	146
<b>VII.e.</b>	Correlación entre la expresión del c-myc y la proliferación tumoral.....	147
<b>VII.f.</b>	Expresión de c-myc y ras p-21 .....	148
<b>VII.g.</b>	Descripción morfológica de la hibridación in situ.....	148
<b>VII.h.</b>	Determinación simultánea de CEA o ras p-21 por inmunohistoquímica y c-myc por hibridación in situ .....	151

## **DISCUSION**

<b>I.</b>	<b>Correlación entre la expresión de CEA y el estado proliferativo celular .....</b>	<b>153</b>
<b>II.</b>	<b>Determinación de RE por autorradiografía.....</b>	<b>156</b>
<b>III.</b>	<b>Localización intracelular de los RE .....</b>	<b>157</b>
<b>IV.</b>	<b>Estudios en suspensiones celulares .....</b>	<b>159</b>
<b>V.</b>	<b>Efectos estrogénicos sobre la proliferación celular .....</b>	<b>164</b>
<b>VI.</b>	<b>Expresión de p-21 en tumores primarios de mama .....</b>	<b>170</b>
<b>VII.</b>	<b>Expresión del c-myc.....</b>	<b>175</b>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>182</b>

ABREVIATURAS .....	164
ANEXO .....	165
REFERENCIAS.....	167

El cáncer es reconocido como una patología de la proliferación celular que se caracteriza por la pérdida de los controles que mantienen la organización celular de los tejidos. El reconocimiento de los mecanismos por los cuáles las células malignas originadas dentro de un tejido normal consiguen crecer, producir el tumor y luego metastatizar en otros sitios del cuerpo, es quizás el objetivo más importante en la investigación del cáncer. A pesar de los importantes avances en técnicas quirúrgicas y el desarrollo de terapias adyuvantes muy agresivas para el tratamiento de las neoplasias primarias, es muy relativo el éxito alcanzado, especialmente en tumores sólidos.

Profundas investigaciones realizadas en los últimos años en diferentes laboratorios de todo el mundo han acercado nueva información acerca de los eventos básicos en la patogénesis de la enfermedad y la posible identidad de las células del tumor responsables de su crecimiento. Estos estudios estarían abriendo serias dudas acerca del diseño de protocolos terapéuticos usados en estos momentos para la erradicación definitiva de la neoplasia. El uso correcto y alternativo de drogas antineoplásicas, así como sus efectos adversos, pasa necesariamente por el conocimiento de la dinámica celular, tanto de los tejidos a vulnerar por el tratamiento, como de los tejidos normales del huésped. Desafortunadamente, el actual nivel de comprensión científica de la biología del cáncer y específicamente del cáncer de mama humano, por lo menos en lo que respecta al tratamiento terapéutico, no permite una racionalización acerca del uso de drogas, su combinación, secuencia, dosis y efectos adversos. Como fue ya mencionado por otros autores, la historia de la investigación en este área del cáncer de mama humano podría ser descripta como racionalmente empírica (1).

Dentro de la investigación biológica del cáncer es posible sugerir una serie de objetivos primordiales que se encuentran interrelacionados entre sí y que son los siguientes:

- a. estudio de los mecanismos primarios de la oncogénesis.

- b.** comprensión de la dinámica del crecimiento tumoral y de la interrelación entre los diferentes componentes celulares del tumor.
- c.** búsqueda de marcadores que permitan la individualización de las células responsables de la proliferación tumoral para intentar racionalizar los tratamientos terapéuticos.

Este trabajo de tesis intenta ser un aporte a los items a y b en el estudio del cáncer de mama humano, con una aproximación final al item c.

## INTRODUCCION

### I. Heterogeneidad celular en tumores humanos

El término "progresión neoplásica" fue utilizado por Foulds para describir cambios temporales en las características biológicas de las células tumorales (2). Este proceso biológico que permite a la célula maligna adquirir la capacidad de invadir el tejido adyacente y metastatizar se manifiesta a través de una tendencia de parte de la población neoplásica a incrementar su capacidad proliferativa, evidenciando una mayor independencia de los mecanismos que regulan la proliferación celular. Uno de los primeros ejemplos descritos al respecto es el proceso mediante el cual un tumor hormona-dependiente, deja de responder al efecto hormonal durante la progresión del tumor (3).

En líneas generales se cree que a medida que el tumor progresa, se evidencia un aumento de la "malignidad" que generalmente va acompañado de una pérdida de la capacidad de diferenciación. Debido a que estos cambios progresivos en el fenotipo tumoral ocurren en forma paulatina y no en todas las células en forma simultánea, es dable suponer que la progresión neoplásica traerá aparejada una gran heterogeneidad celular en un tumor en el momento del diagnóstico clínico (2,4). Hasta comienzos de la década del 70 los parámetros acerca de la proliferación celular se basaron en estudios cinéticos del total de la población de células tumorales (5). El concepto de que solamente una parte de las células de un tumor posee capacidad proliferativa, recién pudo ser confirmado con el advenimiento de técnicas de detección como la autorradiografía (5) y la más reciente de los ensayos de clonogenicidad (7,8).

### **I.a. Implicancias en el estudio de la biología del cáncer**

Algunos tejidos contienen células que se dividen a lo largo de toda la vida dando origen a células diferenciadas y células similares a sí mismas. Estas células son las células stem. En tejidos con capacidad de autorrenovación como el epitelio seminífero (9), el intestino delgado (9), la médula ósea (9,10), etc., las células stem han sido identificadas con bastante precisión.

En estos tejidos las células funcionalmente diferenciadas se pierden y son reemplazadas por la proliferación de células más primitivas (12). El concepto de célula "stem" en la dinámica histológica de los tejidos normales se refiere a aquellas células más primitivas dentro de un tejido. Estas pueden dar origen tanto a células que llegan a la diferenciación funcional compensando pérdidas fisiológicas, así como mantener constante su propia población de células stem (10). La producción de una gran familia de células descendientes diferenciadas es un proceso denominado "expansión clonal", decrece con la edad y es muy baja en adultos, mientras que la división para producir nuevas células stem se denomina "capacidad de autorrenovación" y es la propiedad que define a una célula stem\*.

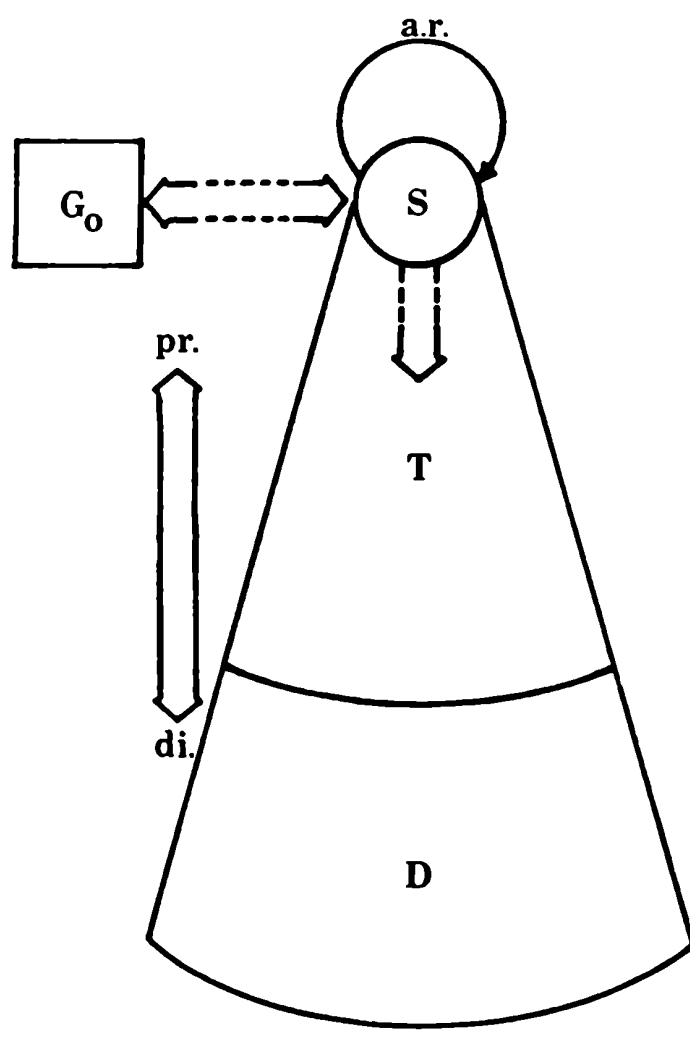
### **I.b. Subpoblaciones celulares.**

Dentro de una jerarquía celular, las células exhiben propiedades que van cambiando en forma unidireccional, llevando siempre a un incremento de las funciones relacionadas

---

\* La palabra "stem" (progenitora, madre), si bien posee raíz inglesa, ha sido tan ampliamente incorporada en la terminología científica actual que será utilizada sin traducción en el presente trabajo.

con la diferenciación, con una progresiva pérdida de la capacidad proliferativa. Esto se ejemplifica en la figura 1.



**Figura 1.** *Representación esquemática de la jerarquía de la renovación celular. Las células stem (S), pueden encontrarse en reposo (G<sub>0</sub>) o en división. En estado proliferativo pueden autorrenovarse (a.r.) o ingresar en un proceso de expansión clonal produciendo células transicionales (T) hacia la diferenciación (D). Este proceso de diferenciación (di.) está acompañado por una disminución en el potencial proliferativo (pr.).*

A ambos extremos de la jerarquía celular se encuentran, por una parte las células stem con el máximo potencial proliferativo y en condiciones de dar origen a toda la descendencia celular y en el otro extremo las células diferenciadas y terminales sin ninguna capacidad proliferativa. El segmento de células transicionales mantendrá una determinada capacidad proliferativa de acuerdo a su posición relativa con respecto a las células stem y a las diferenciadas (13).

Por lo tanto en tejidos normales en renovación existirían tres grandes categorías de células en el total de la población: células diferenciadas (finales) no proliferantes; células en vías de diferenciación (transicionales) con limitada capacidad proliferativa. Estas dos subpoblaciones dominan numéricamente a la tercera subpoblación de células proliferantes (stem) con capacidad de autorrenovación (14).

Un ejemplo de tejido normal en el cual se demostró la presencia de las diferentes subpoblaciones es el epitelio seminífero, donde las células stem corresponden a las espermatogonias de tipo A; las células transicionales incluyen a las espermatogonias de tipo B, los espermatoцитos y los espermátides, mientras que las células finales son los espermatozoides (9).

Estudios de Leblond y Cheng demostraron la presencia de las tres subpoblaciones en intestino de ratón. Se observó que las células columnares de las bases de las criptas en el epitelio del duodeno y del yeyuno son las únicas capaces de dividirse manteniendo su propia fuente de células. Asimismo pueden dar origen a cuatro tipos de células transicionales, que a su vez poseen la capacidad de dividirse tres veces más hasta que se diferencian en células maduras y totalmente diferenciadas. Estas últimas se localizan en la parte superior de las criptas (9).

Las características ultraestructurales de las células stem del epitelio seminífero y del intestino son bastante similares, ya que ambas poseen un tamaño intermedio, cromatina difusa, falta de organelos y abundantes ribosomas libres (9).

La definida localización de las células stem en el epitelio seminífero a lo largo de la membrana limitante, así como de las células stem de intestino en la base de las criptas, permitió su estudio por técnicas de autorradiografía. Por el contrario, la identificación



de las células stem en médula ósea necesitó del desarrollo de técnicas de cultivo de células en agar semisólido ó de la formación de colonias en el bazo de ratón. Till y McCulloch en una reciente revisión definen a la célula stem hematopoyética como pluripotencial, capaz de autorrenovarse y de dar origen tanto a la serie mieloide, como a la linfoide . Cada serie posee a su vez células primitivas capaces de responder a estímulos externos (por ejemplo eritropoyetina en la línea eritrocítica) y de dar colonias con células que expresan marcadores de diferenciación (12) .

Más aún, estudios genéticos de un solo clon de células demostró que estos pueden contener elementos relacionados con la eritropoyesis, granulopoyesis y megacariocitopoyesis, lo que demostró inequívocamente que las células stem eran pluripotenciales (15).

A pesar de que la existencia de células stem en médula ósea es actualmente muy clara, su participación diaria en el sistema hematopoyético no lo es tanto, pues podrían funcionar solo como reserva en casos de emergencia. Por ejemplo Lahiri y Van Putten demostraron que una gran parte de las células stem hematopoyéticas que se encuentran quiescentes en ratón, pueden ser inducidas a entrar en ciclo en un lapso de 10 minutos, luego de una exposición del ratón a 100 rad (16). Una respuesta regenerativa similar fue descrita en la mucosa intestinal y en la epidermis (11).

### **I.C. La organización celular del tejido tumoral**

Los tumores humanos se desarrollan en tejidos que normalmente (o condicionalmente) proliferan por mecanismos de autorrenovación. Llama la atención el hecho que los tumores son específicos de cada tejido, es decir, el tumor de mama humano puede ser identificado como tal ya que remeda el tejido mamario del cual se originó e incluso los tumores expresan marcadores específicos del tejido de origen (factor próstático específico, factor pancreático específico, caseína, lactalbúmina,  $\beta$ HCG, etc.). Por lo tan-

to es posible suponer que el origen de los tumores residiría en una célula o grupo de células determinada a diferenciarse pero que posee capacidad proliferativa (13).

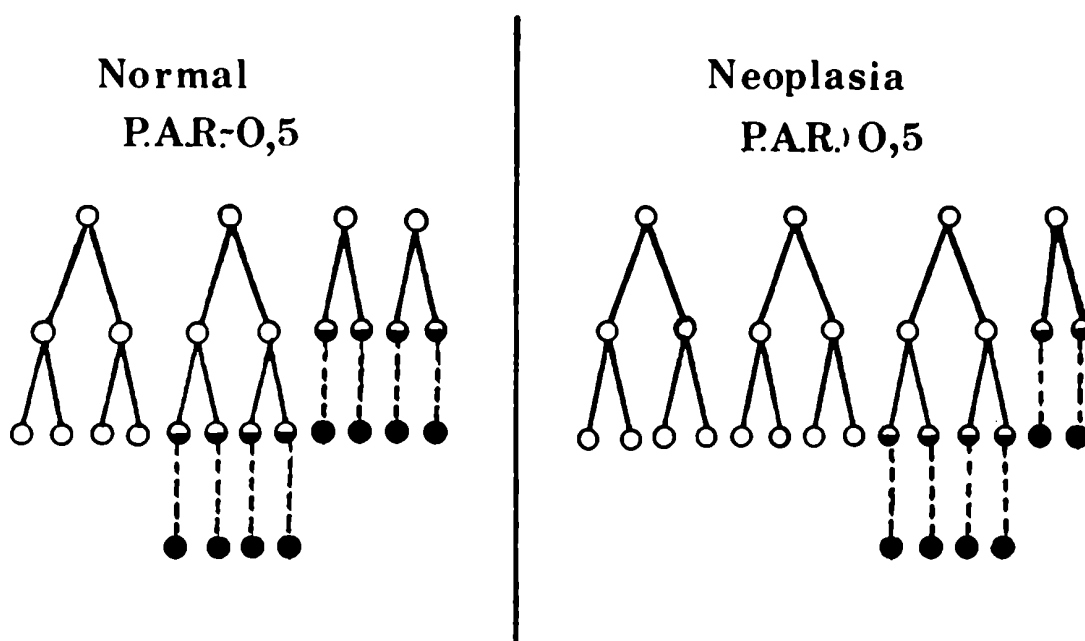
Sobre la base de este enfoque, se han propuesto durante los últimos años dos teorías generales acerca del origen de los tumores. La primera de ellas, aceptada durante muchos años, sugería que un evento carcinogénico producido en una célula diferenciada podría inducir a ésta a proliferar, incluso en condiciones en las cuáles retendría su capacidad de diferenciación de acuerdo a su función tisular. De acuerdo a este modelo se produciría un proceso de desdiferenciación celular (17).

Una segunda teoría general sugiere que la neoplasia se originaría en un evento carcinogénico a nivel de las células stem del tejido en cuestión. El potencial proliferativo y la capacidad de diferenciación de esta subpoblación de células, evita tener que proponer un mecanismo de desdiferenciación. Sin embargo, es necesario proponer que el evento carcinogénico antes referido, debería producir una pérdida de los controles naturales que rigen los mecanismos por los cuáles una célula stem puede optar por autorrenovarse o en su defecto entrar en un proceso que lleve a su diferenciación. La capacidad de la neoplasia de organizar una estructura diferenciada que remede el tejido en el cual se originó, dependerá del grado de alteración producido en las células stem debido al evento carcinogénico antes mencionado (17).

Desde el punto de vista matemático de la estadística de poblaciones, un sistema de autorrenovación puede ser descrito de esta manera: La célula stem puede dividirse produciendo dos células stem hijas (autorrenovación) o dos células hijas no stem que se diferenciarán. La probabilidad del proceso de autorrenovación (P.A.R) es  $p$ , mientras que la probabilidad de entrar en diferenciación es:  $q = 1 - P.A.R. (p)$ ; (18).

Por cuestiones de equilibrio fisiológico, se requiere que en un tejido adulto el número de células stem sea constante. La proliferación de las células stem en tejidos normales debe ocurrir solo para proveer al tejido de nuevas células diferenciadas y funcionales para compensar las pérdidas fisiológicas, manteniendo al mismo tiempo constante su propio número. Teóricamente, el mantenimiento de un número constante de células stem se podría conseguir por medio de una división asimétrica que produzca una célula stem y

una diferenciada; sin embargo, la mayor parte de las evidencias en tejidos normales sugieren que la división de las células stem es simétrica, produciendo dos células stem hijas o en su defecto dos células que irán hacia la diferenciación (9). De aquí que cuando la pérdida de células es balanceada por una producción similar, estaremos ante un equilibrio fisiológico y P.A.R. será un número cercano a 0.5. Esto se ejemplifica en la figura 2.



**Figura 2.** *Esquema de proliferación de células stem. La probabilidad de autorrenovación (P.A.R.) en tejido normal es cercana a 0,5 y en la neoplasia mayor a 0,5. ○) células stem; ⊗) transicionales; ●) diferenciadas*

La progenie no stem posee una capacidad proliferativa limitada que irá decreciendo con el aumento de la diferenciación (13,18).

El modelo del origen clonal del cáncer a partir de las células stem sugiere que cuando un cambio hereditario e irreversible confiere a la célula stem una probabilidad de autorrenovación  $P.A.R. > 0,5$ , se producirá una expansión clonal de las células stem y estaríamos frente a lo que se denomina neoplasia (13). Según este modelo, la célula

stem transformada seguirá produciendo su progenie diferenciada aunque en menor proporción que en el tejido normal (Fig. 2).

En algunos tumores transplantables, así como en la mayoría de las líneas celulares propagadas in vitro, P.A.R. es un valor muy cercano a 1,0 y todas las células presentes son células stem. Para todos los valores intermedios entre 0,5 y 1,0, la neoplasia contendrá también células no stem. Esta es seguramente la situación en los tumores humanos (11).

La organización de los tejidos normales de autorrenovación tiene importantes implicancias en lo que respecta a las células que se encuentran ciclando. Evidencias obtenidas a partir de tejidos hematopoyéticos humanos y murinos y de la producción de células en la mucosa intestinal, sugieren que la pequeña proporción de células stem efectivas en un tejido normal de autorrenovación se encuentra quiescente en el estadio denominado G<sub>0</sub>, mientras que la mayoría de las células que se encuentran ciclando son las denominadas transicionales (12). Debido a que las evidencias experimentales sugieren que los tumores humanos serían "caricaturas" del proceso de renovación celular de su tejido normal equivalente (20), la diferencia más importante entre ambos radicaría en que en el tumor el segmento de células stem se encontraría en un proceso de expansión incontrolable, con la mayor parte de éstas proliferando.

Existen evidencias que en conjunto favorecen el modelo que toma a la células stem como el origen de ciertos tumores humanos:

1. La mayor parte de los diagnósticos histopatológicos se basan en la diferenciación celular específica de cada tejido; es decir, la expresión más diferenciada de los tumores sólidos remeda el tejido en el cual se originó.
2. Diversos trabajos, incluso de nuestro laboratorio, demuestran que existe una correlación inversa entre el grado de diferenciación tumoral y el índice mitótico o el índice de captación de timidina (21,22).
3. La experiencia clínica con radioterapia sugiere que la remisión de un tumor se obtiene por la muerte de una pequeña proporción de células.

4. En los ensayos clonogénicos, el número de colonias a partir de suspensiones unicelulares se encuentra generalmente en el rango de 0.001% - 1.0 % del total de células plaqueadas (24).

5. En estudios hematológicos se han encontrado marcadores de clones, como el cromosoma Filadelfia (25) o las isoenzimas de glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa (26,27), en múltiples linajes celulares, indicando un único origen para todos los linajes: una célula stem totipotencial.

Estudios realizados en leucemia mieloblástica aguda demostraron que los mieloblastos obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes, forman colonias en cultivo en medios condicionados por leucocitos en presencia de PHA (28). Sin embargo, no todas las células que conforman estas colonias son funcionalmente similares, ya que solo una minoría pueden volver a formar colonias luego de un nuevo repique, mientras que la mayoría ha perdido su capacidad proliferativa (29). Esto indica que la progenie de los mieloblastos puede autorrenovarse, o bien alternativamente, entrar en una serie de divisiones terminales durante las cuales pierde su potencial proliferativo.

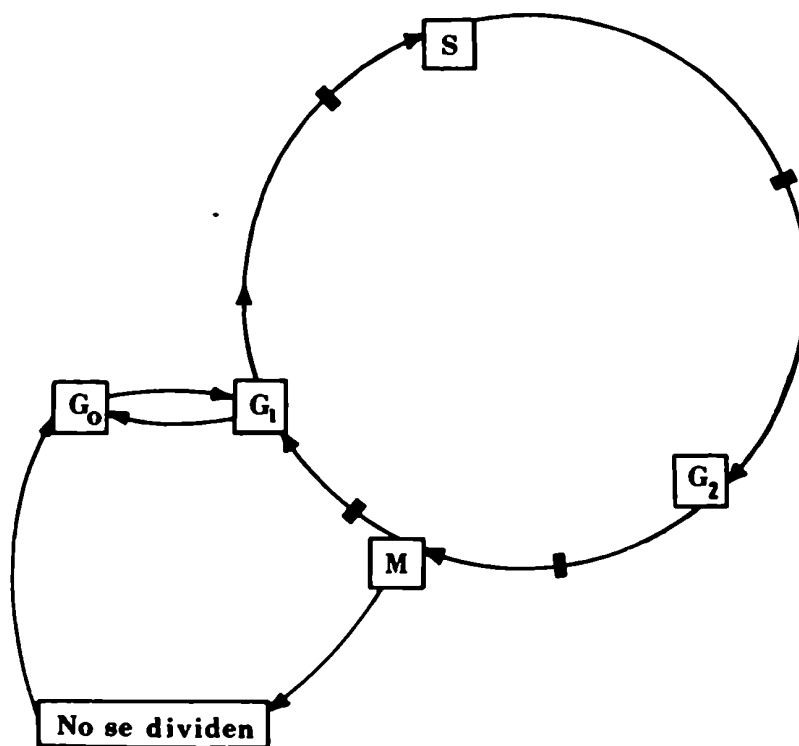
Estos estudios fueron luego de gran utilidad en el estudio de neoplasias humanas sólidas. Los diferentes estudios han demostrado la presencia de una pequeña subpoblación de células stem (usualmente < 2-3% del total de células) acompañadas de una mayoría de células con capacidad proliferativa limitada y que expresan marcadores de diferenciación. Por lo tanto es posible afirmar que las células que componen un tumor son heterogéneas en lo que respecta a su potencial proliferativo y a su diferenciación celular, en función de la posición relativa que tengan dentro de la jerarquía de renovación celular (13). A pesar de que el origen de los tumores parece ser claramente monoclonal, su propia inestabilidad genética hace que aparezcan nuevas líneas stem discretas, algunas de las cuáles pueden poseer claras ventajas proliferativas sobre el resto de las líneas y predominarán en el tumor (4). Es decir que la gran heterogeneidad celular se verá incrementada por la probable aparición de nuevas líneas, entre ellas las resistentes a las diferentes drogas.

---

### I.d. Técnicas de detección de células stem

La presencia de células stem en una población en renovación es fácilmente detectable por autorradiografía, luego de la administración de timidina radioactiva in vitro o in vivo.

Como se sabe este método pone de manifiesto el grupo de células que se encuentran en la fase S del ciclo celular (Fig.3).



**Figura 3.** *Representación esquemática del ciclo celular. G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son las fases de intervalo entre S (síntesis de DNA) y M (mitosis), G<sub>0</sub> es un estadio de reposo.*

El porcentaje de células marcadas con radioactividad sobre el total de células se denomina "índice de marcación con timidina" (T.L.I.: thymidine labelling index) que como el índice mitótico está relacionado con la proliferación tumoral (30).

Por lógicas consideraciones de tipo ético, es muy poco lo que se ha hecho in vivo en tumores humanos. Sin embargo cuando se hicieron comparaciones entre los índices de *marcación* estimados in vitro e in vivo en tejidos animales, la correlación que se encontró fue muy buena (31). En líneas generales se ha podido observar que el T.L.I. correlaciona directamente con la agresividad de la neoplasia (30). Steel publicó un resumen de 705 mediciones de T.L.I. en tumores humanos (31) y observó que no existía gran coincidencia entre las diferentes series; mientras algunos grupos mostraban un T.L.I. promedio de alrededor del 13%, existían otros trabajos donde este promedio no superaba el 3%. Esta discordancia obedecía a las diferencias en el tiempo de duplicación real de los tumores; mientras en los sarcomas éste depende exclusivamente de la fracción de crecimiento del tumor, en carcinomas es función especialmente de la pérdida de células durante el proceso de crecimiento y expansión del tumor. Denekamp sugirió que esto se debía a que los carcinomas proliferan mediante los mecanismos de autorrenovación, por lo que poseen normalmente un alto "turnover" celular y por ende un alto porcentaje de pérdida de células (32).

Trabajos posteriores de Kusama y col. (33) y Silvestrini y col. (34), confirmaron que la pérdida de células en los carcinomas está en el orden del 90%.

Uno de los grupos con mayor experiencia en el estudio de los índices de proliferación de las neoplasias demostró en una reciente revisión, que el T.L.I. fluctúa entre 0.1% en carcinoma de tiroides, hasta 45.8% y 65% en linfomas malignos de tipo histiocítico y tumores de células germinales respectivamente (30). En cáncer de mama humano el T.L.I. (de 282 casos estudiados) fluctuó entre 0.05% y 35.6% y correlacionó con el grado de agresividad; una correlación similar se encontró cuando se comparó el T.L.I. con la fracción de células en fase S calculada por citometría de flujo (35). Se demostró

asimismo que tanto el T.L.I. como la fracción S están inversamente relacionadas con la presencia de receptores estrogénicos (30, 36).

De los datos expuestos hasta aquí es posible afirmar lo siguiente con respecto al índice de captación de timidina:

- a. los diferentes valores de T.L.I. demuestran que existe una gran variabilidad intertumoral en el número de células ciclando.
- b. los tumores de crecimiento rápido y más agresivos poseen los valores más altos de T.L.I.

La confirmación de estos resultados que indicaban que solo un pequeño porcentaje de células posee capacidad proliferativa, se obtuvo utilizando técnicas de cultivo en agar que fueron adaptadas de los estudios realizados en tejidos hematopoyéticos. Esta técnica denominada "ensayo de clonogenicidad", consiste en el crecimiento de colonias en una doble capa de agar semisólido a partir de células obtenidas de un tumor primario (por digestión enzimática o mecánica) ó a partir de derrames pleurales o ascíticos.

Hamburger y Salmon fueron los primeros en reportar el uso en gran escala de técnicas de cultivo en agar semisólido para cuantificar las células clonogénicas en tumores epiteliales (37). En un trabajo inicial demostraron que el porcentaje de colonias (eficiencia clonogénica) obtenidas a partir de células de líquido ascítico de carcinoma de ovario osciló entre 0.02% y 0.16%.

Trabajos posteriores permitieron clonar mielomas (38), melanomas (39), adenocarcinomas de vejiga (40) y colon (41), etc. Un trabajo de Benard y col. mostró que en 13 adenocarcinomas primarios de ovario, 15 de mama y 5 melanomas, la eficiencia clonogénica fue de 0.001- 1.0%, 0.005-0.1% y 0.003-0.1% respectivamente (42). Esta serie de resultados confirmó que sólo un pequeño porcentaje de células del total del tumor puede originar su propia descendencia produciendo una colonia.



Existe el convencimiento de que las células clonogénicas in vitro pueden ser similares a las potenciales células stem in vivo. Sin embargo resulta conveniente seguir denominando células clonogénicas a las que crecen in vitro y células stem a las responsables del crecimiento tumoral in vivo. Por ejemplo, un reciente trabajo de Karp y col. demostró en mieloma múltiple humano, que la fracción de células stem que se encuentran en G<sub>0</sub> no entran en división cuando se las cultiva en agar semisólido, sino en respuesta a determinados factores de crecimiento (43).

Los trabajos presentados sobre el tema estarían sugiriendo que el origen clonal a partir de las células stem es aplicable a los tumores. En este sentido se ha propuesto que la subpoblación de células stem son las responsables de:

- a. el crecimiento del tumor primario.
- b. repoblar un tumor luego de un tratamiento.
- c. diseminar el tumor produciendo metástasis.

## **II. Receptores estrogénicos**

### **II.a Estudios en cáncer de mama: relación con la evolución clínica**

El cáncer de mama posee un rol preponderante en la morbilidad y mortalidad humana, llegando al 18% de todos los cánceres detectados (44). Es la enfermedad maligna más frecuente en las mujeres, siendo causa de muerte en aproximadamente 20 de cada 100.000 mujeres (44, 45).

Desde hace mucho tiempo se tenía conocimiento de que diferentes manipulaciones endocrinas como ovariectomía, adrenalectomía, hipofisectomía, administración de antiestrógenos o dosis farmacológicas de estrógenos producían regresiones en ciertos casos de cáncer mamario humano (46).

Sin embargo recién en 1966 fue descripta la presencia de un receptor estrogénico en útero de rata por Gorski y Tate (47). Estos receptores poseen una gran especificidad de unión con alta afinidad por hormonas estrogénicas. La unión hormona-receptor induce una unión posterior a un "aceptor" de la cromatina que es en definitiva lo que conduce a la *expresión* característica de esta hormona en particular (48).

Fueron Jensen y col. quienes propusieron en 1967 que la presencia de receptores específicos de unión de estrógenos en cáncer de mama humano, podría indicar si el tumor podría responder a algún tipo de terapia endocrina (49). Trabajos de uno de los grupos más importantes en el tema como el de W. C. McGuire, demostraron que aproximadamente un 70% de los pacientes con cáncer de mama humano pueden ser definidos como receptor estrogénico positivos (RE+); sin embargo sólo un 60% de éstos responden a algún tipo de terapia endocrina. Del 30% de pacientes con tumores receptor estrogénico negativos (RE-) alrededor del 10% responde a la terapia endocrina (51). En un trabajo de revisión del grupo de E. Jensen, se observó que 53/73 casos con alto contenido de RE dieron remisiones objetivas, mientras que sólo 8/108 casos con RE- mostraron respuesta a la terapia endocrina (52). Mientras que la respuesta positiva de un tumor RE+ a la terapia endocrina es ciertamente comprensible, no lo es tanto la de tumores RE-. Una de las posibles razones es que la técnica que se utiliza corrientemente permite detectar solo receptores libres de hormonas; posiblemente la respuesta de tumores RE- corresponda a falsos negativos, donde simplemente los receptores no pueden ser detectados ya que se encuentran ocupados por hormona circulante.

El hecho de que no todos los tumores RE+ responden a la terapia indicaría algún tipo de defecto posterior a la unión hormona-receptor. Debido a que la síntesis del receptor de progesterona en útero está controlada por los estrógenos (53,52) se especuló con que la presencia de receptores de progesterona en tumores de mama humano estaría demostrando la presencia de receptores estrogénicos funcionalmente activos. Estudios realizados con la línea de carcinoma de mama MCF-7 demostraron que efectivamente la síntesis del receptor progestínico estaría regulada por la unión del estrógeno al RE (55). Trabajos posteriores realizados por diferentes grupos determinaron que aquellos tumo-

res que no contienen receptores estrogénicos raramente poseen receptores de progesterona; por otra parte alrededor de un 75% de los tumores RE+ contenían receptores de progesterona positivos (RPg+). Sin embargo sólo entre el 70%-80% de los pacientes RE+/RPg+ responden a algún tipo de terapia endocrina, mientras que un 30% de los pacientes RE+/RPg- también responden a este tipo de terapia (51, 56, 57, 58).

De estos resultados resulta evidente que aunque la presencia de RPg asociada a la de RE fue un indicio importante de una probable respuesta positiva a la terapia endocrina, esta correlación no fue total.

## **II.b. Coexistencia de diferentes subpoblaciones celulares en cáncer de mama humano.**

Como he mencionado durante esta introducción, las células stem deben ser el blanco de todo tipo de terapia que tenga por objeto el control del tumor. Las células stem diferirán de su progeñe en la capacidad proliferativa y en el grado de diferenciación. Estas diferencias pueden ser muy importantes para la determinación de la sensibilidad relativa al tratamiento.

Los estudios clínicos previamente mencionados indican que aproximadamente un 40% del total de los pacientes con cáncer de mama responden a la terapia endocrina. La mayor parte de estos pertenecen al grupo de pacientes RE+RPg+. Sin embargo uno de los hechos más relevantes que se observa es que la respuesta del paciente a este tipo de tratamiento es solo parcial; es por eso que la efectividad del tratamiento luego de una recidiva o recurrencia se calcula según el "tiempo libre de enfermedad" y no según la curación (65).

Un trabajo reciente muestra que el 100% de los pacientes con tumores avanzados (RE+) que en principio respondieron a la terapia hormonal dejaron de hacerlo a medida que transcurrió el tiempo, produciéndose un agravamiento de la enfermedad en un lapso no mayor de seis años (66).

El mecanismo biológico por el cual un tumor que posee receptores no responde o deja de responder en forma progresiva a la terapia hormonal permanece poco claro. Mientras que en tumores murinos experimentales con altos niveles de receptores (67) se detectó la paulatina aparición de células con bajo contenido de receptores o de poblaciones que a igual nivel de receptores tenían un cariotipo diferente (68), en cáncer de mama humano existen pocos datos al respecto. La detección de receptores estrogénicos biológicamente inactivos en úteros de pacientes postmenopáusicos podría servir como ejemplo de un mecanismo similar en carcinoma de mama (69).

Uno de los aspectos poco estudiado era la distribución de receptores en la población total de células que componen un tumor. Los valores de RE que se obtienen por el ensayo bioquímico no permiten determinar la posible heterogeneidad de expresión de RE entre las diferentes células. Estos estudios comenzaron a tomar una gran importancia a partir de la posibilidad de que la falta de respuesta total a una terapia hormonal estuviera relacionada con la heterogeneidad celular en lo que hace a la expresión de RE.

Los primeros estudios realizados para detectar esta posible heterogeneidad se llevaron a cabo usando estrógenos fluorescentes o anticuerpos anti-estradiol conjugados con fluoresceína. Por estos métodos se demostró de hecho que la mayoría de los carcinomas mamarios humanos contienen una población heterogénea de células RE+ y RE-, variando su proporción en los diferentes tumores (70,71). Se observó además que existían diferentes intensidades entre las diversas células RE+, lo que evidenciaba diferencias cuantitativas entre las células de un mismo tumor.

Estudios posteriores demostraron que este tipo de técnicas no estarían determinando la presencia de RE, sino algún tipo de unión inespecífica del estradiol (72,73).

Es así que con el correr de los años se desarrollaron técnicas más específicas para determinar la heterogeneidad de expresión de RE, utilizando anticuerpos policlonales (74) autorradiografía (75) y muy recientemente anticuerpos monoclonales (76,77). Estas técnicas que han demostrado ser altamente específicas confirman las evidencias previas acerca de la gran heterogeneidad celular en lo que concierne a la expresión de RE que los tumores que son designados RE+ por los métodos convencionales, pueden conte-

ner un porcentaje determinado de células RE-. Si la terapia hormonal actúa solo sobre las células RE+, habrá un segmento de células RE- que no responderá a este tipo de tratamiento.

Como hemos visto anteriormente, la transformación maligna resulta en una población heterogénea con la coexistencia de diferentes subpoblaciones celulares; la de células stem (indiferenciadas), finales (totalmente diferenciadas) y un tercer grupo en estadios intermedios de diferenciación. La pregunta que surge inmediatamente es cuál de estas poblaciones expresa receptores estrogénicos; como veremos más adelante, la respuesta a esta pregunta es de crucial importancia en la comprensión de los mecanismos de proliferación tumoral y la posible respuesta tumoral al tratamiento.

### II.C. Relación entre la presencia de receptores estrogénicos, potencial proliferativo y diferenciación tumoral

Los patrones de diferenciación del epitelio mamario hacia células ductales, alveolares o productoras de leche son muy complejos y han sido muy poco estudiados (59). Sin embargo resulta evidente que estos cambios son influenciados por hormonas estrogénicas siendo la acción de estas últimas dependiente de la presencia de las proteínas específicas de unión. En cáncer de mama humano está ampliamente demostrado que la presencia de estos receptores estrogénicos está particularmente asociada con tumores más diferenciados (60,61).

En especial se puede citar un trabajo cooperativo donde se demostró que todos los tumores con grado histológico o nuclear 1 (mejor diferenciados) fueron RE+; 98% de los tumores RE- fueron de grado histológico 3 y 78.4% de grado nuclear 3 (pobrementemente diferenciados) (31).

Trabajos posteriores demostraron que la presencia de receptores estrogénicos está asociada con bajos índices de proliferación. En un análisis de la cinética de creci-

miento de 199 casos, Silvestrini y col. (63) sugirieron la existencia de tres grupos con cinéticas diferentes: a) un grupo de pacientes postmenopáusicos con baja proliferación (bajo T.L.I.) y alto contenido de RE; b) un segundo grupo con valores de T.L.I. intermedios que incluyen pacientes premenopáusicos RE+ y postmenopáusicos RE-; c) un tercer grupo de tumores altamente proliferantes de pacientes premenopáusicos RE-. J. Meyer y col. demostraron que todos los tumores con bajos T.L.I. contienen RE. Un 80% de los tumores con T.L.I. intermedio poseen receptores, mientras que solo el 30% de los tumores con valores elevados de T.L.I. poseen RE (21). En otro trabajo se demostró que solo un 28 % de los pacientes son RE+ en tumores con muy altos índices de proliferación, mientras que este porcentaje llega al 83% en los pacientes con bajos índices (22). Estos resultados fueron confirmados utilizando citometría de flujo para medir la distribución de DNA. Tumores con DNA diploide o cercano a la diploidía son en general RE+; mientras que aquellos tumores triploides, tetraploides o más, son RE- (35,36). En líneas generales los tumores aneuploides poseen un T.L.I. mayor que los diploides, lo que se encuentra en relación con lo anterior (35).

En un reciente trabajo sobre 357 casos Silvestrini y col. profundizan en la caracterización biológica del cáncer de mama humano y sostienen que a pesar de que el índice de proliferación de los tumores es mayor en los tumores RE- que en los RE+, la presencia de RE está inversamente relacionada con la actividad proliferativa en sólo el 64% de los casos. Los autores no encontraron ningún tipo de correlación lineal o exponencial entre los niveles de RE y el grado de proliferación tumoral (64). A raíz de que diversos tumores RE+ poseen alta actividad proliferante, queda por demostrar si esta corresponde a la posible subpoblación de células RE+ ó a la de células RE- (64).

### **III. Efectos estrogénicos sobre la proliferación celular y la cinética del ciclo celular**

Como he mencionado anteriormente, los tejidos normales o neoplásicos que proliferan por un mecanismo de autorrenovación se encuentran en un continuo turn-over celular; es decir, las células son continuamente producidas debido a la proliferación de las células stem y perdidas por muerte celular. La magnitud relativa de estos dos procesos que ocurren simultáneamente determinarán si la población celular crece, permanece estática o declina. Cualquier factor que modifique la fracción de crecimiento (el porcentaje de células que se encuentran ciclando) o la extensión de una fase del ciclo celular o el ritmo de muerte celular, podrá influir en las características de una población definida.

Los estrógenos tienen efectos complejos y aparentemente contradictorios sobre el crecimiento celular. Mientras que a bajas concentraciones actúan como agentes mitogénicos e inducen proliferación (78,79), a altas concentraciones (farmacológicas) tienden a inhibir la proliferación celular(80,81). Trabajos iniciales realizados por el grupo de Bresciani sobre células alveolares de las glándulas mamarias, demostraron que estradiol induce una reducción en las fases G1 y S del ciclo celular (82).

De allí en más numerosos estudios se llevaron a cabo para estudiar el efecto de los estrógenos sobre la proliferación celular. Actualmente se considera que los estrógenos aumentan la proliferación celular in vivo induciendo un "reclutamiento" semisincrónico de una población de células quiescentes en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, aumentando de esta forma la fracción de crecimiento. Paralelamente acortaría los tiempos de las fases del ciclo G1 y S (83).

Las primeras evidencias de efectos estrogénicos in vitro similares a los observados in vivo se obtuvieron con cultivos primarios de endometrio de conejo. En estos estudios se demostró que sólo las células quiescentes del cultivo son el blanco del efecto estrogénico; estas células son inducidas a entrar en el ciclo celular aumentando de esta manera el porcentaje de células proliferantes (84).

En lo que respecta al efecto de los antiestrógenos es muy poca la información acerca del efecto sobre la proliferación y cinética celular in vivo. La mayor parte de los datos han sido obtenidos también de los órganos reproductivos de animales castrados o inmaduros. En la rata, tamoxifeno actúa como agonista estrogénico induciendo la proliferación vaginal (85). Por otra parte tamoxifeno actúa como antagonista a nivel del epitelio luminal uterino, ya que inhibe el crecimiento en el número de células inducido por un continuo tratamiento con estradiol (85). Es interesante destacar que en el epitelio glandular se demostró que tamoxifeno induce muerte celular y que este proceso no puede ser revertido por estradiol (85).

### **III.a. Estudios sobre líneas celulares de cáncer de mama**

Hacia fines de la década del 70 comenzaron los estudios acerca de los efectos estrogénicos in vitro sobre líneas celulares de carcinomas de mama. Los primeros trabajos demostraron que concentraciones fisiológicas de estradiol ( $10^{-9}\text{M}$ ) estimulan la proliferación celular, mientras que concentraciones de  $10^{-7}\text{M}$  la inhiben. Aparentemente el efecto a bajas concentraciones sería una reducción en la duración de la fase  $G_1$  del ciclo (86). A mayores concentraciones ( $10^{-6}\text{M} - 10^{-5}\text{M}$ ), estradiol inhibe la proliferación celular y aparentemente induce la muerte de células receptor estrogénico positivas (78).

En las líneas MCF-7 y ZR-75, los antiestrógenos causan una inhibición del crecimiento y reducen el nivel de incorporación de timidina tritiada al DNA (78, 79, 87). Este efecto es revertido por la administración simultánea o subsecuente de estradiol.

Trabajos realizados por el grupo de H. Rochefort en la línea T47-D demostraron que en ausencia de insulina, estradiol induce proliferación celular a una concentración de  $10^{-9}\text{M}$ , mientras que a concentraciones del orden de  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  el crecimiento celular es similar al control sin hormona. Tamoxifeno consiguió inhibir el efecto estrogénico (89).



### III.b. Inducción del receptor de progesterona

Como mencioné previamente estudios realizados en MCF-7 demostraron que estradiol se une al receptor estrogénico induciendo su translocación del citosol al núcleo (actualmente se considera que la unión produce un cambio conformacional y no una translocación), produciéndose en el núcleo la desaparición del receptor por un proceso denominado "procesamiento", seguido de la síntesis del receptor de progesterona. Los anti-estrógenos tamoxifeno y nafoxidina también se unen al receptor e inducen la translocación; sin embargo el procesamiento con tamoxifeno es solo un 30% del control y el de nafoxidina no ocurre. Con ese nivel de 30% de procesamiento, tamoxifeno puede inducir síntesis del receptor de progesterona, pero no así nafoxidina (90). El efecto del tamoxifeno fue posteriormente corroborado in vivo al medirse el nivel de RPg en pacientes con metástasis cutáneas antes y después de administrarles tamoxifeno; en 6/14 pacientes con altos valores de RE, se produjo un aumento en los niveles de RPg luego del tratamiento (91). Sin embargo esta actividad similar a la de un agonista estrogénico fue solo transitoria, ya que al aumento inicial de RPg por efecto del tamoxifeno, le siguió un brusco descenso al cabo de 3-4 semanas (92).

De acuerdo a estos resultados, sería lógico considerar que tanto el efecto del estradiol sobre la proliferación celular así como el de inductor de la síntesis del receptor de progesterona, estaría mediado por su unión al receptor estrogénico. Asimismo se desprende que los efectos antagónicos de los antiestrogenos como el tamoxifeno también ocurrirían por un mecanismo mediado por el receptor.

A la luz de resultados más recientes, han aparecido serias dudas acerca de si el efecto estrogénico y antiestrogénico sobre la proliferación, está mediado por sus respectivas uniones al receptor estrogénico. En relación a esto, el grupo de Katzenellenbogen demostró, utilizando cuatro antiestrógenos diferentes, que todos tenían la capacidad de inhibir el crecimiento de la línea MCF-7 pero poseían efectos muy diferentes sobre la

capacidad de inducir la síntesis del receptor de progesterona. Por otra parte células ZR-75 crecidas en medio definido libre de suero, son inhibidas en mayor medida por la presencia de tamoxifeno, que por la remoción de estradiol del medio (79). Resultados similares se obtuvieron posteriormente en la línea MCF-7 (83).

Taylor y col. demostraron en un reciente trabajo que  $10^{-6}$ M de tamoxifeno inhibe la proliferación celular de cinco líneas diferentes de cáncer de mama humano, independientemente de su contenido de receptores. Sin embargo solo las líneas que poseen receptores estrogénicos son sensibles al efecto del tamoxifeno a concentraciones de  $10^{-7}$ M. Esto sugiere que podrían existir dos mecanismos de acción de dicho antiestrógeno (94).

#### **IV. Oncogenes**

##### **IV.a. Orígenes**

Como dijimos previamente Foulds fue el primero en analizar el proceso de progresión tumoral. Sus trabajos pusieron énfasis en el hecho que el fenotipo neoplásico está compuesto de varias unidades características, capaces de grandes variaciones. Estas variaciones, producto de la progresión tumoral, deben necesariamente reflejar la activación, mutación o pérdida de diferentes genes (2).

El extraordinario avance producido en los últimos años en el área de la biología molecular del cáncer ha abierto las puertas a la comprensión de los mecanismos que podrían regular esta progresión tumoral. Diversos estudios han demostrado que existen al menos tres grandes grupos funcionales de genes que podrían estar involucradas (97). El primero de estos grupos es el de los oncogenes, tema del cuál me ocuparé en detalle posteriormente. Existe un segundo grupo de genes llamados "supresores tumorales" o "anti-oncogenes"; se ha observado en ciertos tumores que estos genes deben estar deletados o funcionalmente inactivos para

que el tumor pueda aparecer; el gen *rb-1* aparentemente regula un paso esencial en el proceso de diferenciación de las células de la retina y se ha observado la pérdida de ambos alelos en células de retinoblastoma (98). Aparentemente estos genes supresores tendrían una diversidad tan grande como la observada para los oncogenes.

Existiría un tercer grupo, muy heterogéneo, denominado "genes moduladores" entre los que se encontrarían los genes del complejo mayor de histocompatibilidad con su posible regulación de la expansión metastásica, entre otros (99).

Dos líneas independientes de investigación han contribuido en los últimos años a la concepción de la importancia de los oncogenes en la etiología del cáncer. La primera de ellas se basó en el estudio de los mecanismos por los cuáles los retrovirus podían transformar células infectadas e inducir tumores en el huésped. Una línea alternativa de trabajo iniciada a fines de la década del setenta investigó, utilizando mecanismos de transferencias de genes, los aspectos moleculares responsables de tumores de origen no viral.

#### **IV.b Asociación entre oncogenes y retrovirus**

La primera asociación entre retrovirus y oncogenes surge de los trabajos realizados por el grupo de Bishop con el virus de sarcoma de Rous (RSV).

Ya en 1910 Rous había demostrado que un extracto de células obtenidas de un sarcoma de pollo podía inducir el mismo tipo de tumor al ser inyectado en pollos normales. El agente inductor de este fenómeno resultó ser un agente viral. Este tipo de virus fue exhaustivamente estudiado ya que su ácido nucleico resultó ser RNA y no DNA, posee un mecanismo de transcripción reversa que está codificado en su propio genoma, además de tener una gran capacidad de integración al genoma del huésped. Sin embargo una de las características más interesantes de estos retrovirus y aún menos comprendidas, es decir su capacidad de integrarse al

cromosoma del huésped y llevarse con él parte del genoma del mismo, abrió las puertas al estudio de los oncogenes.

En un primer estudio el grupo de Bishop demostró que el genoma viral está compuesto por dos partes diferentes (100); una de ellas asociada a la replicación viral, incluye los genes para la transcripción reversa, la integración y la formación de la partícula viral. Estudios con mutantes termosensibles (101) o con grandes deleciones (102) llevó a la identificación de un segmento del genoma viral con capacidad para inducir sarcomas in vivo y transformar un cultivo de fibroblastos de embrión de pollo. Posteriormente se observó que esta secuencia oncogénica denominada src codifica para una tirosina quinasa denominada pp 60 src (103) y posee una gran homología con un gene perteneciente al genoma de pollo normal (104).

Actualmente se considera que los retrovirus altamente oncogénicos son el producto de la recombinación entre virus no transformantes y genes de células normales. Por su homología con los oncogenes, estas secuencias normales de DNA han sido denominadas protoncogenes, término que naturalmente no indica que su función sea producir cáncer, sino que proviene de la homología entre las secuencias virales oncogénicas y el DNA celular normal.

Existen numerosos ejemplos de retrovirus transformantes que posiblemente se hayan originado por un proceso de recombinación, entre ellos el virus de sarcoma aviario (100), el de mielocitomatosis aviario (105), el de la leucemia de Abelson (106) y el de sarcoma de Kirstein y Harvey (107) entre otros. En el caso del gene src, se observó que tanto las células de aves como las humanas normales expresan la proteína (pp 60 src) aunque en una cantidad 100 veces menor a la de las células infectadas por el RSV (108). Estudios más recientes demuestran que células normales de origen murino sintetizan normalmente una proteína denominada p-21 que es altamente homóloga al producto del oncogene ras del virus de sarcoma murino de Harvey o Kirstein (109).

Hasta el momento se han encontrado casi treinta oncogenes virales (v-onc). Por medio de la utilización de técnicas de hibridación se ha detectado la presencia de secuencias altamente homólogas a éstos en el genoma celular (c-onc), no solo del mismo tejido infectado por el retrovirus, sino también en tejidos diferentes.

Actualmente se considera, especialmente debido al descubrimiento en levadura de genes homólogos al oncogene ras, que estos genes han aparecido en forma temprana en la evolución y se encuentran altamente conservados, por lo que estarían jugando un rol crucial en la organización de la célula normal.

Como se ha mencionado anteriormente, una segunda línea de trabajo independiente, derivó hacia los mismos genes celulares transformantes. Los experimentos iniciales del grupo de R. Weinberg se centraron en los mecanismos moleculares responsables de la transformación celular por exposición a mutágenos químicos. Utilizando técnicas de transferencia de DNA se pudo demostrar que ciertos tipos de células transformadas poseen secuencias oncogénicas en su DNA (112). Debido a que estos trabajos estaban confinados a los efectos transformantes de DNA de fibroblastos de ratón tratado con 3- metilcolantreno, resultaba importante establecer si DNA obtenido de otras fuentes tumorales tenía la capacidad de transformar células NIH3T3.

El grupo de Weinberg junto con otros pudieron demostrar no solo eso sino además que puede existir entrecruzamiento de tejidos e incluso de especies; es decir, DNA obtenido a partir de tumores de vejiga humanos, de ratón o conejo, de una línea de carcinoma de pulmón, de neuroblastoma de rata y otros, son capaces de inducir transformación de células NIH3T3 (113, 114).

#### **IV.c Mecanismos de Activación de protooncogenes**

Se ha podido demostrar que las proteínas productos de oncogenes forman un grupo estructural y funcionalmente muy variable (115). Algunas se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática, otras en citoplasma y otras en núcleo. Las de membrana y citoplasma poseen actividad de proteína quinasa o GTPasa, mientras que en las nucleares esto se desconoce aunque en algunos casos se ha demostrado su unión a la doble hélice del DNA (116).

Dada esta heterogeneidad, no resulta sorprendente que existan varios mecanismos de activación de protooncogenes que pueden ser separados en principio en dos grandes grupos. El primero, del cuál se deriva la hipótesis mutacional, sostiene que la "activación" de un proto c-onc es el resultado de un evento mutacional. El ejemplo más estudiado es el de las proteínas codificadas por el gene ras.

Diversos trabajos del grupo de Scolnick demostraron que el producto del gene ras del virus de sarcoma de Harvey es una proteína de 21000 dalton de peso molecular que fue denominada p-21 (109). Esta proteína difiere de la mayoría de las proteínas oncogénicas descritas hasta el momento con localización membranal, ya que no posee actividad de tirosina quinasa (descrita para los productos de los oncogenes src, sis, erb y fms entre otros) y puede inducir una autofosforilación en treonina y no tirosina o serina (117), siendo GTP el dador del grupo fosfato y no ATP.

La actividad de "autoquinasa" es privativa de la proteína viral pero no de la humana (117); sin embargo ambas poseen la capacidad de unir fuertemente GTP. Asimismo se demostró que la p-21 posee actividad de GTPasa y que esta actividad se encuentra fuertemente disminuída en la proteína alterada con respecto a la normal (119).

Utilizando diversos anticuerpos monoclonales el grupo de Scolnick pudo diferenciar entre las dos clases de productos del oncogene ras, es decir el Ha-Musv (virus de sarcoma murino de Harvey) y el Ki-Musv (de Kirstein) (109). A pesar

de su homología, sus productos protéicos poseen diferentes mapas peptídicos trípticos (118); por ejemplo demostraron que diversas líneas de roedores no infectados por virus sintetizan el tipo Ki-ras.

Los diversos miembros de la familia de oncogenes ras (Ha, Ki y un oncogene asociado a neuroblastoma y sin homólogo viral denominado N-ras) poseen la capacidad de transformar fibroblastos NIH3T3 en cultivo (120, 122).

El grupo de Weinberg, entre otros, demostró que una mutación convierte al protooncogene Ha-ras en un potente oncogene capaz de producir la transformación maligna. Por ejemplo una mutación (de guanina por timina en Ha-ras) produce el reemplazo de valina por glicina en la posición 12 de la proteína p-21, alterando la capacidad de la proteína de hidrolizar GTP (123). Profundos estudios acerca de p-21 fueron realizados por P. Seeberg y col.; estos autores construyeron 20 mutantes de c-Ha-ras 1 mediante técnicas de mutagénesis in vitro, cada una de las cuáles codificaba para un amino ácido diferente en la posición 12; demostraron que todos los amino ácidos excepto glicina (presente en la p-21 normal) y prolina, activan p-21 sugiriendo la necesidad de una hélice  $\alpha$  en esa región. Sin embargo el fenotipo de las células transformadas no fue similar en todos los casos (124). La capacidad de transformación del oncogene activado por mutación en la posición 12 fue confirmada por el grupo de M. Barbacid mediante el uso de tumores mamarios inducidos en ratón por N-nitrosometil urea (125).

Diversos trabajos realizados con DNA de líneas celulares han detectado ras activado por su capacidad de transformar NIH3T3; sin embargo solo un pequeño porcentaje (10% - 20 %) de muestras testeadas de cualquier tipo de tumor humano, han demostrado poseer ras activado (126). Más aún, en la mayoría de las biopsias de tumores, no se han encontrado mutaciones en la posición 12 de la p-21 (127, 128). Incluso se ha sugerido que una mutación puntual en c-Ha-ras no parecería jugar un rol relevante en el desarrollo de tumores de origen epitelial como vejiga, colon o pulmón (129).

En este sentido cabe mencionar que si la transformación maligna de un tumor ocurre por el aumento de expresión de un protooncogene normal y no por una mutación puntual, el DNA obtenido de este tipo de tumores, no tendría la capacidad de transformar NIH3T3 y el test de transfección daría negativo.

La hipótesis acerca de una activación por aumento de la expresión de un protooncogene normal es otro de los mecanismos propuestos en este sentido.

Este segundo mecanismo de activación dió lugar a la "hipótesis del dosaje", que supone que la diferencia más importante entre el c-onc normal y el transformante reside en el nivel de expresión. Se han descrito hasta el momento cuatro posibles mecanismos de sobre-expresión de protooncogenes.

**a)** El primero de éstos consiste en la mayor expresión del protooncogene debido a la adquisición de un nuevo promotor de transcripción. Por ejemplo los protooncogenes *myc* y *erbB* presentes en algunas neoplasias hematopoyéticas aviares son activados por un segmento viral conteniendo un promotor fuerte (130-132).

**b)** Un segundo mecanismo, muy poco comprendido hasta el momento, se basa en la acción de los "enhancers" que como se sabe son segmentos de DNA que poseen la capacidad de aumentar la transcripción independientemente de su orientación con respecto al gene estructural e incluso a grandes distancias (133). En un trabajo reciente, utilizando técnicas de DNA recombinante y animales transgénicos se observó que un gene híbrido compuesto por un posible enhancer del gene de insulina, unido al gene oncogénico estructural T del virus SV40 produjo tumores solamente en los islotes  $\beta$  del páncreas (134).

**c)** Un tercer mecanismo muy estudiado es la sobre expresión debida a una amplificación del dosaje génico del protooncogene u oncogene.

La amplificación génica ha sido propuesta como uno de los mecanismos por los cuáles los oncogenes celulares normales podrían desarrollar su capacidad transformante. Existen diversas evidencias acerca de la amplificación génica de c-onc en células tumorales humanas. Estudios desarrollados en líneas celulares demostraron por ejemplo que la línea promielocítica humana HL-60 posee amplifica-



do de 30 a 50 veces el proto c-myc (135). Una amplificación del c-Ki-ras ha sido reportada en líneas celulares de un tumor adrenocortical de ratón (136), de un carcinoma de colon (137), de un adenocarcinoma de pulmón de células pequeñas (137) y otros.

En carcinoma de pulmón de células pequeñas, existe una amplificación del myc del orden de 20 a 80 veces acompañado de un gran incremento de la transcripción (138). Ejemplos de amplificaciones en tumores primarios humanos son los del c-Ha-ras en carcinoma de vejiga (139), c-myb en una leucemia mieloblástica aguda (14), del c-myc en un caso de leucemia granulocítica crónica (141) varios casos del N-myc en neuro y retinoblastoma (142, 143) y muy recientemente en un caso de cáncer de ovario y en otro del urotelio del c-Ki-ras (128, 147). Aunque se desconoce hasta el momento el probable mecanismo de inducción de amplificación de oncogenes, recientemente R. Shimke sugirió que agentes que afectan la síntesis de DNA o causan daños al mismo, podrían facilitar la amplificación de genes (145). Durante los eventos iniciales de este proceso, los genes amplificados serían retenidos dentro de los cromosomas en zonas cariotípicas anormales de tinción homogénea o H.S.R.; a esto sobrevendría una excisión que genera los cromosomas diminutos o D.M.S.. Utilizando técnicas de hibridación in situ, se observó que el oncogene c-Ki-ras, que se encuentra amplificado de 30 a 60 veces en una línea tumoral adrenocortical de ratón, está localizado en las zonas de D.M.S ó H.S.R. (136).

**d)** El último mecanismo que podría conducir a una activación de un protooncogene fue el estudiado especialmente en los linfomas de Burkitt. Esta enfermedad muy frecuente en Africa, se originaría por una translocación del oncogene c-myc normalmente localizado en el cromosoma 8 (146), que se partiría en una zona cercana al extremo 5' no codificante, para translocarse a la zona del promotor de cadena pesada de IgG en el cromosoma 14, aunque se han observado también variantes de translocaciones a cadena liviana de IgG (146, 147). Como resultado de esta translocación, la expresión del c-myc se torna constitutiva, produciéndose altas

cantidades de mRNA y proteína específicas del oncogene. Durante este rearrreglo cromosómico, el extremo 5' del gene c-myc permanece en el cromosoma 8 (147). El análisis de la secuencia del gene myc demostró que éste posee tres exones y dos intrones; el primer exón que abarca 57 nucleótidos del mRNA posee codones de *terminación* en los tres marcos de lectura posibles, como fue demostrado por el grupo de C. Croce (148). Por lo tanto el producto proteico del gene c-myc permanecerá intacto toda vez que el rearrreglo cromosómico involucre al primer exón o intrón ya que la porción relevante del c-myc residiría en el extremo 3' (148).

Como hemos visto, los mecanismos mediante los cuáles un protooncogene puede ser activado son diferentes. Debe quedar claro sin embargo que la activación por alguno de éstos, no implica de ninguna manera, una mutua exclusión. Por otra parte, existen evidencias acerca de la expresión aumentada de oncogenes que no respondería a ninguno de los mecanismos previamente descritos.

#### **IV.d Transformación por medio de oncogenes**

Las evidencias obtenidas a lo largo de los últimos años indican que la carcinogénesis es el resultado de una serie de eventos independientes y progresivos. Por ejemplo, estudios morfológicos demuestran que un tumor adquiere progresivamente diversas características que transforman una anaplasia en una metaplasia y luego la neoplasia. Estos cambios fenotípicos son el resultado de la activación ó inactivación de una serie de genes.

Sin embargo el modelo molecular de la progresión tumoral que sugiere la presencia de genes múltiples activados independientemente y cooperativos, estaría en contradicción con la transformación maligna de células NIH3T3 inducida por un único oncogene como se demostró para el Ha-ras.

Esta discrepancia es solo aparente ya que por ejemplo se observó que los virus adeno y polioma que producen tumores en células de roedores en un solo paso de

infección, necesitan la activación de al menos dos funciones génicas para poder producir el tumor (149). El adenovirus humano debe expresar las regiones Ea1 y Ea2 para poder producir la transformación. Mientras que la región Ea1 conferiría la capacidad de "inmortalización" celular o del "establecimiento" del cultivo para su crecimiento indefinido, el producto de la región E1b parece conferir a los fibroblastos inmortalizados otros cambios fenotípicos asociados con la transformación como: capacidad tumorigénica, crecimiento en agar blando y activa proliferación (150).

Estos resultados contradictorios comenzaron a aclararse cuando se observó que ninguno de los oncogenes con gran capacidad de transformar células NIH3T3, consiguió transformar células de cultivos primarios (151), sugiriendo que la contradicción podía estar relacionada con el tipo de cultivo utilizado y no con el oncogene.

Uno de los trabajos más interesantes realizados al respecto fue el del grupo de R. Weinberg que comparó el efecto transformante de los oncogenes ras y myc sobre células NIH3T3 y sobre fibroblastos de embrión de rata de segunda generación. Para ello utilizaron el clon pEJ6.6, variante del c-Ha-ras 1, que codifica para una proteína de 21000 D y fue obtenido de una línea tumoral de vejiga (152). A diferencia de las NIH3T3, fibroblastos de embrión de rata de segunda generación F.E.R. (2ª) no mostraron ningún foco de transformación luego de la transfección del gene H-ras. Sin embargo los F.E.R. (3ª) obtenidos por clonado en agar de los F.E.R. (2ª) forman colonias en agar blando, demostrando que el Ha-ras les confirió la capacidad de crecimiento independiente de la adhesión a un sustrato. Sin embargo estas colonias llegan a un tamaño de 500-5000 células y mueren. Además las células F.E.R. (3ª) no fueron tumorigénicas en "nude mice", obteniéndose sólo tumores pequeños y cartilagosos (151).

Por otro lado se probó el efecto del oncogene myc observándose que éste por sí solo no poseía ningún efecto sobre la transformación maligna, resultado por otra parte esperado, ya que como mencioné previamente la capacidad de transforma-

ción del myc está dada por la inserción de un promotor fuerte en su extremo 5' no codificante (148).

Sin embargo, la introducción simultánea de los genes myc y ras produjo una alteración dramática en el fenotipo celular con la aparición de múltiples focos de transformación. Las células transformadas por ambos oncogenes tuvieron capacidad tumorigénica ya que produjeron tumores de 1 cm a las dos semanas, aunque sin llegar a los 3 cm de tamaño tumoral o llevar a la muerte del animal, que es lo que producen las NIH3T3 portadoras del gene Ha-ras mutado. Es decir que a pesar de que la presencia simultánea de los genes myc y ras produjo una transformación maligna, ésta no fue total. De aquí se deduce que existen otros pasos independientes de los genes ras y myc que tienen que ver con el establecimiento e inmortalización in vitro. Weinberg y col. demostraron además que el oncogene N-ras así como el antígeno T medio del virus polioma podían cumplir funciones similares a las del Ha-ras así como el antígeno T-grande pertenecería al grupo de genes relacionados al myc (151).

Al mismo tiempo H.E. Ruley demostró que la región E1A de adenovirus provee funciones requeridas por los genes T-medio y Ha-ras para poder transformar células primarias de riñón de rata (153).

En un trabajo posterior se demostró que el gene que codifica para la p53 (obtenido de un linfoma murino de células B infectado por virus de Abelson) al cual se le colocó un LTR, cooperó con el gene ras en la transformación de fibroblastos primarios de rata. Estos focos de transformación fueron altamente tumorigénicas. El LTR-p53 por sí mismo no tuvo ningún efecto (157).

Los resultados descriptos permiten afirmar lo siguiente:

• los mecanismos de transformación maligna inducidos por los diversos oncogenes deben ser necesariamente diferentes, debido a que en ciertos casos la cotransfección de dos de ellos origina un fenotipo no observable por medio de la transfección de cada uno por separado.

**b** de ello se desprende que el blanco de acción de los productos oncogénicos dentro de la célula, también debe ser diferente.

Por lo tanto se puede concluir que existen ciertos oncogenes y DNA virales que *pueden ser separados en dos grupos complementarios, funcionalmente distintos, de tal forma que la cotransfección de un miembro de cada grupo en cultivos primarios debería dar origen a una transformación similar a la observada para el myc y el ras.* El grupo A que incluye a los oncogenes myc, T grande, E1a y p-53 estaría relacionado con los procesos de establecimiento de una línea y su inmortalización y sus productos proteicos estarían localizados en el núcleo; el grupo B que incluye al Ha-ras, Ki-ras, N-ras y T-medio estaría relacionado con los otros aspectos del fenotipo maligno y sus proteínas tendrían localización citoplasmática o membranaral.

La posible regulación extracelular de estos oncogenes estaría dada por un tercer grupo de oncogenes que tendrían amplia homología con los receptores de factores de crecimiento.

#### **IV.e Relación entre factores de crecimiento, oncogenes y proliferación de células stem**

La proliferación de células stem se encuentra bajo el control normal de factores exógenos que regulan la entrada de las células en ciclo. En ausencia de estos factores, las células quedan detenidas en G<sub>0</sub>. Las células transformadas tienen como característica principal su autonomía del efecto de estos factores de crecimiento. Esta autonomía se debe a una expresión constitutiva de alguno de los elementos que regulan el efecto mitogénico normal del factor de crecimiento y puede ocurrir a nivel del factor de crecimiento mismo, del receptor de membrana de di-

cho factor o de la señal que lleva al comienzo de la división celular. Genes que codifiquen para algunos de estos componentes podrían poseer la capacidad transformante de oncogenes activos, si fueran alterados por mutaciones o expresión inapropiada.

La expresión constitutiva de dichos factores en células que normalmente son el blanco de éstos, podría llevar a un mecanismo de autoestimulación de la neoplasia denominado "crecimiento autocrino" (156, 157). Cuando el factor de crecimiento se une a receptores de células de las cuáles ha sido previamente secretado, se activa un mecanismo de respuesta automitogénica. Este tipo de crecimiento autocrino es obviamente una distorsión del concepto normal de regulación endócrina según el cuál el factor o hormona es sintetizado a cierta distancia del tejido blanco.

Estudios recientes de Seifert y col. demostraron que células en cultivo de músculo liso poseen la capacidad de secretar una sustancia homóloga a PDGF que posee capacidad mitogénica en células 3T3. Debido a que las células musculares lisas son a la vez blanco de la acción de PDGF, estaríamos ante un ejemplo de regulación autócrina normal (158). Un trabajo reciente demuestra que la placenta humana del tercer trimestre posee una alta expresión del gene sis que codifica para la cadena B del PDGF; más aún, explantos de placenta secretan PDGF al medio. El hecho de que trofoblastos en cultivo poseen un alto número de receptores para PDGF y responden a PDGF exógeno indicaría que la placenta humana representa otro caso de regulación autócrina normal (159).

Por lo visto hasta el momento es evidente que la regulación de la proliferación debe ser producto de la interacción de factores de crecimiento y posiblemente oncogenes. El mecanismo de transmisión de la señal del factor de crecimiento todavía permanece desconocido aunque trabajos muy recientes tienden a asignar al gene c-myc esa función; se observó que el agregado de PDGF a células BALB/C3T3 en estado estacionario indujo un aumento en la expresión del mRNA del c-myc (160).

Un trabajo muy reciente demostró una relación entre factores de crecimiento séricos y los protooncogenes c-myc y c-Ki-ras. La estimulación del crecimiento de células A31 (fibroblastos inmortalizados, no tumorigénicos) quiescentes por medio de factores de crecimiento séricos, produjo un aumento de 20 veces en la expresión del c-myc. BPA31 y DA31, derivados tumorigénicos de A31, poseen expresión constitutiva del c-myc en células quiescentes ó en crecimiento. Por otro lado en las mismas condiciones existe un aumento de 5 a 7 veces en la expresión de C-Ki-ras en presencia de suero conteniendo los factores de crecimiento, tanto en las células A31 como en la BPA31 (161).

Goustin y col. demostraron que trofoblastos en cultivo responden al efecto exógeno de PDGF aumentando la expresión del mRNA c-myc en casi 10 veces y en 24 horas, casi el 100 por ciento de las células entran en ciclo (159).

El hecho de que la expresión del c-myc está regulada también por la presencia de otros factores exógenos como vitamina D en células HL-60, sugiere que la expresión de estos c-onc está sujeta a un balance dentro del microambiente que rodea a una célula proliferante (162).

Las evidencias de que un retrovirus oncogénico puede codificar para un factor de crecimiento surgió de diversos estudios donde se compararon las secuencias de amino ácidos de factores de crecimiento y oncogenes. Se demostró que los 109 aminoácidos N-terminales del PDGF son casi idénticos a una secuencia de la cadena B de la proteína p-28 del oncogene sis (163).

Estudios muy recientes han demostrado que existe una gran homología entre el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la proteína gp 65 erb B, la proteína transformante del virus de la eritroblastosis aviaria. Esta homología ocurre con la parte del gene del receptor de EGF que codifica para el dominio interno y transmembranal del receptor pero no para la zona externa de unión del factor de crecimiento (164).

Existen evidencias acerca de la interacción de EGF con otros factores de crecimiento sobre los receptores de EGF, que como hemos dicho previamente sería

producto putativo del oncogene erb-B. Se encontró que células transformadas por el virus del sarcoma murino de Moloney no poseen sitios libres de unión de EGF debido al bloqueo de los mismos por factores de crecimiento de secreción autocrina (165). Este efecto parece estar dado no solo por la presencia de factores de crecimiento transformantes de tipo TGF $\alpha$  que poseen alrededor de un 40% de homología con EGF, sino por la de otros factores de tipo  $\beta$  (TGF $\beta$ ) que en combinación con TGF $\alpha$  ó con EGF inducirían una transformación fenotípica y posiblemente actuarían como inductores de los receptores de EGF (166).

La homología entre el receptor de EGF y el oncogene erb-B o PDGF y sis sugiere que amplificaciones o rearrreglos cromosómicos de estos genes que lleven a una expresión alterada, podrían estar envueltos en los procesos oncogénicos de ciertas neoplasias. Se observó que la expresión del gene humano normal que codifica para la secuencia sis/PDGF-2 en células NIH3T3 (que normalmente no lo expresan), produce una transformación de dichas células (167). Liberman y col. reportaron que una proporción significativa de glioblastomas primarios humanos mostraron un elevado nivel del receptor de EGF y cuatro de esos tumores poseían el gene EGFR amplificado (168). Filmus y col. demostraron una amplificación y rearrreglo cromosómico del EGFR en una línea de astrocitoma (169); recientemente se ha podido detectar amplificación de un gene homólogo del erb-B en líneas de carcinomas mamarios humanos y de las glándulas salivales, las amplificaciones observados variaron entre 5 y 10 veces (170); otros autores mostraron amplificaciones de hasta 30 veces de EGFR en carcinomas de células escamosas (171). Por otra parte resultan significativos los altos valores de EGFR encontrados por un lado en carcinomas mamarios humanos (172) y por otro lado en tumores de cerebro (168).

La mayor parte de los trabajos muestran un efecto mitogénico de EGF sobre líneas celulares en cultivo. Sin embargo se observó que líneas que poseen altos niveles de EGFR son paradójicamente inhibidas por EGF a las mismas concentraciones a las que induce proliferación en otras líneas (173). Kawamoto y col. propusie-



ron que existiría un límite en el número de receptores para el que EGF tendría actividad mitogénica; por encima de este límite el EGF tendría un efecto inhibitorio (174).

Como se pudo observar, la gran mayoría de los trabajos de este tipo se realizaron sobre líneas celulares inmortalizadas y seguramente muy homogéneas en su respuesta al efecto de los factores de crecimiento. Este, por supuesto, no es el caso de las neoplasias humanas, donde existe una gran heterogeneidad de respuesta a estos factores. Mientras que las células stem de la neoplasia podrían entrar en división por efecto del mitógeno, las células diferenciadas terminales no deberían hacerlo, incluso en las condiciones óptimas de estimulación. Un ejemplo de esta heterogeneidad se observó en un trabajo muy reciente; usando EGF marcado los autores demostraron que la epidermis de rata normal muestra una expresión heterogénea de EGFR, siendo la unión del ligando mucho más fuerte en las células basales responsables de la renovación epidérmica (175). En vista de estos resultados, es evidente la necesidad de profundizar en este tipo de técnicas que permitan observar la expresión de diversos factores en función de la heterogeneidad celular.

#### **IV.f. Expresión de Oncogenes: Correlación con el modelo de célula stem**

Como se ha mencionado previamente el modelo de célula stem postula dos alternativas para la misma: por un lado la célula stem puede estar quiescente o proliferar, en función de los mecanismos de regulación de la entrada en el ciclo celular; por otra parte, la célula stem proliferante puede autorrenovarse dando origen a dos células stem o entrar en un proceso de diferenciación con pérdida de la capacidad proliferativa.

La transformación maligna utilizando células inmortalizadas como recipientes requiere solamente un oncogene activo como se ha visto con las NIH3T3; sin em-

bargo la transformación de células derivadas de un tejido normal, requiere además un oncogene de tipo A que les confiera a estas células la capacidad de inmortalización. Se ha postulado que la diferencia más importante entre el tejido normal y su contraparte tumoral es, que en esta última la subpoblación de células stem se encuentra en expansión incontrolable debido a algún tipo de evento cancerígeno que es heredado por las células descendientes. Este evento induciría un aumento del P.A.R. de tal forma que la mayor parte de las células stem entrarían en un proceso de autorrenovación acercándose más a las características de una línea en cultivo donde el P.A.R. es cercano a uno. Esta falta de regulación de la capacidad de autorrenovación podría ser explicada en los términos del modelo, por una falta de regulación de los genes involucrados en los procesos de proliferación y/o diferenciación celular.

A pesar de que la mayoría de las líneas celulares no poseen la capacidad de diferenciarse, existen algunos ejemplos donde es posible inducir diferenciación *in vitro* y estudiar la variación en la expresión de oncogenes en función de ello. Se ha observado un descenso en los niveles de expresión del oncogene *c-myb* durante la diferenciación a monocitos y macrófagos de una línea humana de leucemia mieloblástica. Estudios en la línea HL60 demostraron que la diferenciación de dicha línea inducida por ácido retinoico, vitamina D o dimetil sulfóxido, esta acompañada por una declinación en los niveles de expresión del oncogene *myc* (162,177). Un proceso similar se observó con la línea de teratocarcinoma F9 (161). Resulta interesante mencionar que la diferenciación de F9 en cultivo también puede ser inducida mediante la transferencia del oncogene *c-fos* (178). Resultados coincidentes fueron obtenidos por T. Gonda y D. Wetcalf quienes demostraron un descenso en los niveles de expresión de los genes *c-myb* y *c-myc* y un aumento en la expresión del *c-fos* luego de la inducción de la diferenciación de una línea de leucemia mieloides murino (179).

De las evidencias hasta aquí presentadas surge que habría una serie de oncogenes o protooncogenes que estarían involucrados en los procesos de diferenciación

y proliferación celular. Es importante recalcar que el producto proteico de los genes c-myc, c-myb y c-fos está localizado en el núcleo, e incluso se ha propuesto que el producto del c-myc, p-58, se une al DNA. Sea cual fuere el mecanismo definitivo por el cuál un protooncogene regula los procesos de diferenciación celular, los resultados antes mencionados estarían indicando que los oncogenes del grupo A estarían involucrados en los mecanismos por los cuáles las células stem podrían autorrenovarse o entrar en un proceso de diferenciación.

## **V. Objetivos de la investigación**

Como hemos visto a lo largo de esta introducción, el comportamiento biológico de los tumores (especialmente los sólidos) resulta muy difícil de estudiar, debido a que los procesos de división celular y diferenciación ocurren simultáneamente dando origen a una considerable heterogeneidad celular. Esta situación es aún más compleja en tumores como el cáncer de mama donde las influencias hormonales podrían estar jugando un rol importante, como fue sugerido por trabajos previos.

Los estudios acerca de la capacidad de replicación, la dependencia hormonal o la estadificación por grados de diferenciación han demostrado ser de cierta utilidad para predecir el curso de la enfermedad y para la adopción de la terapéutica apropiada en cáncer de mama. Como mencioné previamente el índice de marcación con timidina está asociado con tumores mas agresivos, mientras que la presencia de receptores estrogénicos correlaciona en mayor medida con una respuesta a la terapia hormonal. Recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que la expresión aumentada del antígeno carcinoembrionario (CEA) a nivel celular, está asociada con el grado de diferenciación tumoral.

Sin embargo se desconoce hasta el momento que células dentro del tumor son las que expresan las diferentes características mencionadas previamente y la posible relación entre dichas poblaciones celulares.

El objetivo inicial de este trabajo fue tratar de demostrar la posible existencia de diferentes subpoblaciones celulares en cáncer de mama, tratando de centralizar esta caracterización en la expresión de diferentes propiedades celulares, cada una de las cuáles estaría reflejando un diferente estadio funcional de las células tumorales. Se midieron parámetros de proliferación (captación de timidina), diferenciación (expresión de CEA, receptores estrógenicos, etc.) y físicos (tamaño nuclear y densidad celular), en muestras de cortes de tejido tumoral y en suspensiones celulares obtenidas luego de una disgregación enzimática y separadas por gradientes isopícnicos.

La relevancia del estudio biológico acerca de la heterogeneidad celular en cáncer de mama posee implicancias terapéuticas muy importantes. Como mencioné previamente, la presencia de receptores estrógenicos en un tumor implica que dicho paciente será tratado con un tratamiento hormonal. Estudios previos demostraron que la expresión de receptores es muy heterogénea, con células que expresan receptores y otras que no lo hacen. Por otro lado en un sistema de renovación constante y el tumor maligno lo es, su crecimiento es función de las células stem por lo que cualquier tipo de terapia debe tener como objetivo final la muerte de las mismas.

Por lo tanto, resulta de fundamental importancia verificar la presencia de células stem en cáncer de mama y especialmente si las mismas poseen receptores hormonales, o si dichos receptores están presentes solamente en las células diferenciadas.

En efecto, mientras en el primer caso la terapia hormonal atacaría también a las células stem, en el segundo caso lo haría solo sobre células diferenciadas, sin ningún tipo de efecto sobre las primeras.

En relación directa con este tema se intentó también estudiar el efecto de los estrógenos sobre la proliferación de carcinomas primarios de mama en estudios in vitro. Como mencioné previamente la mayor parte de los estudios acerca de este tema se realizaron en líneas celulares ó en modelos experimentales en "ratones desnudos", habiéndose obtenido resultados contradictorios con trabajos que proponen un efecto directo, mientras otros sostienen que el efecto estrogénico estaría mediado por un factor presente en el suero.

El objetivo de esta parte de la tesis fue también estudiar si el efecto estrogénico estaría mediado por su interacción con los receptores específicos y finalmente que características distintivas poseen las células que pudieran ser afectadas por el efecto hormonal.

Hemos visto a lo largo de la introducción la importancia que ha adquirido el estudio de los oncogenes en la comprensión de la biología del cáncer. Es por eso que decidimos estudiar la expresión de los oncogenes myc y ras en tumores primarios de mama ya que existen pocas evidencias al respecto. Se intentó un estudio acerca de la correlación entre la expresión de estos oncogenes con otros parámetros de diferenciación y proliferación previamente mencionados y especialmente intentamos verificar si existe alguna subpoblación celular en particular que los esté expresando.

## MATERIALES Y METODOS

### I. Obtención del Material

El tejido tumoral mamario humano estudiado fue obtenido a partir de biopsias o mastectomías. El tumor fue dividido en varios fragmentos para las diferentes determinaciones (índice de captación de timidina, receptores estrogénicos, etc).

Se seleccionaron todos aquellos pacientes que no hubieran sido previamente tratados con radioterapia. Todos los tumores fueron adenocarcinomas mamarios y su diagnóstico se realizó por congelación en forma previa al comienzo del experimento.

### II. Morfología

La clasificación histológica de los tumores se realizó siguiendo a Van Bogaert y Maldague (180) y la gradación tumoral se hizo sobre los mismos cortes siguiendo el criterio de Bloom y Richardson (181). Los parámetros que se consideran para ello son: 1. formación tubular; 2. número de mitosis; 3. irregularidad del tamaño, forma y tinción nuclear.

La suma de estos tres parámetros da un puntaje que divide a los tumores en tres grupos: **A.** bajo grado de malignidad o Grado I; **B.** moderado grado de malignidad o Grado II; **C.** alto grado de malignidad o Grado III.

### **III. Determinación de la expresión del antígeno carcinoembrionario por inmunohistoquímica**

#### **III.a. En cortes de parafina**

Se llevó a cabo de acuerdo al método de Sternberger y col (182, 183) con modificaciones propias (184). Cortes por micrótomos de 5 $\mu$  de tumores incluidos en parafina fueron montados sobre portaobjetos previamente gelatinizados para evitar su posterior desprendimiento. Luego de dos pasajes por xileno de 15 minutos cada uno para disolver la parafina, las muestras fueron sumergidas durante 30 minutos en 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disuelto en metanol absoluto con el objeto de bloquear y eliminar la peroxidasa endógena. Para prevenir adsorciones inespecíficas se incubó en albúmina de huevo al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar con una solución de 0.1 M Tris-HCl pH 7,4 se colocó en suero de cerdo normal al 2% durante 40 minutos. Sin lavar, se dejó escurrir y se agregó sobre el corte de tejido una gota del antisuero de conejo anti antígeno carcinoembrionario (CEA) a una dilución de 1:250 (considerada óptima luego de haber realizado diferentes diluciones del antisuero) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, los cortes fueron incubados durante 30 minutos con IgG de cerdo anti- IgG de conejo a una dilución de 1:50, seguido de lavados con PBS. El último paso del triple puente fue el agregado de IgG de conejo complejadas con peroxidasa a una dilución de 1:250 durante 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo incubando los cortes en buffer Tris-HCl en presencia de 0.03% diamino benzidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 8-10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. El DAB oxidado produce un precipitado de color marrón que es totalmente resistente a los posteriores lavados.

### III.b En cortes por congelación

Los fragmentos de los diferentes tumores fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estando ya congelados fueron incluidos en O.C.T. a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Utilizando el micrótomo apropiado se realizaron cortes de  $5\mu$  que fueron depositados sobre portaobjetos gelatinizados. Luego de dejar secar con el objeto de permitir una mayor adherencia, los cortes fueron tratados con metanol para eliminar la peroxidasa endógena. El resto del tratamiento fue similar al descrito anteriormente para los cortes por parafina.

El control positivo para la detección de CEA fue el cáncer de colon que es un tumor rico en dicho antígeno; los controles negativos fueron los siguientes: 1. se sustituyó el suero de conejo anti-CEA por suero normal de conejo o por PBS; 2. se realizó la técnica de inmunoperoxidasa en sarcomas y linfomas de Hodgkin. La técnica se consideró satisfactoria cuando no se observaron tinciones utilizando los controles negativos previamente descritos.

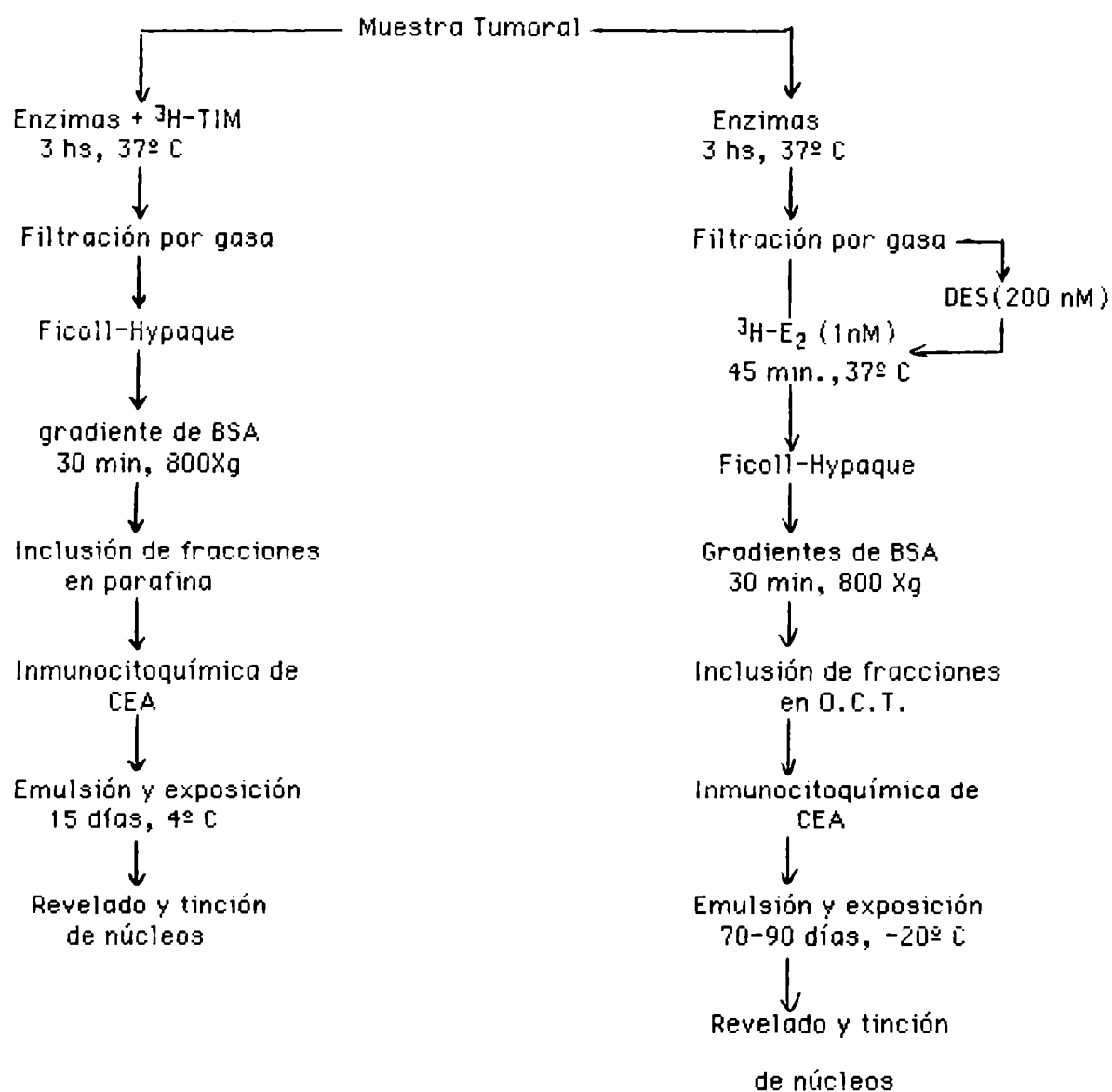
La tinción positiva se expresó en porcentaje de células positivas o en cruces, considerando la cantidad de células que contenían gránulos de CEA independientemente de la intensidad de la tinción. El valor obtenido es el promedio de 10 campos a una magnificación de  $400\times$  (aproximadamente 200 células por campo). La determinación de CEA se realizó en todos los casos en forma previa a la aplicación de la emulsión fotográfica.



#### IV. Disociación enzimática de los carcinomas mamarios

##### IV.a. Tumores primarios

Una representación esquemática del procedimiento que describiré a continuación se presenta en la figura 4.



**Figura 4.** *Representación esquemática de la disociación de tumores primarios para la obtención de suspensiones celulares. La determinación de CEA, TLI y RE se realizó como se describe en Métodos*

Se seleccionaron aquellos casos con un peso de tumor limpio mayor de 2,5 gramos con la idea de poder obtener la mayor cantidad posible de células.

Inmediatamente de obtenida la pieza tumoral se procedió a su separación del tejido normal adyacente, piel y grasa. Se cortó en pequeños fragmentos manteniendo el material en MEM (Medio Esencial Mínimo de Eagle). Se trabajó en esterilidad en campana de flujo laminar. El tumor se disgregó por medio de métodos enzimáticos:

por cada gramo de tumor se agregaron 3 ml de MEM (con el agregado de 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina) conteniendo:

1 mg/ml de colagenasa y hialuronidasa, 0,1 mg/ml de elastasa y 0,02% de DNAsa, además de 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, el cual fue tratado previamente durante una noche con el precipitado de un volúmen equivalente de una solución de Dextran-Coated Charcoal (0,25g% NoritA, 0,0025 g% Dextran grado C, en 0,01 Tns-HCl pH8,0) (185).

#### **IV.b. Ganglios con metástasis**

Los ganglios se obtuvieron de piezas frescas luego de la mastectomía. Fueron recolectados en esterilidad en MEM. Luego de limpiar de material adyacente no ganglionar, se cortó en pequeños fragmentos. Por cada gramo de la metástasis se agregaron 3 ml de MEM conteniendo 10% de FBS (tratado con DCC) en presencia de 3mg/ml de colagenasa y 0.02% de DNAsa y 5 $\mu$ Ci/ml de (3H)-tim. Al término de la incubación las células fueron tratadas en forma similar a la que se describe más adelante para los tumores primarios.

## **V. Índice de marcación con timidina**

### **V.a. Tumores primarios sin disgregar**

Se incubaron 6 a 12 fragmentos de tumor de un área periférica de aproximadamente 1mm de lado durante 4 hs en presencia de 2 $\mu$ Ci/ml de metil ( $^3$ H) - timidina (A.E. = 20 Ci/mmol) en presencia de 10% de suero fetal bovino inactivado por calor de acuerdo a métodos ya establecidos (186). Al término de la reacción, se lavó varias veces con PBS y se fijó en formaldehído al 4%. La inclusión en parafina, la emulsión y el revelado se realizaron como se describe más adelante para los tumores que fueron disgregados. Luego del revelado se contaron como positivas aquellas células con 5 o más granos sobre el núcleo, con un background de 0 a 1 grano por área similar al área nuclear.

### **V.b. Tumores disgregados**

Se agregaron a la muestra durante el transcurso de la disgregación enzimática 3 $\mu$ l/ml de ( $^3$ H) - tim sin diluir con timidina no tritiada. Al finalizar las 3 hs de incubación, se filtró la suspensión a través de 10 capas de gasa estéril, se dejó 30 minutos en una cápsula de plástico y se sembró en un gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad aproximada 1,085g/ml) para purificar las células epiteliales y concentrar la muestra.

Las células epiteliales se acomodan en la interfase, de la cual fueron recogidas con pipeta Pasteur. Normalmente, para separar células epiteliales se utilizan gradientes de Ficoll-Hypaque a una densidad final de 1,077 g/ml (187,188). En este trabajo fue necesario modificar esa densidad para evitar la pérdida de células epiteliales viables que poseen densidades mayores a 1,077 g/ml. Utilizando estos gradientes conseguí eliminar totalmente las células no viables (por exclu-

sión de azul tripán), los eritrocitos y parte de los linfocitos. El resto de linfocitos que permanecen contaminando la interfase de células epiteliales es fácil de identificar bajo microscopía óptica.

Luego de centrifugar a 2.000 rpm durante 30 minutos se separó la interfase, se dejó decantar la muestra a 1 xg, se reemplazó el sobrenadante con PBS dos veces y se sembró en el gradiente de densidad de albúmina. Cuando fue necesario, la suspensión celular se concentró por medio de vacío a través de filtros Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ . ) para llevar a un volumen de siembra de 1,0-1,2 ml. Luego de la centrifugación en gradiente de albúmina se obtuvieron 12 fracciones que fueron a su vez centrifugadas y lavadas dos veces con PBS siendo el precipitado final fijado con alcohol 96% y posteriormente incluido en parafina. Cortes por micrótomos de no más de 5 $\mu$  fueron montados sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Se realizó la determinación de CEA y luego se emulsionaron los portaobjetos en cuarto oscuro con emulsión líquida Kodak NTB 2 diluída 1:1 con H<sub>2</sub>O y 1% de glicerol. Luego de 14 días de exposición en la oscuridad a 4°C, la emulsión fue revelada con revelador Kodak D19 durante 2 minutos, seguida de un pasaje por 1% de ácido acético y 10 minutos en fijador; luego se tiñó con hematoxilina de Harris durante 10 segundos para evidenciar los núcleos. Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio Zeiss Standard a 1000 X y para determinar el T.L.I se contaron entre 300 y 600 células. Células positivas fueron aquellas con 5 o más granos sobre el núcleo, con un background de no más de 1 por área similar. También se procedió al conteo de células positivas para CEA.

## **VI. Sedimentación por equilibrio de densidades**

Se utilizaron gradientes discontinuos de BSA (albúmina sérica bovina) (189). Se preparó una solución madre de 50g BSA/100 ml PBS y su densidad se determinó pesando un volumen de 1 ml (densidad= 1,092 - 1,099 g/ml. ). Las demás diluciones fueron calculadas. Once fracciones de 1 ml cada una fueron sembradas en forma manual y sobre ellas la suspensión celular. Luego de centrifugar a 1000 xg durante 30 minutos las células se acomodaron en la interfase entre cada fracción. Se recogieron doce fracciones de 1 ml con pipeta Pasteur y el precipitado correspondió a la fracción 12.

Tomando como 100% el número de células epiteliales viables obtenidas de la interfase del gradiente de Ficoll-Hypaque, la recuperación de células luego del gradiente de BSA varió entre 70% y 80% .

## **VII. Determinación de receptores estrogénicos**

### **VII.a. Medición del contenido total de receptores estrogénicos**

El contenido de receptores estrogénicos fue ensayado según el método del Dextran Coated Charcoal de la siguiente manera (50). La muestra tumoral fue recogida en buffer TED (10mM Tris hidroximetil amino metano, 1,5mM EDTA y 0,5 mM DTT, pH 7,4 a 4°C) en hielo seco e inmediatamente congelada en nitrógeno líquido ó a -70°C. En un lapso no mayor de dos semanas se procedió a la determinación de receptores; luego del descongelamiento, el tumor fue limpiado de material adyacente no tumoral, cortado en pequeños fragmentos, pulverizado con una pistola automática y homogenizado en no menos de 2 ml de buffer TED inmerso en hielo en un polytron. El homogenado fue luego centrifugado a 100.000 xg durante 60 minu-

tos a 4°C y luego de remover con papel tissue la capa de grasa de la superficie, se recogió el citosol por medio de aspiración. Luego de la medición de proteínas por el método de Lowry (190) la concentración proteica del citosol se ajustó a 2 mg/ml. Se incubaron 150 µl del citosol durante toda una noche en hielo, en presencia de una concentración final de 1mM de 5,6,7,16,17 (<sup>3</sup>H)-17β estradiol (actividad específica: (101 Ci/mmol) obtenido de New England Nuclear, Boston, Massachusetts). Para determinar la unión inespecífica se incubaron paralelamente 150 µl de citosol en presencia de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> a la concentración final antes mencionada y un exceso de 1000 veces de dietil etilbestrol (DES) agregado con 30 minutos de antelación al (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub>. Al término de la incubación, se removió la hormona no unida mediante la adición de 500µl de una suspensión de dextran-charcoal, (dextran, 2,5mg y carbón activado 250 mg en 100ml de buffer Tris-HCl, 10mM, pH 8,0). Se dejó durante 30 minutos a 4°C en agitación constante; se centrifugó a 13.000 xg a 4°C. El conteo radioactivo se realizó transfiriendo el sobrenadante al líquido de centelleo. Luego de extraído el blanco, la unión específica se determinó sustrayendo del total de cpm, el valor obtenido en presencia de DES. En estas condiciones se consideran valores positivos, aquellos con más de 10 f moles/mg de proteína citosólica.

#### **VII.b. Determinación en suspensión celular por autorradiografía**

La determinación de receptores estrogénicos fue llevada a cabo a través de una modificación del método desarrollado por Buell y Tremblay para fragmentos de tejidos (191). En los casos que se mencionan las muestras tumorales fueron divididas en dos alícuotas, una de ellas con el doble de material de la otra, siendo ambas digeridas enzimáticamente como se detalló (Fig.4). Al término del período de incubación con las enzimas, las alícuotas fueron filtradas y

concentradas por vacío como se describió previamente. La incorporación total de ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  se determinó incubando una alícuota de células en presencia de  $1\text{nM}$  de ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 minutos con agitación leve. La unión inespecífica del ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  se determinó incubando en forma paralela la otra parte de la suspensión celular con un exceso de 100 veces de DES adicionado 30 minutos antes del ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  como se describió. Al término de los 45 minutos de incubación ambas muestras fueron dejadas en cápsulas de plástico, purificadas a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque, lavadas con PBS y sembradas manualmente sobre un gradiente de seroalbúmina. Al término del gradiente de isodensidad las fracciones fueron separadas e incubadas durante 3 hs a  $37^\circ\text{C}$  con agitación leve y fueron dejadas durante toda una noche a  $4^\circ\text{C}$ . Al día siguiente, las diferentes fracciones fueron centrifugadas a baja velocidad, luego lavadas dos veces con PBS e incluídas en O.C.T a  $-30^\circ\text{C}$ . El O.C.T es un material sintético que posee la particularidad de ser líquido a temperatura ambiente y sólido a bajas temperaturas. Se utilizó para evitar la desnaturalización de proteínas que produce la inclusión en parafina. De cada taco se obtuvieron cortes por congelación de  $5\ \mu\text{m}$  de espesor que fueron montados sobre portaobjetos cubiertos con gelatina. Esto fue seguido de una fijación y deshidratación de los cortes a través de concentraciones crecientes de 30%, 50%, 75%, 95% y 99% etanol disuelto en solución fisiológica (3 minutos cada una) y xilol, con el objeto de evitar bruscas alteraciones estructurales en los receptores que provocaran la liberación del  $^3\text{H}-\text{E}_2$  unido (193), para luego ser dejados a  $-30^\circ\text{C}$  durante 1 o 2 días como máximo. Para la visualización del ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  unido a su receptor, los cortes fueron rehidratados a través de similares concentraciones decrecientes de etanol, con la diferencia que se realizaron varios lavados con 99% de etanol para eliminar posibles restos de ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  libre. Luego de este paso, se realizó la técnica para la detección de CEA por inmunoperoxidasa, seguido del emulsionado para autorradiografía y un tiempo de exposición de 70-80 días a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **VII.c. Determinación en fragmentos de tumores por autorradiografía**

Se determinó según el método de Buell y Tremblay con variantes propias. Para determinar la incorporación de ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  se preincubaron 3-5 fragmentos de menos de 1 mm de lado en 5 ml de MEM + 10% FBS inactivado por calor y tratado con carbón activado. Luego de preincubar durante 30 minutos a 37° C se agregó ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  a una concentración final de 1 nM y se incubó durante 45 minutos adicionales a 37° C. Este tiempo resulta suficiente para translocar al núcleo la mayor parte de los receptores (192). La marca inespecífica se determinó agregando desde el comienzo de la preincubación un exceso de 100 veces de DES. Al término de los 45 minutos de incubación ambas muestras fueron transferidas a una solución de 3,5 % de albúmina durante 4 horas. Luego se hicieron cortes por congelación y se fijó en concentraciones sucesivas de alcohol y xilol.

Se realizó la determinación de CEA y luego se cubrió con emulsión fotográfica. Se dejó 80 días en exposición, se reveló, se tiñó con Hematoxilina de Harris y se procedió al conteo de granos y de células CEA positivas.

### **VII.d. Determinación en útero de ratón**

Ratones BALB-c de 7-8 semanas de edad fueron utilizados para estos experimentos. Cada animal fue muerto por dislocación cervical y luego se extrajo su útero. Cada uno de los úteros fueron cortados en fragmentos de aproximadamente 2-3 mm de largo y recogidos en MEM. Luego de realizar la incubación con ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  solo ó con ( $^3\text{H}$ )- $\text{E}_2$  + DES los fragmentos permanecieron 3 horas a 37° C con BSA en agitación (75). A su término fueron fijados de diferentes formas e incluídos en O.C.T. o en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 $\mu$  sobre portas gelatinizados y luego de realizar la determinación de CEA se emulsionó y se reveló aproximadamente a los 35 días.



#### **VII.e. Conteo de granos: especificidad**

Con el objeto de obtener la cantidad de incorporación específica de  $^3\text{H-E}_2$ , se calculó el promedio de granos obtenido de 150-200 células incubadas con  $^3\text{H-E}_2 + \text{DES}$ . Luego se contaron 150-200 células de la incubación con  $^3\text{H-E}_2$  solo. Se consideró positiva para RE a toda aquella célula con un número de granos por lo menos tres veces mayor que el promedio obtenido luego de la incubación con  $^3\text{H-E}_2 + \text{DES}$ . Cada fracción o tumor incubados con  $^3\text{H-E}_2$  solo, tuvo como control de incorporación inespecífica a esa misma fracción o tumor incubada con  $^3\text{H-E}_2 + \text{DES}$ .

#### **VIII. Ensayos histoquímicos**

Para la tinción de mucinas ácidas se utilizó el método clásico de Alcian Blue al 2,5% desarrollado por Lev y Spicer (194). Este método tiñe de azul intenso las mucosustancias de tipo ácido con grupos hialurónicos, siálicos y sulfatados débiles. Los núcleos fueron contrastados con Kernechtrot. El método de Taft con modificaciones propias fue usado para la tinción de ácidos nucleicos con verde metilo pironina. El verde metilo tiñe de azul verdoso el DNA (núcleo) y la pironina tiñe de rosa intenso el RNA (citoplasma). Los cambios introducidos fueron elevar la cantidad de pironina a 0,5 mg. y diluir ambos componentes en buffer acetato pH 4,0 (194). Ambas determinaciones se hicieron con posterioridad al revelado.

## **IX. Medición del efecto estrogénico sobre el índice de proliferación tumoral**

Fragmentos obtenidos de la periferia de cada tumor fueron incubados en 2 ml de MEM conteniendo 10% de FBS (depletado de esteroides como se describió con anterioridad). Este medio de incubación contenía  $2\mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H-tim}$  ( $50\text{--}80\text{ Ci/m mol}$ ) y se realizaron incubaciones paralelas con concentraciones diferentes de Estradiol ( $10^{-7}\text{ M}$ ,  $10^{-8}\text{ M}$ ,  $10^{-9}\text{ M}$ ). En un número determinado de casos, se incubó en presencia de Estradiol más un exceso de 200 veces de alguno de los siguientes agonistas o antagonistas estrogénicos: Dietil etilbestrol, tamoxifeno (TAM) o nafoxidina (NAF). Se realizaron incubaciones de 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  con una leve agitación durante el transcurso de la misma. A su término los fragmentos fueron lavados con PBS frío durante 45 minutos con tres cambios. La detección de  $^3\text{H-tim}$  incorporada al DNA por autorradiografía y de CEA o ras p-21 por inmunoperoxidasa se realizó como se describe, luego de fijar con 4% de p-formaldehído en buffer PBS y su posterior inclusión en parafina.

## **X. Determinación de la expresión de la proteína ras p-21**

La determinación se realizó por técnicas de inmunoperoxidasa. Cortes de  $5\mu$  de espesor fueron obtenidos a partir de tumores fijados con p-formaldehído e incluidos en parafina. Los cortes fueron desparafinizados en presencia de xilol (2 x 15' cada uno), luego expuestos durante 30 minutos a 0,5 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en metanol para eliminar la peroxidasa endógena como se describió para el CEA. Luego de la hidratación, el corte fue incubado con suero normal de conejo al 2 % durante 50 minutos a temperatura ambiente con el objeto de bloquear la unión inespecífica del 2º antisuero; esto fue seguido de una incubación de 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en presencia del AcM anti p-21 Y13-259 (109). Luego de lavar con PBS se

volvió a colocar durante 15 minutos más en suero de conejo. Luego de escurrir se agregó inmunoglobulinas de conejo anti rata unida a peroxidasa (dilución 1:20) y se incubó durante 1 hora más a 37° C. A su término y luego de los lavados con PBS los portaobjetos fueron lavados con 0.1M Tris HCl. El revelado en presencia de DAB se realizó tal como se describe para el CEA.

Debido a que los tumores fueron incubados previamente con  $^3\text{H}$ -tim, al término del revelado con DAB los cortes fueron lavados con T.C.A. y  $\text{H}_2\text{O}$  y emulsionados. Se reveló a los 15 días y se tiñó con hematoxilina. La determinación de la positividad para p-21 se realizó de la siguiente manera: 1+) < del 1% de células positivas en todo el corte; 1+) de 1% - 25% de células que expresan p-21; 2+) de 26% - 50%; 3+) 51% - 75%; 4) 76% - 100%. Simultáneamente se determinó la incorporación de  $^3\text{H}$ -tim.

La determinación en cortes por congelación se realizó a partir de tumores incluídos en O.C.T. Los cortes fueron fijados como describen Furth y col. (109). Luego de montar los cortes en portaobjetos, fueron fijados 4 minutos con metanol absoluto a -10° C y secados al aire. En algunos casos, las células fueron fijadas con 3,7% de formaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego con metanol y acetona a -10° C. Se realizaron diferentes controles sustituyéndose el primer anticuerpo por PBS, suero normal de rata o por los siguientes anticuerpos monoclonales de rata; 1H3: reconoce un antígeno de histocompatibilidad de clase I y es inducido por interferón; YD1/63.4.10: reconoce un H.L.A. de tipo DR; YD1/23.1.2: reconoce un antígeno leucocitario común.

## XI. Determinación de la expresión del oncogene c-myc

### XI.a. Clonado y amplificación del c-myc

El c-myc inserto dentro del plásmido pBR322 es un segmento Cla I-EcoR I de 1.4 Kb que contiene el exón 3. El plásmido recombinante originariamente fue denominado clon pMC41RC (135). La inserción del c-myc transforma al plásmido en sensible a tetraciclina. En la figura 5 se puede observar la estructura del gen c-myc y del plásmido que contiene el 3er exón.

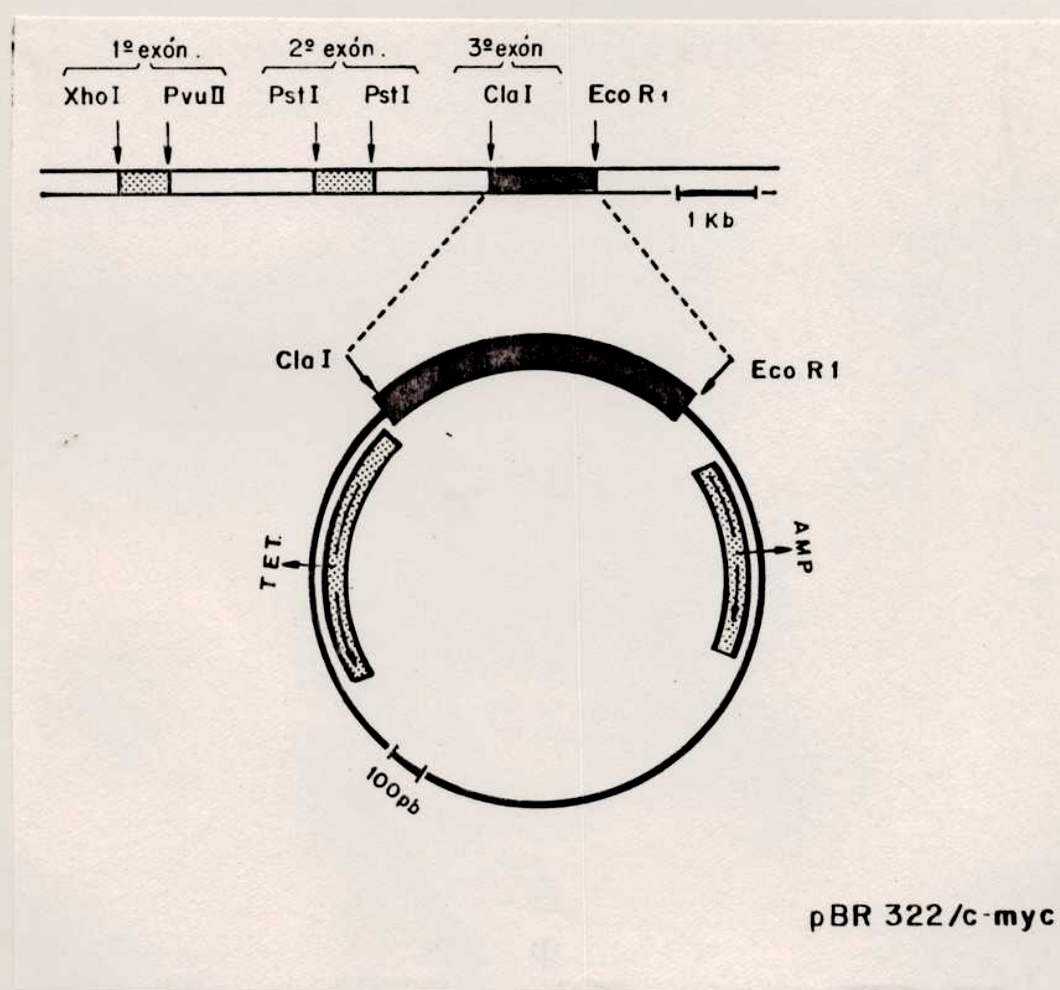


Figura 5. Estructura del gene humano c-myc. El fragmento de restricción ClaI/EcoRI conteniendo el tercer exón clonado en pBR322 se utilizó como sonda.

El c-myc liofilizado se resuspendió a una concentración final de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  y luego se diluyó 1:10 en buffer Tris-EDTA. De aquí se tomaron 4 ml que contienen 40  $\mu\text{g}$  de DNA.

#### **XI.b. Transformación de las bacterias**

En principio la técnica corresponde a la descrita por Maniatis y col. (195). La cepa de bacterias HB101 congelada en glicerol fue ligeramente descongelada e inoculada en tubos con 2 ml. de L-broth. Luego de dejar toda una noche, se transfirió a 50 ml de L-broth y se incubó con agitación fuerte hasta una densidad óptica de 0.5 OD<sub>550</sub> que en esta cepa es equivalente a  $5 \times 10^7$  células/ml y que se obtiene al cabo de poco más de 4 horas.

El cultivo fue transferido a hielo por 10 minutos y centrifugado a 4000 xg. (5550 rpm) durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en la mitad de su volumen original en una solución fría y estéril de 50 mM CaCl<sub>2</sub> y 10mM Tris-HCl (pH 8,0), dejado en hielo durante 15 min y centrifugado a 4000 xg durante 5 min a 4°C. El precipitado fue resuspendido en 1,33 ml de la solución CaCl<sub>2</sub> - Tris-HCl. Se dividió en alícuotas de 0,2 ml y se dejó a 4°C durante 19 horas. Se agregaron los 4  $\mu\text{l}$  del c-myc en buffer T.E, se mezcló y se dejó 30 minutos en hielo. Luego se pasó a un baño de agua a 42°C durante 2 minutos. Se agregó 1 ml de L-broth por tubo y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Al término de los 30 minutos, se incubaron 0,6 ml del total con tetraciclina (15 $\mu\text{g/ml}$ ) y el resto durante 30 minutos más en presencia de ampicilona (50 $\mu\text{g/ml}$ ). Luego de una incubación en placas de agar durante una noche a 37°C se obtuvieron alrededor de 15 colonias con 0,15 ml y unas 40 colonias con 0,30 ml en presencia de ampicilina. El control con tetraciclina no dió colonias.

**XI.c. Amplificación del c-myc**

Se tomó una colonia y se inoculó con una solución de L-broth conteniendo ampicilina, se incubó en Erlenmeyer durante una noche a 37°C con agitación vigorosa. Al día siguiente se tomó 0,1 ml del cultivo estacionario y se inocularon 35ml de solución L-Broth-ampicilina y se incubó a 37°C con agitación hasta una OD= 0,6. Se tomaron 25 ml y se transfirieron a 500 ml de L-broth-ampicilina. Al cabo de 2 horas y con un  $O.D_{600} \cong 0,4$  (no estacionario) se agregaron 2,5 ml de cloranfenicol para una concentración final de 170  $\mu\text{g/ml}$ . Se incubó durante toda un noche a 37°C con agitación.

**XI.d. Recuperación del plásmido amplificado**

Al día siguiente se centrifugó a 4000 xg, a 4°C durante 10 minutos y las células se lavaron con buffer STE (0.1 M NaCl, 1 mM EDTA y 10 mM Tris pH 7.8) frío. El precipitado de los 500ml se resuspendió en 10ml de solución I (50mM glucosa, 10mM EDTA, 25 mM Tris HCl pH 8,0) conteniendo 5 mg/ml de lisosima agregada en forma previa al uso de la solución.

Se dejó en tubos Beckman a temperatura ambiente 5 minutos. Se agregaron 20 ml de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS). Luego de mezclar se dejó en hielo 10 minutos seguido del agregado de 15 ml de 5 M acetato de potasio (pH 4,8). Luego de mezclar, se dejó en hielo 10 min y se centrifugó a 20000 rpm, 20 minutos a 4°C. Se descartó el precipitado (particulado y DNA bacteriano) y el sobrenadante se transfirió a 3 tubos a los cuales se les agregó 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó 15 min a temperatura ambiente. El DNA se recuperó centrifugando a 12000 xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó el precipitado con etanol 70% para eliminar las sales y se dejó durante 10 minutos en desecador con vacío más otros 10 minutos sin vacío para evaporar el eta-

no residual. Se juntó todo en 8 ml de buffer TE y se agregaron 8 gs de Cs Cl en forma paulatina hasta su disolución. El volúmen aumentó hasta 10 ml y se agregaron 0,8 ml de bromuro de etidio (10mg/ml).

Se transfirió a tubos de acetato de celulosa y se completó el volúmen con aproximadamente 0,5 ml de aceite de parafina. Se ultracentrifugó 36 horas a 20°C y a 45.000 rpm en un rotor tipo 50. Al término de la centrifugación se observó con lámpara de U.V. y se vieron dos bandas y un precipitado. Utilizando una pipeta Pasteur con punta curva se recuperó la banda de plásmido circular. Con alrededor de 2 ml de DNA del plásmido se hicieron 4 extracciones con un volúmen similar de n-butanol saturado con agua hasta eliminar todo el bromuro de etidio. El CsCl remanente fue eliminado por diálisis durante toda una noche contra buffer TE . Luego de la diálisis se repartió en alícuotas de 0,2 ml y se midió la absorbancia a 260nm y a 280 nm. La relación  $\frac{OD260}{OD280}$  demostró que no había contaminación en el DNA. Los cálculos demostraron una concentración de 245 µg/ml.

#### **XI.e. Comprobación de la presencia del c-myc en el DNA del plásmido**

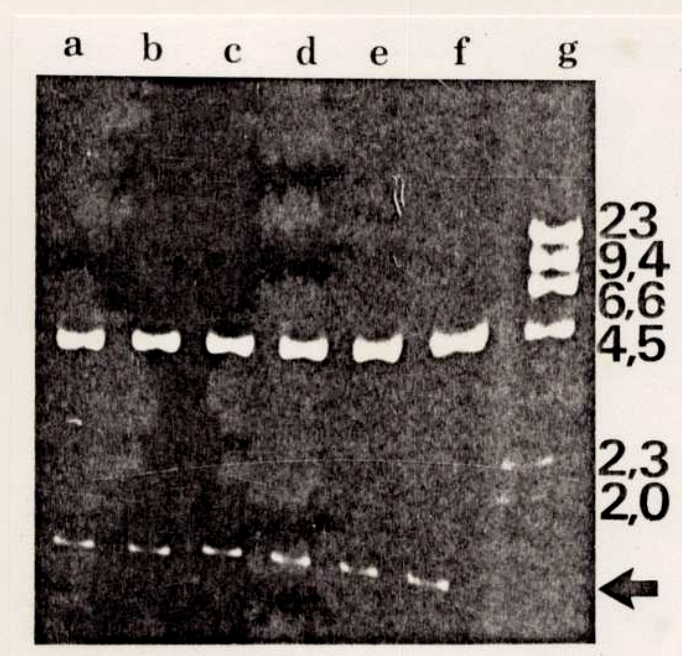
Para comprobar la presencia del c-myc inserto se tomaron 2µl de la solución conteniendo el plásmido (0,4 µg de DNA) y se realizó una digestión completa con enzimas de restricción. El medio de incubación contenía en un volúmen final de 10 µl: -1µl de buffer de restricción (concentración final: 50mM NaCl, -10mM Tris-HCl p H 7,5, 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 1mM DTT).

- Eco RI a una concentración de 17 U/35 µl de plásmido.
- Cla I a una concentración de 20 U/35µl de plásmido.
- se completó con H<sub>2</sub>O hasta 10µl.

Se incubó toda una noche a 37° C; se frenó con EDTA (pH8.0) a una concentración final de 10mM. A esta solución se agregó el azul de bromofenol y Ficoll a concentraciones finales 0,025 % y 2.5 % respectivamente.

La corrida se realizó en 1.1 % de agarosa en buffer TBE (TBE 5X = Trizma base 54 g, ácido bórico 27,5g., EDTA 0,5 M pH 8,0 en 20ml incluyendo una concentración final de 15 mM acetato de sodio, pH 5,5 de un stock de 3M).

Como control se corrió DNA de fago  $\lambda$  digerido con Hind III. Se corrió durante 2 horas en una minicuba. A su término se agregaron 3 $\mu$ l de Bromuro de Etidio para 30 ml de buffer y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se observó por lámpara UV y se obtuvo una banda correspondiente al plásmido y otra del tamaño previsto correspondiente al c-myc, como se observa en la figura 6.



**Figura 6.** *Separación del c-DNA c-myc del DNA del plásmido. Canales a-f, pMC41RC; canal g, DNA del fago  $\lambda$  digerido con Hind III. La flecha señala el c-myc.*



### **XI.f. Hibridación in situ**

Las muestras tumorales recogidas directamente del quirófano fueron fijadas en forma estéril en p-formaldehído al 4% en PBS. Luego de lavarlas con PBS fueron incluídas en parafina. Se obtuvieron cortes de 5µm que fueron desparafinizados con dos cambios de xilol de 15 min cada uno y rehidratados a través de pasajes por etanol (100%, 96%) y H<sub>2</sub>O. La hibridación in situ se basó esencialmente en los trabajos de Ohlsson y col. (196), y Brahic y Haase (197), modificado por Rein y col. (198), Hafen y col. (199) y M. Akam (200). Para permeabilizar los tejidos y hacerlos accesibles a la "sonda", los siguientes pasos fueron esenciales: las secciones fueron en principio incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente en 0.2 M HCl, lavadas con H<sub>2</sub>O e incubados durante 30 minutos a 70°C con 2 x SSC (1 x SSC= 0.15 mM NaCl y 0.015 mM de citrato de sodio pH 7.0). Luego los portaobjetos fueron tratados con 3 µg/ml de proteinasa K (disuelta en 0.2 M Tris HCl pH 7.2 y 2mM Ca Cl<sub>2</sub>) durante 15 minutos a 37°C, lavados con buffer y deshidratados con diferentes gradaciones de etanol (50-70-95-99.5% de etanol) y secados al aire. Para fijar el RNA expuesto por la proteinasa K se realizó una post-fijación durante 30 minutos a temperatura ambiente con 4% de paraformaldehído en PBS, seguido de varios lavados con PBS y deshidratación con diferentes gradaciones de etanol como se menciona previamente. La acetilación de los portaobjetos se realizó como se describió (201,202), con el objeto de reducir la unión inespecífica de ácidos nucleicos. Los portaobjetos fueron dejados en 0.1 M de trietanolamina, pH 8.0 (ajustado con HCl). Luego se agregó anhídrido acético hasta 5 ml/L con agitación fuerte. Después de dejar 10 minutos se lavó con 2 x SSC (dos veces de 5 minutos) 70% etanol (dos veces de 10 minutos), 95% etanol (dos veces de 5 minutos) y secado al aire.

Previo a la hibridación, los cortes fueron prehibridados durante 2 horas a temperatura ambiente con la solución de hibridación sin la sonda radioactiva.

Posteriormente los portaobjetos fueron hibridados con 10 ng de [<sup>3</sup>H] c-DNA por portaobjeto durante 40 a 48 horas. El medio de hibridación contenía 50% de formamida, 10% dextran sulfato, 1M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.0, 1mM EDTA, 150 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonicado, 5 x de solución Denhardt (1 x de solución Denhardt 0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona y 0.02% BSA en peso/volumen) y 1 mg/ml de RNA de levadura. La mezcla de hibridación incluyendo el <sup>3</sup>H-c DNA fue calentada durante 1-2 minutos a 100°C y enfriada inmediatamente a 0°C. 8µl de la mezcla de hibridación fueron depositados sobre el corte de tejido y cubiertos con un cubreobjeto de 1 cm de lado que fue previamente tratado de la siguiente manera: hervido en 1 N HCl durante una hora, neutralizado en 1 M Tris H Cl, pH 7.0 y lavado con H<sub>2</sub>O destilada.

Los extremos del cubre objeto fueron cubiertos con cemento gomoso para evitar la evaporación de los 8µl durante la hibridación en cámara húmeda. Al término de la hibridación los portas fueron sumergidos dos veces en cloroformo (5 minutos por vez) para eliminar el cemento y luego lavados dos veces (10 minutos por vez) a temperatura ambiente con 50 % de formamida, 0.3M Na Cl, 5mM Tris (pH7.4) y 5 mM EDTA. Posteriormente los portas fueron lavados por inmersión en 2 litros de 2 x SSC durante 1 hora a 50° C con agitación y luego durante 1 hora con 0.6 M Na Cl, 10 mM Tris HCl (pH7.4), 1mM EDTA, pasados por 2 x SSC y deshidratados con diferentes gradaciones de etanol, (70% y 90% de etanol conteniendo 300 mM de acetato de amonio). La emulsión fotográfica Kodak NTB2 fue diluída 1:1 con 600 mM de acetato de amonio. Luego de emulsionados, los portaobjetos fueron expuestos durante 40 - 50 días, revelados con Kodak D19 y teñidos con hematoxilina de Harris.

Los portaobjetos utilizados durante la hibridación fueron previamente tratados de la siguiente manera para prevenir la unión del c-DNA al vidrio: se incubaron durante 3 horas a 65° C en 450 mM Na Cl/ 45 mM Na Citrato, pH 7.0

conteniendo 0.02 % Ficoll, 0.02 % polivinilpirrolidona y 0.02% BSA, luego sumergidos durante un segundo en H<sub>2</sub>O y fijados durante 20 minutos a temperatura ambiente con 4% de p-formaldehído en PBS.

**XI.g. Aplicación simultánea de técnicas de inmunoperoxidasa y de hibridación in situ**

En la mayoría de los casos se realizó la detección simultánea de un antígeno por inmunoperoxidasa seguido de la hibridación con el c-myc. En ese caso luego de terminar la reacción con DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para peroxidasa, los portaobjetos fueron dejados en H<sub>2</sub>O, luego tratados con 0.2 M HCl y seguido como se describió.

**XI.h. Marcación del c-DNA por "Nick translation"**

Se hizo en principio de acuerdo al trabajo de Rigby y col. (203).

La marcación del c-DNA del plásmido conteniendo el c-myc se llevó a cabo incubando durante 2 horas a 16°C una cantidad de 0,4 µg del c-myc (en un volumen de 1,6 µl) en presencia de dATP, dGTP y dCTP (concentraciones finales de los tres 20 µM) y 50 µCi de [<sup>3</sup>H] dTTP (actividad específica = 54,5 Ci/m mol) previamente evaporado en forma total, buffer de Nick translation (concentración final= 0.05 M Tris HCl pH 7.2, 0.01 M Mg SO<sub>4</sub>, 0.1 mM DTT, BSA fracción V, 50 µg/ml) en un volumen final de 50 λ. Inmediatamente antes de comenzar la reacción se agregó 1 λ de D Nasa (0.1 µg/ml) y 1 λ de DNA polimerasa I (10 U/ml).

Al término de la incubación se llevó el tubo a hielo. Se agregaron 2 ml de 0.5 M EDTA pH 8, se centrifugó en microcentrífuga y se agregaron 5 ml de buffer T.E. La separación entre el DNA y el nucleótido libre se realizó pasando

la muestra por una columna de Sefadex G-50 (18 x 0.6 cm) en buffer TE. Luego de lavar la columna con buffer se adsorbieron los 100  $\mu$ l del tubo que fue luego enjuagado en otros 100  $\mu$ l posteriormente adsorbidos también. La elución de las columnas fue a un ritmo de 6 ml por 20 minutos. Se recogieron fracciones de 0,5 ml. Al término de la columna se contaron en un contador de centelleo líquido 5  $\mu$ l de cada tubo. En la figura 7 se observa un patrón típico de elución del c-DNA y del nucleótido libre.

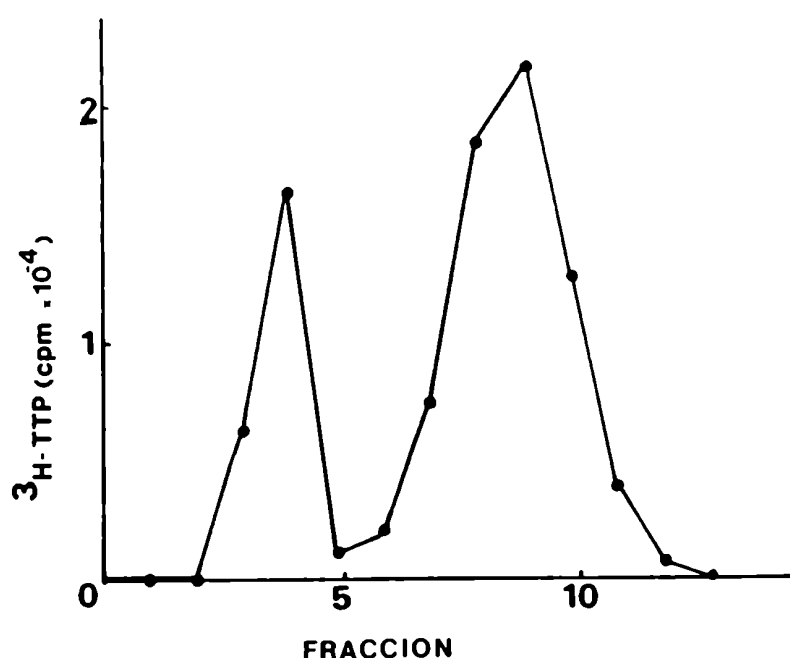


Figura 7. *Cromatografía del c-DNA c-myc por Sefadex G-50. El pico de la izquierda corresponde al DNA y eluye en el  $V_0$  de la columna*

Como se observa la separación es muy clara. En general obtuve un total de  $6-30 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g DNA que se encuentra dentro de lo que se reporta en la literatura mediante el uso de nucleótidos tritiados (202,203). La incorporación de  $^3\text{H-TTP}$  al DNA varió entre el 15% y el 20%. Luego de obtenido el pico de DNA los tubos 3 y 4 se juntaron y se precipitó toda la noche con 2 volúmenes de etanol en presencia de 0.1 M NaCl a  $-20^\circ\text{C}$ . Al otro día se centrifugó durante 10 minutos

a 15000 rpm y luego de descartar el sobrenadante, se dejó secar y se evaporó por vacío durante 20 minutos para eliminar el etanol remanente. El precipitado fue resuspendido en buffer de hibridación para obtener alrededor de  $5 \times 10^4$  cpm/5  $\mu$ l. a una concentración final de alrededor de 2  $\mu$ g/ml de DNA tal cual se aconseja para hibridaciones in situ.

## **XII. Cultivo de células**

La línea celular T47-D es una línea de cáncer de mama humano crecida en cultivo continuo. Las células fueron crecidas en medio RPMI 1640, suplementado con 20 mM Hepes, pH 7,2, 0,5 mg/ml de insulina y 10% de suero fetal de ternera.

Las células HL-60 son una línea promielocítica humana crecida en cultivo continuo. Estas fueron crecidas en MEM- $\alpha$  suplementado con 10% de suero fetal de ternera. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 95% : 5%, aire: CO<sub>2</sub>.

## **MATERIALES**

Los medios de cultivo de tejidos fueron obtenidos de Grand Island Biological Company (Grand Island, NY. ). Las enzimas y drogas fueron en general de Sigma (Saint Louis, MO). El material radioactivo fue obtenido de New England Nuclear (Boston, MA). Los anticuerpos comerciales fueron obtenidos de Dako Laboratories, Denmark y las enzimas de restricción de Bethesda Research Laboratories.

El anticuerpo monoclonal anti p-21 fue cedido por el Dr. Mariano Barbacid del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. La línea HL-60 y el

c-DNA del c-myc fueron cedidos por el Dr. R. Buick del Ontario Cancer Institute de Canadá. Los anticuerpos de rata que se usaron como control fueron gentilmente cedidos por el Dr. Oscar Burrone del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar".

## RESULTADOS

### I. Expresión de marcadores de diferenciación y proliferación en carcinoma de mama humano

#### I.a. Expresión del antígeno carcinoembrionario y su relación con la proliferación tumoral

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la expresión de un antígeno oncofetal como el carcinoembrionario (CEA) se encuentra aumentada en tumores más diferenciados por lo que se sugirió que la presencia de CEA podría ser utilizada como expresión de diferenciación celular en cáncer de mama humano.

La primera parte de este trabajo consistió en la determinación de la incorporación de timidina radioactiva comparándola con la expresión de CEA a nivel celular. El propósito de estos estudios realizados en principio sobre cortes histológicos de tumores primarios de mama, fue determinar si la expresión de CEA está localizada en aquellas células proliferantes o bien en otra subpoblación celular. Para ello se desarrolló una técnica en nuestro laboratorio, que permite la utilización simultánea de la autorradiografía y la inmunohistoquímica (la técnica fue desarrollada por la Dra. I. Sorín). En nuestro caso la primera de ellas nos permitió detectar la incorporación de timidina tritiada al DNA, mientras que por medio de la segunda se determinó la expresión de CEA. Asimismo estos valores fueron comparados con el contenido total de receptores estrogénicos que como vimos en la introducción es también una expresión de tumores más diferenciados.

El índice de captación de timidina se determinó en 36 pacientes con carcinoma mamario. Como se puede ver en la Tabla 1 existe una gran varia-

bilidad en los valores obtenidos, siendo el porcentaje de células marcadas entre 0,08% y 3,73% en los diferentes tumores.

**Tabla 1.** *Correlación entre el índice de captación de timidina (T.L.I.), la expresión tisular del antígeno carcinoembrionario (C.E.A.) y el contenido de receptores estrogénicos (R.E.) en carcinomas mamarios humanos. El detalle experimental se encuentra descrito en la sección Materiales y Métodos.*

Grado de diferenciación	T.L.I. (% de células marcadas)	C.E.A. (% de células positivas)	R.E (fmoles/mg de proteína)
<b>I</b> diferenciados	0,86±0,47 <sup>a</sup> (13) <sup>b</sup> 0,08-1,54 <sup>c</sup>	50,7±18,6(13) 21-81	73,6±71,8(7) 11-192
<b>II</b> parcialmente diferenciados	1,21±0,45(19) 0,48-1,98	27±21,8(18) 1-80	13,7±53,6(19) 0-187
<b>III</b> indiferenciados	2,61±0,76(4) 2,01-3,73	4,3±1,27(4) 0-3	4,3±4,5(3) 0-9

*a.) Promedio ± DS, b.) Número de pacientes, c.) Rango de valores*

Cuando se comparó el T.L.I. promedio de los tumores en función del grado de diferenciación tumoral se observó que existe además una tendencia hacia un T.L.I. más alto en los tumores con menor diferenciación. La comparación estadística de estos valores, mostró diferencias significativas, principalmente entre el grupo de tumores más diferenciados (grado I) y el menos diferenciado (grado III) siendo la  $P < 0,001$ .

Se puede concluir de estos resultados, que a pesar de que existen variaciones importantes en los niveles de T.L.I. entre los diferentes tumores, estos valores están indicando que sólo un determinado porcentaje de células de un tumor primario está activo en el ciclo celular duplicando su DNA. Más aún, este



porcentaje de células es muy pequeño siendo el promedio de todos los tumores de  $1.24 \% \pm 0,71$  (promedio  $\pm$  desviación estándar) y como se observa en la tabla, en ningún caso supera el 4 % del total de células epiteliales.

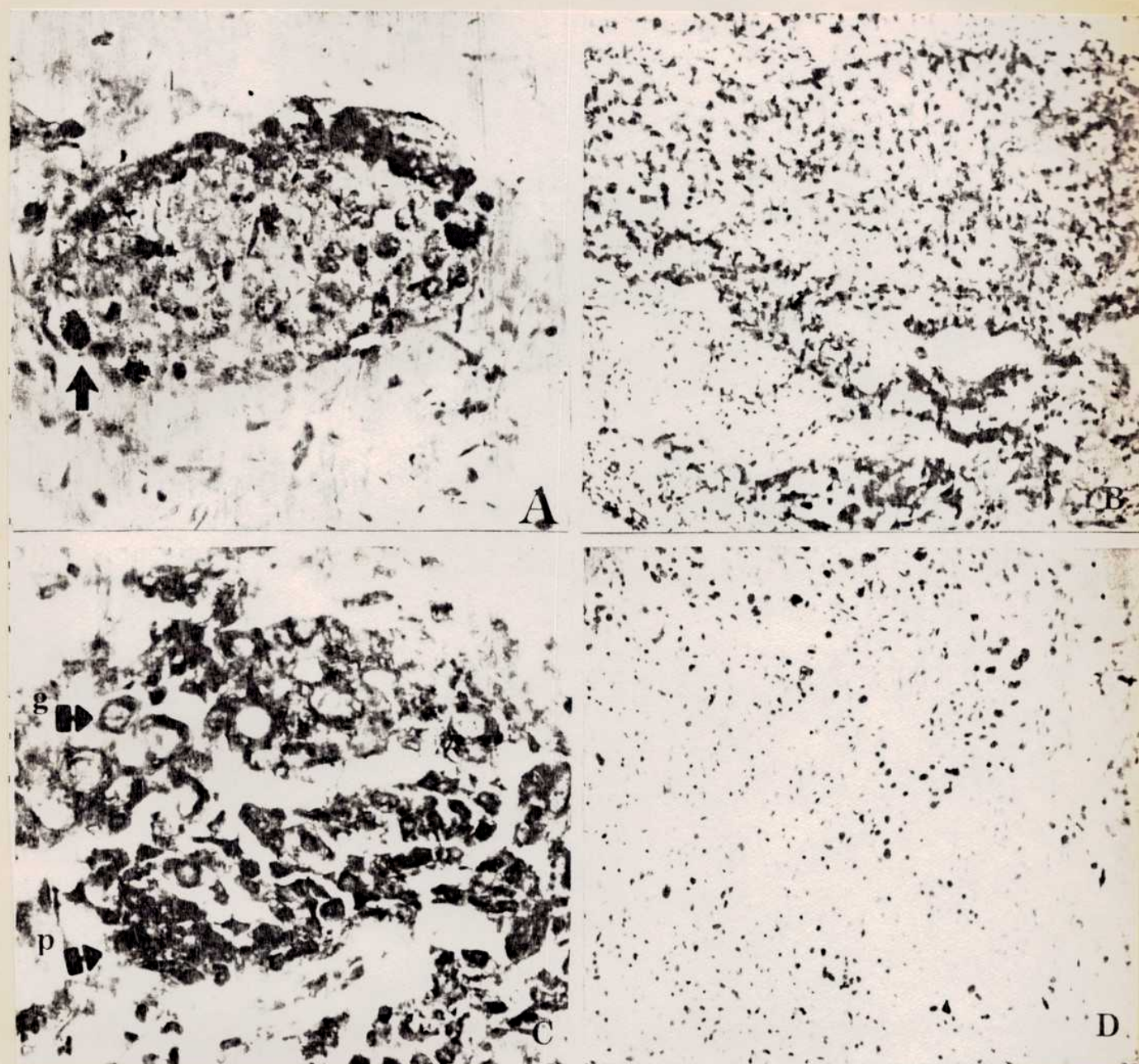
Otro dato relevante que surge de la tabla es que de los 36 pacientes estudiados, 32 tumores expresaron capacidad de diferenciación total o parcial (grados I y II) y solo 4 de estos tumores en esta población al azar, no mostraron parámetros de diferenciación, sugiriendo que en carcinoma de mama humano las células responsables de la proliferación tumoral poseen en su memoria la capacidad de dar origen a células diferenciadas y lo que es más importante aún, a una estructura diferenciada del tumor.

En la tabla 1 se observan también los valores de CEA obtenidos en cada tumor. Como era dable esperar, estos valores tienden a ser más elevados en aquellos tumores más diferenciados.

Cuando se compararon los niveles de CEA con los valores de T.L.I. se observó (Tabla 1) que los tumores menos diferenciados (grado III) tienden a no expresar CEA tisular ó presentan niveles bajos, con valores altos de T.L.I. (2,01% - 3,73%); por el contrario los tumores más diferenciados (grado I) presentan mayor cantidad de CEA y valores más bajos de T.L.I. (0,08% - 1,54%). Asimismo los tumores grado II poseen valores intermedios de T.L.I. (0,48% - 1,92%), mientras que la expresión de CEA es muy variable.

La tabla muestra que la expresión de CEA es muy heterogénea en los diferentes tumores, siendo el valor promedio de alrededor del 32 % de células positivas con un valor mínimo de 0% y un máximo de 81%. Los resultados nos indican también que la relación promedio entre las células que expresan CEA y las proliferantes es aproximadamente de 20 a 1.

En la figura 8A se pueden observar células que han incorporado timidina tritiada en sus núcleos.



**Figura 8.** *Determinación simultánea de CEA y de la incorporación de 3H-tim al DNA.* Cortes de tumores incubados con 3H-tim fueron reaccionados con el anti-suero anti-CEA. A, la tinción citoplasmática del borde superior corresponde al CEA, la flecha señala núcleos marcados por la incorporación de 3H-tim (aumento X 400); B, tumor con alta expresión de CEA (X 125); C, igual que B (X 500) g: células grandes, p: células pequeñas; D, tumor sin expresión de CEA (X 125).

Las características más salientes de este tipo de células son que suelen poseer núcleos claros con cromatina difusa característica de las células en proliferación. En la misma figura se observa la expresión de CEA en diferentes tipos de tumores. En 8B podemos ver un tumor con abundante expresión intraci-

toplásmica de CEA; a mayor aumento podemos ver que la expresión de CEA está asociada a dos tipos de células que difieren en el tamaño y en la relación núcleo/citoplasma. Cabe resaltar sin embargo que la señal fue más intensa en las células más pequeñas (fig. 8C). Por último en la figura 8D, vemos un tumor indiferenciado que no expresa CEA.

Este estudio simultáneo acerca de la expresión intracelular de CEA y la capacidad proliferativa nos permitió observar también que ninguna de las células en fase S del ciclo celular o en mitosis expresó CEA intracitoplasmático.

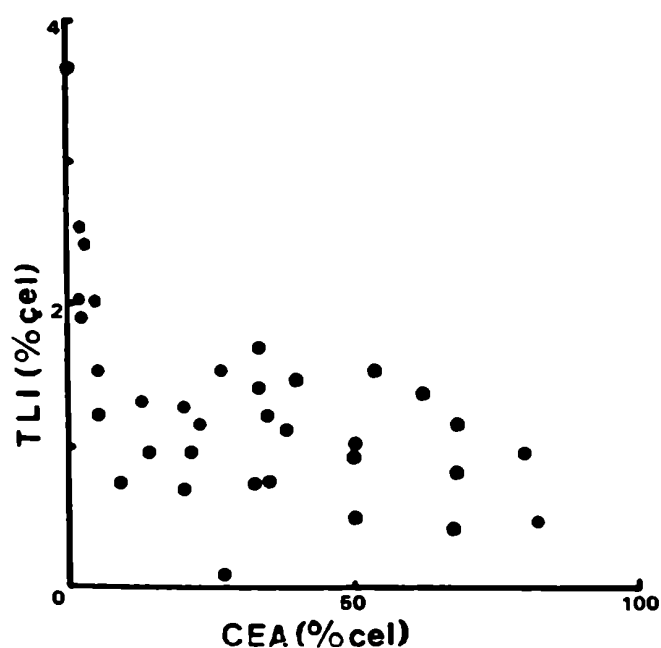
### **I.b. Expresión de receptores estrogénicos**

En 29 de los 36 tumores se midió también el contenido total de receptores estrogénicos. En la tabla 1 se puede observar que aquellos tumores más diferenciados poseen valores positivos de RE, mientras que existe una tendencia a valores más bajos en tumores más indiferenciados. Esta diferencia es particularmente significativa cuando se compara el promedio de los tumores grado I ó II con el grado III.

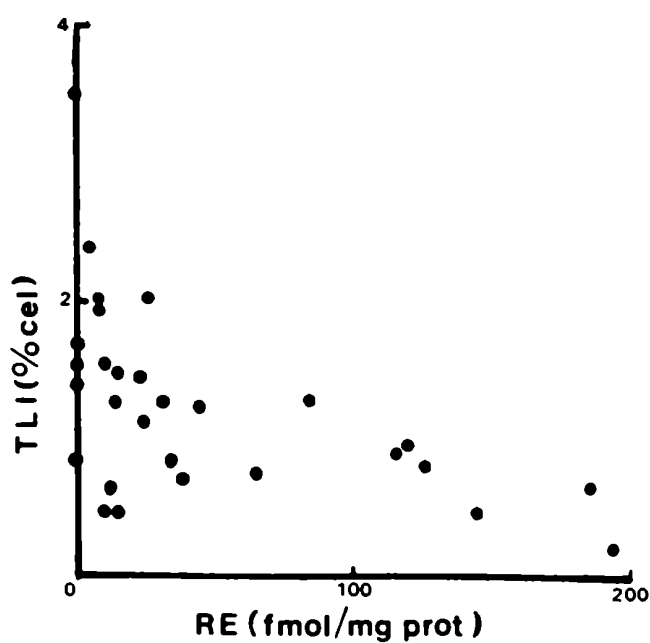
En la figura 9 está graficada la relación entre el porcentaje de células proliferantes y el de células que expresan CEA. Aunque la relación tiende a ser semilogarítmica, en realidad la mayor parte de los tumores poseen entre un 20% y 70% de células CEA positivas y 0.5% y 1.5% de células proliferantes.

En la figura 10 se puede observar la relación existente entre el porcentaje de células en fase S y el contenido de receptores. Aquí la relación parece ser más claramente de tipo semilogarítmica con un porcentaje menor de tumores que salen de esta relación con respecto a lo que se observó para CEA.

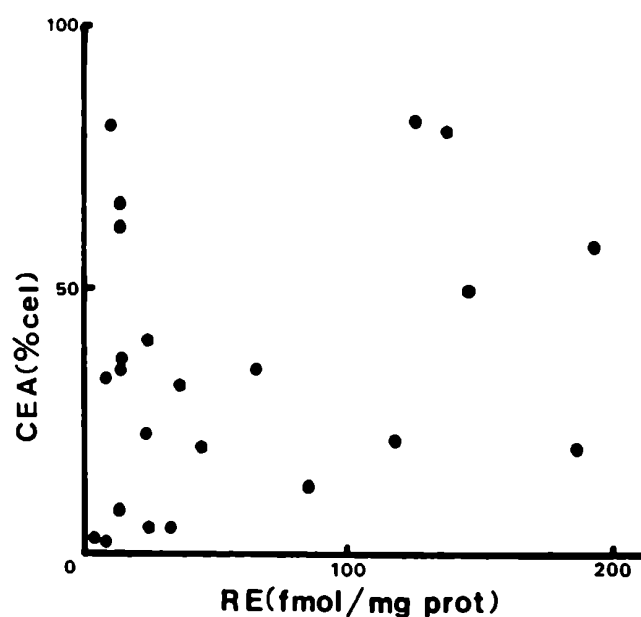
Estas diferencias entre la expresión de CEA y la de receptores estrogénicos se puso en evidencia al graficar un parámetro en función del otro (fig. 11).



**Figura 9.** *Correlación entre el TLI y la expresión de CEA. La expresión de CEA y el TLI (4h de incubación con  $^3\text{H}$ -tim.) se obtuvieron como se describe en Métodos. Cada símbolo representa el valor obtenido para cada tumor.*



**Figura 10.** *Correlación entre el TLI y el contenido total de RE. Para la obtención del TLI ver figura 9. El valor de RE se obtuvo con la técnica de desplazamiento por carbón activado descrita en Métodos. Los datos se expresan como en la figura 9.*



**Figura 11.** Correlación entre la expresión de CEA y el contenido total de RE.  
 Los valores de CEA y de RE se obtuvieron como se describe en las figuras 9 y 10.

A pesar de que en la tabla 1 habíamos observado que la expresión de CEA y de RE aumentaba con la diferenciación tumoral, no existe una correlación aparente en la expresión de ambos marcadores de diferenciación. Por ejemplo es posible apreciar que tumores con valores de RE menores de 20 fmol/mg de proteína, poseen una expresión de CEA que fluctúa entre 0% y 81 % de células positivas.

De los resultados observados hasta el momento, cabe resaltar las siguientes conclusiones parciales:

- a- células incubadas durante 4 horas en presencia de timidina radioactiva (proliferantes) no parecen expresar CEA.
- b- aunque los valores bajos de T.L.I. se encuentran asociados a una mayor expresión de receptores estrogénicos y de CEA, no se observó una correlación aparente en la expresión de ambos marcadores de diferenciación.

## **II. Determinación de receptores estrogénicos por autorradiografía en cortes histológicos**

Gran parte de los estudios sobre receptores estrogénicos en cáncer de mama fueron realizados utilizando técnicas que cuantifican el contenido total de RE del tumor, independientemente de la heterogeneidad en la distribución intercelular de dichos receptores dentro del tumor. Debido a que nuestro interés era estudiar la distribución de RE y su correlación con la expresión de CEA intenté poner a punto diversas técnicas. Estudios por técnicas de inmunohistoquímica realizados en nuestro laboratorio y en otros utilizando antisueros anti-estradiol no resultaron satisfactorios, por dos razones principales: **a**) la detección por técnicas de inmunohistoquímica se lograba solamente a concentraciones del orden de  $10^{-7}$  M de  $E_2$ , mientras que concentraciones de  $10^{-8}$  -  $10^{-9}$  M no producían expresión positiva; **b**) la positividad obtenida a  $10^{-7}$  M de  $E_2$  no era desplazada por un exceso de un análogo de  $E_2$  como el dietil etilbestrol (DES).

De allí que dejamos de lado definitivamente la posibilidad de detectar la unión específica del  $E_2$  de esta manera y decidimos verificar la aplicación de técnicas de autorradiografía utilizando como trazador  $^3H-E_2$ . Para ello desarrollamos un método que nos permitiera visualizar en forma simultánea antígenos como el CEA por técnicas de inmunoperoxidasa y la unión del  $^3H-E_2$  por técnicas de autorradiografía. Evaluamos en principio las condiciones ideales utilizando como modelo útero de ratón, donde las propiedades de tejido blanco están bien estudiadas.

### **II.a. Estudios en útero de ratón**

Los primeros experimentos llevados a cabo para encontrar las condiciones ideales, demostraron que la fijación con formalina en buffer fosfato o con etanol 95% produjo un cambio tal en el receptor estrogénico que en los prepara-

dos prácticamente no se observó precipitado de granos, posiblemente por liberación del  $^3\text{H-E}_2$  unido.

Resultados satisfactorios obtuve utilizando una técnica propuesta por Raam y col. (74) que utiliza diferentes concentraciones de etanol disuelto en solución fisiológica en lugar de agua destilada, con el objeto de prevenir los cambios que se pudieran producir en el receptor a raíz de la drástica hipotonicidad durante el procedimiento de fijación y deshidratación. La técnica se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos, de tal modo que en todos los preparados se midió previamente la expresión de CEA por técnicas de inmunoperoxidasa, que resultó ser negativa en todos los casos de útero de ratón, pero no así en tumores humanos, como se verá posteriormente.

Como se puede observar en la figura 12A, secciones de útero de ratón incubadas con  $^3\text{H-E}_2$  muestran granos de plata localizados preferentemente sobre las probables células blanco de la glándula del endometrio, aunque también en células del estroma. Además se observa que la gran mayoría del precipitado de plata se encuentra sobre los núcleos siendo evidente la menor contribución del precipitado citoplasmático al total. Es posible ver también que la matriz extracelular está prácticamente limpia de granos. En secciones paralelas incubadas con un exceso de  $\text{E}_2$  frío o el agonista estrogénico DES se pudo ver que el precipitado desapareció (datos no mostrados). Fragmentos coincubados con un exceso de progesterona fría no mostraron grandes diferencias con respecto al control incubado con  $^3\text{H-E}_2$  solo, siendo evidente por estos resultados que la presencia de este esteroide no tiene efecto sobre la unión del  $\text{E}_2$  a su receptor específico (fig. 12B).

Por otra parte, las células endoteliales, así como las musculares fueron siempre negativas.

La distribución general de la marcación en presencia de  $^3\text{H-E}_2$  fue bastante heterogénea. Existen nidos de células muy marcadas, preferentemente en las zonas periféricas de los fragmentos, mientras que la marca decrece hacia el



**Figura 12.** *Determinación de RE por autorradiografía. A y B, cortes de útero de ratón incubado con  $3H-E_2$  y reaccionados con el As anti-CEA como se describe en Métodos. C y D, cortes de tumores de mama incubados como el útero de ratón; C, la flecha señala una célula marcada en el núcleo; D, se señala una célula con marca en el citoplasma y expresión de CEA (aumento X 500).*



interior. Esta diferencia es significativa y la razón principal posiblemente reside en la accesibilidad del  $^3\text{H-E}_2$  a las células interiores.

## **II.b. Estudios en cáncer de mama humano**

El exámen de los cortes incubados con  $^3\text{H-E}_2$  mostró que la marca aparece solamente en las células neoplásicas. En 21 de 23 casos estudiados la marcación se observó solamente en el núcleo, como se ve en la figura 12C con una marcación citoplasmática prácticamente nula. Sin embargo en los casos 6 y 13 se pudieron observar células que poseían también marca en el citoplasma, como se observa en la figura 12D. En todos los casos estudiados el agregado de DES redujo notablemente el número de granos detectables.

Esto se observa claramente en la tabla 2 donde se muestra la variabilidad en la captación de  $^3\text{H-E}_2$  por parte de las células que componen el tumor. En presencia de 1 nM  $^3\text{H-E}_2$  solo, existe un gran porcentaje de células con más de 4 ó más granos por núcleo. Sin embargo el agregado de un exceso de 200 veces de DES en presencia de  $^3\text{H-E}_2$  provocó que no se observaran células con más de 3 granos y casi el 70% de las células observadas poseían 0-1 grano por núcleo. Este resultado confirmó la especificidad de la técnica utilizada.

En lo que respecta a la expresión de CEA, en las microfotografías de la figura 12 y en la tabla 2 se pueden ver células que expresan simultáneamente RE y CEA junto a otras que expresan uno solo de los marcadores. En la tabla 3 se muestran los datos de todos los tumores analizados. Cuando los tumores fueron divididos en RE positivos y RE negativos pudimos observar diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células marcadas con  $^3\text{H-E}_2$  (columna 2) así como en la expresión de CEA (columna 3). En esta tabla también se puede ver que existen tumores que expresan ambos marcadores en sólo el 30% de sus células y otros donde todas las células expresan CEA y RE simultáneamente.

**Tabla 2.** *Distribución del número de células según la incorporación de ( $^3\text{H}$ )E<sub>2</sub> y la expresión del antígeno carcinoembrionario (CEA) en un caso de carcinoma mamario. Fragmentos de un carcinoma mamario fueron incubados en presencia de estradiol tritiado como se describe en Métodos. Asimismo, se midió la expresión de CEA en los mismos cortes. \*E<sub>2</sub>: fragmentos incubados en presencia del estradiol radioactivo sólo; \*E<sub>2</sub> + DES: fragmentos incubados en presencia de \*E<sub>2</sub> más un exceso de dietilestilbestrol; \*Los niveles de CEA se expresan en cruces: -) expresión negativa; +) expresión moderada; ++) expresión positiva*

*E <sub>2</sub>									
CEA	Nº de granos	0	1	2	3	4	5	6	7
		<b>Número de Células</b>							
-		25	5	5	0	4	3	4	11
+		16	4	0	4	4	2	2	4
++		0	4	4	0	8	0	0	4

*E <sub>2</sub> + DES					
CEA	Nº de granos	0	1	2	3
		<b>Número de Células</b>			
-		0	28	17	12
+		10	12	12	2
++		40	4	4	0

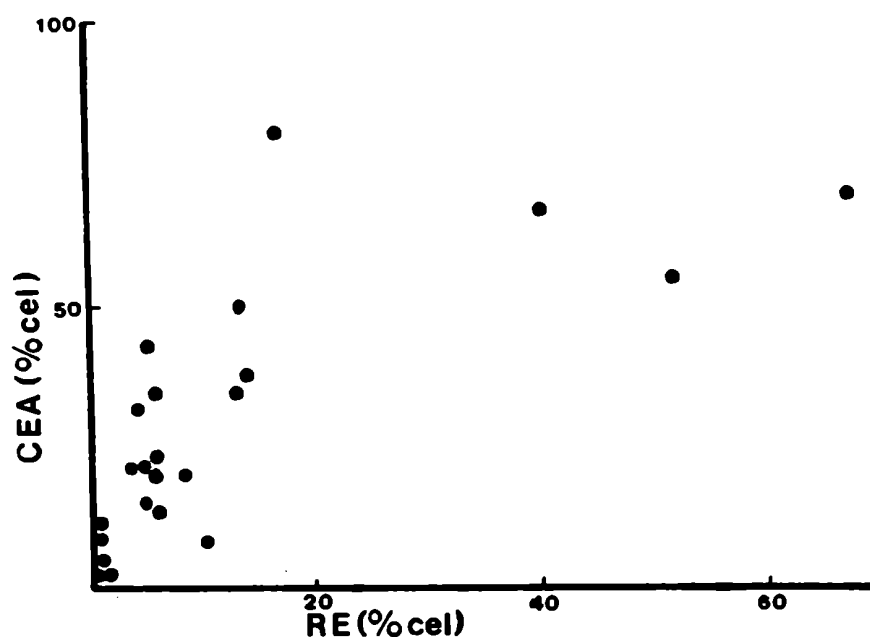
La correlación entre ambos marcadores de diferenciación se encuentra graficada en la figura 13. De la distribución de los casos se puede afirmar que para tumores con valores de hasta 50 % de células positivas para CEA el máximo de células positivas para RE es de 15 %. Por encima del el 50 % de células positivas para CEA el nivel de células positivas para RE tiende a aumentar en una

progresión mayor, e incluso se observa un descenso en los valores de CEA. La significación de estos resultados será analizada en la Discusión.

**Tabla 3.** *Determinación de receptores estrogénicos por autorradiografía. Se determinó el porcentaje de células con marca en el núcleo luego de una incubación con  $^3\text{H-E}_2$ . Este valor se comparó con otros parámetros (RE totales, TLI, CEA.) obtenidos como se describe en Métodos.*

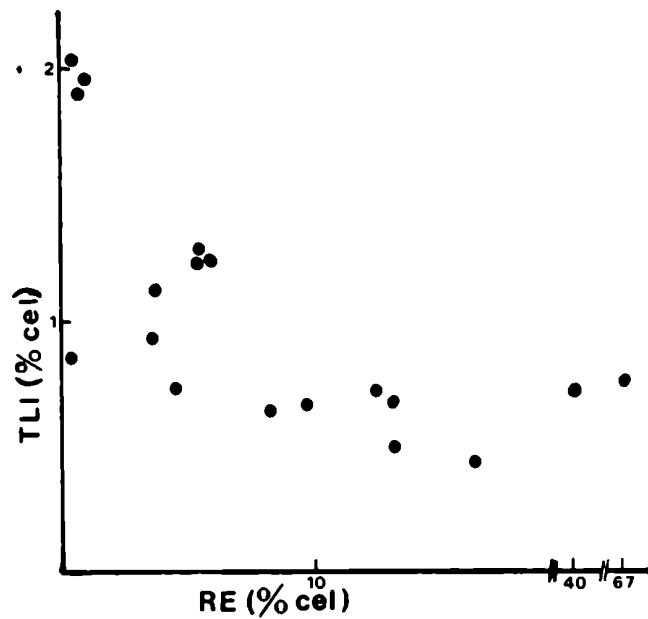
	RE (fmoles/mg proteína)	RE (% de células marcadas)	CEA (% de células positivas)	CEA+ RE+ (% de células)	TLI (% de células marcadas)
<b>tumores</b>					
<b>RE</b>	77,2 <sup>a</sup> (18) <sup>b</sup>	15,1 (18)	34,9 (18)	73,2 (17)	0,94 (14)
<b>positivos</b>	10-187 <sup>c</sup>	0,1-67	0,1-81	30-100	0,43-1,98
<b>tumores</b>					
<b>RE</b>	1,8 (5)	1,5 (5)	9,6 (5)		1,59 (3)
<b>negativos</b>	0-9	0-6	1-24		0,84-2,01

*a: promedio ; b: número de casos estudiados; c: rango de valores*



**Figura 13.** *Correlación entre la expresión de CEA y la de RE por autorradiografía. La obtención de CEA y de RE se realizó como se describe en Métodos.*

En la figura 14 podemos ver que existe una correlación semilogarítmica entre el TLI y el porcentaje de células positivas para RE, bastante similar a la observada cuando se comparó el TLI con el contenido total de RE.



**Figura 14.** Correlación entre el TLI y la determinación de RE por autorradiografía.

Al comparar la posible utilidad de la técnica de determinación de RE por autorradiografía con la que comunmente se utiliza para determinar el contenido total de RE se vió que de los tumores considerados RE+ por medio del ensayo bioquímico, todos menos uno dieron porcentajes de células RE+ por encima del 1%. El único caso que no coincidió fué un tumor de células pequeñas muy homogéneas, con expresión casi negativa para CEA, a pesar de pertenecer morfológicamente al tipo de tumores que suelen expresar CEA en forma abundante. Con respecto a los tumores RE negativos por el ensayo con DCC, todos poseían valores por debajo de 0.8% de células positivas, con excepción de un caso donde se observó un 6% de células positivas.

### III. Separación de subpoblaciones celulares en cáncer de mama humano

Los resultados previos obtenidos en cortes histológicos de tumores primarios indicaron la existencia de una gran heterogeneidad celular en lo que se refiere a la expresión de marcadores de diferenciación como CEA y RE por un lado y a la de células en activa proliferación por otro. Por otra parte mientras las evidencias indicaban que las células en fase S no expresaban CEA, la relación entre la expresión de CEA y RE no era directa, habiéndose constatado la presencia de células que expresaban un solo marcador o que expresaban ambos simultáneamente. Debido al tipo de técnicas utilizadas, no era posible determinar con certeza si las células proliferantes podían poseer receptores estrogénicos. Para intentar una respuesta, se decidió estudiar si era factible separar los diferentes tipos de células que componen los tumores por medio de gradientes isopícnicos.

La elección de los tumores para realizar estos experimentos se realizó en función de su peso libre de material no tumoral, como se describe en Materiales y Métodos. En la tabla 4 se describen los datos clínicos de los pacientes incorporados al estudio. Se puede observar que el estadio predominante es II, pero la edad, grado de diferenciación y tipo histológico son variables, por lo que podemos decir que se trataría de un grupo de tumores representativo. La determinación del contenido total de CEA, TLI y RE confirma que se trata de un grupo de tumores heterogéneo. Como mencioné previamente cada uno de los tumores que se detallan en la tabla fue disgregado y tratado siguiendo los pasos que se detallan en la sección Métodos. La variación en el número de células obtenidas es resultado tanto de la masa tumoral como de su celularidad, habiéndose obtenido entre  $4,4$  y  $17,4 \times 10^6$  células por tumor, con viabilidades que fueron del 70 % al 98 %; como era lógico es

**Tabla 4.** Muestras de cáncer de mama humano usadas para el estudio de las supoblaciones celulares

Caso	Edad	Estadio	Tipo histológico	Grado	CEA	TLI	RE	Peso tumoral ( gr )	Células obtenidas
1	45	2	lobulillar	I	27	0,08	13	3, 5	5, 5
2	79	2	lobulillar	II	9	0,67	13, 4	6, 2	11, 6
3	73	3	NOS	II	34	192	29, 5	4, 0	4, 4
4	70	2	lobulillar	I	15	0,94	119	7, 1	13, 3
5	58	2	NOS	II	ND	ND	23	3, 6	5, 3
6	62	2	NOS	II	1	ND	< 3	6, 3	11, 3
7	60	2	NOS	III	20	0,63	187	5, 8	17, 4
8	62	2	NOS	II	80	0,93	118	3, 3	8, 2
9	53	2	NOS	II	35	0,73	65	3, 0	9, 2
10	38	3	NOS	II	13	1, 27	85	5, 5	10, 0

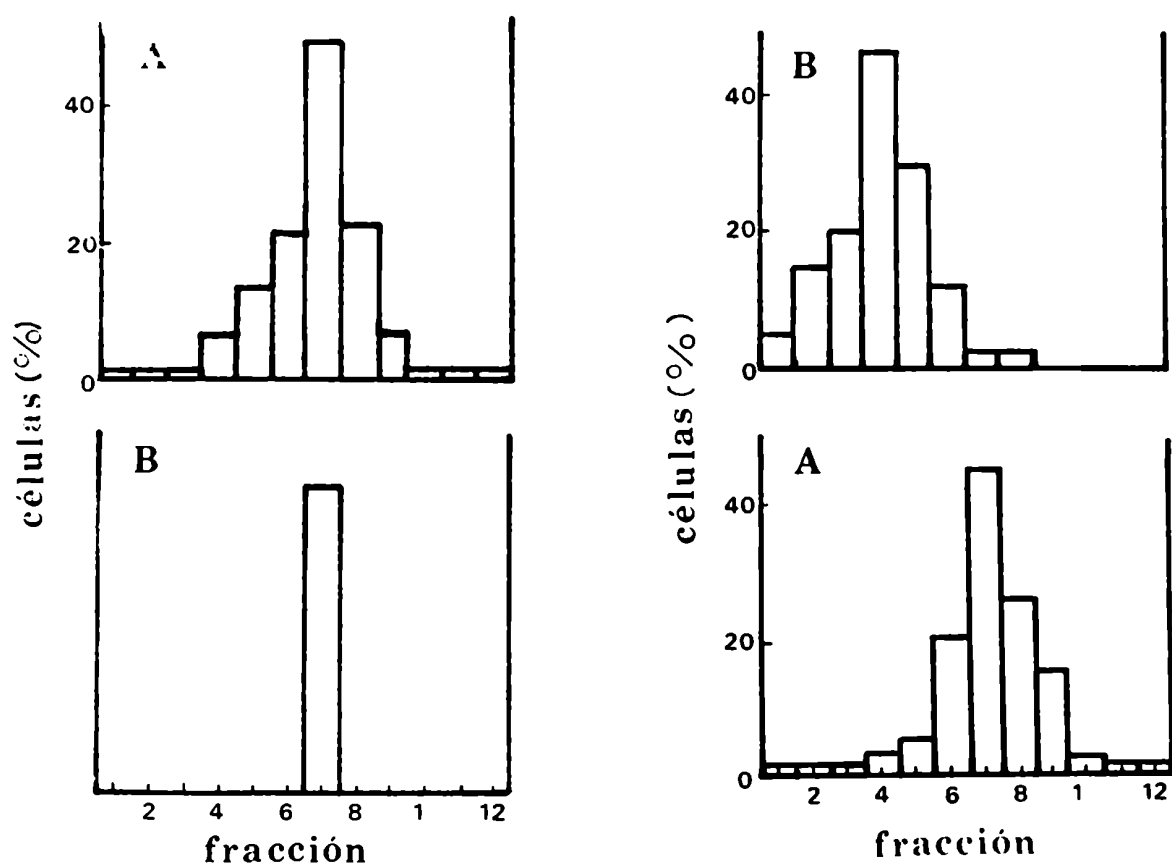
CEA, TLI y RE fueron determinados como se describe en Métodos.

CEA y TLI fueron cuantificados como porcentaje de células positivas y RE en fmoles/mg de proteína. Las células obtenidas se refieren solo a las epiteliales tumorales.

perar las mayores viabilidades se encontraron en los tumores más pequeños. El número de células obtenidas ( $1.1 \times 10^6 - 3.1 \times 10^6$  células por gramo de tejido) fue bastante similar al que se obtuvo permitiendo disociaciones espontáneas o usando disociaciones mecánicas para disgregar el tejido mamario (42,220). En un principio se realizaron intentos para aumentar el número de células obtenidas, especialmente mediante la disociación mecánica del tumor y el pasaje de agregados celulares a través de agujas de diámetro decreciente. Los resultados obtenidos fueron al igual que otros autores (204) un aumento en el número de células obtenidas pero con una viabilidad inferior al 20 %; por ello es que decidimos utilizar solamente disociación enzimática como se describe en Métodos.

### **III.a. Subpoblaciones celulares en gradientes isopícnicos: validación de la metodología utilizada**

Un trabajo previo sugería que los gradientes discontinuos de isodensidad podían crear separaciones artificiales, como producto de bandas formadas en forma alterada durante la centrifugación (205). Por ello decidimos realizar una serie de experimentos previos al uso de las células aisladas de los tumores. Con este objetivo  $5 \times 10^6$  células aisladas de la línea celular de carcinoma mamario T-47D fueron suspendidas en PBS y sembradas en un gradiente de seroalbúmina como se observa en la figura 15. Al término de la centrifugación se separó el gradiente, se recogió la fracción que poseía la mayor cantidad de células (fracción 6) y se sembró en un nuevo gradiente similar al anterior. Como podemos ver, la fracción de células aparece en la misma banda, sugiriendo que la localización de las células en una banda determinada no es un artificio sino producto de la relación entre su propia densidad y la del medio.



**Figura 15 (izquierda).** *Rebando de células T47-D en gradientes de BSA.* A,  $5 \times 10^6$  células fueron sembradas en un gradiente preformado de BSA. B, fracción 7 de A sembrada en un nuevo gradiente.

**Figura 16 (derecha).** *Distribución de células T47-D en gradientes con diferentes rangos de densidades.* A, similar a A de figura 15; B, se modificó el gradiente de tal modo que la fracción 1 de B corresponde a la 4 de A y así sucesivamente.

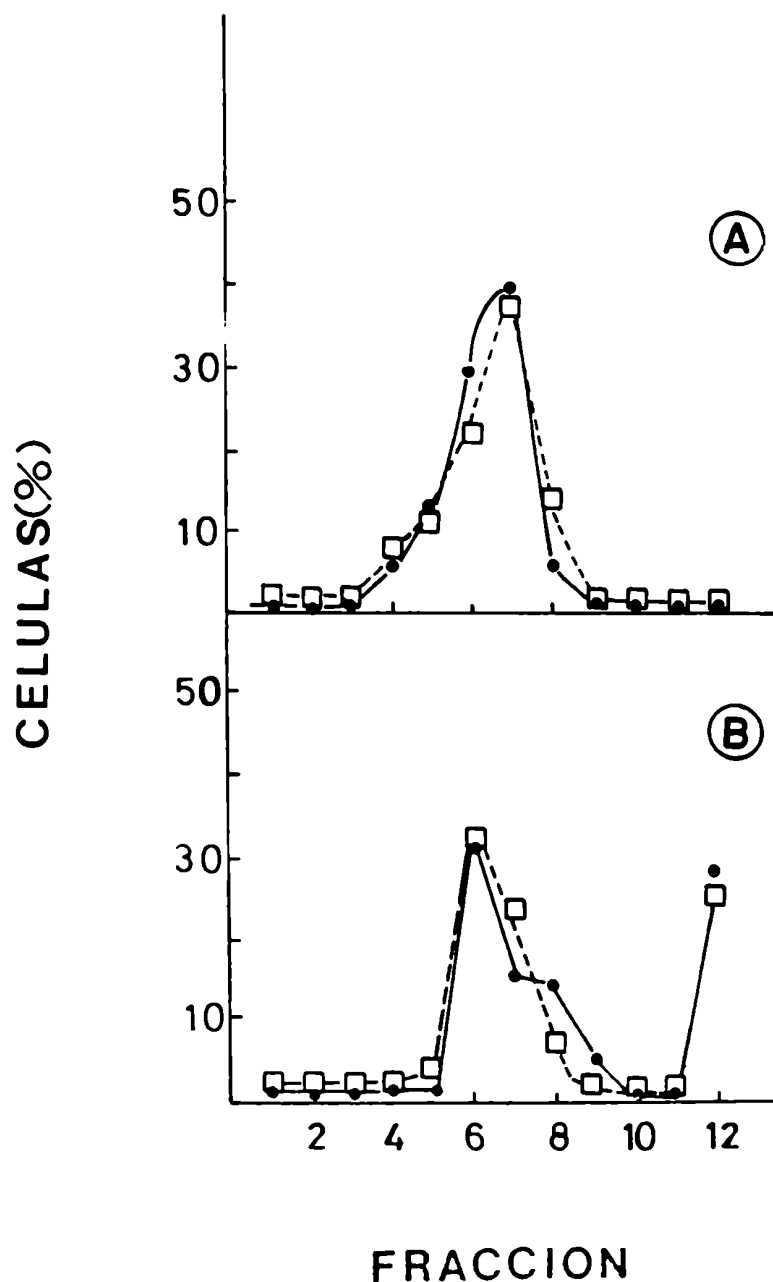
Esto fue confirmado con un nuevo experimento donde también se utilizaron células T-47D. Las células fueron sembradas en dos gradientes de seroalbúmina, con la diferencia de que en uno de ellos, se modificaron los rangos de densidades. Se puede ver que las células se han distribuido en ambos gradientes según sus densidades y no según el número de fracción (Fig. 15).

Otro de los parámetros que debían ser analizados era la posibilidad de un artefacto producido por el paso de concentración de la muestra previo a la siembra en el gradiente de seroalbúmina. Con este propósito se utilizaron células obtenidas de la línea T-47D y de la línea promielocítica HL-60. Estas fueron resuspendi-



das en PBS y sembradas en el gradiente o fueron previamente concentradas en un filtro Millipore como se describió en los Métodos y luego sembradas en el gradiente de BSA. Como se puede observar en la figura 17, el paso previo de concentración no afectó la densidad en la cual ambas líneas celulares fueron recuperadas. Durante este tipo de experimentos pudimos observar que se recuperan alrededor del 95 % de las células que se siembran en el gradiente. Luego de la concentración ese número se reduce al 75-80 % por lo que durante este paso se pierden entre el 15 % y 20 % de las células. Estos datos coinciden con la recuperación de alrededor del 65% al 70 % obtenida de los tumores, debido a que en estos últimos existen otros pasos previos además de la concentración por vacío.

Se estudió además el tiempo de centrifugación suficiente para que las células llegaran a isodensidad en el gradiente de albúmina. Se observó que tanto células T-47D como células del paciente 1 centrifugadas durante 30 y 45 minutos no tuvieron cambios en su distribución a lo largo del gradiente (datos no mostrados). Asimismo se comparó la distribución de células T-47D en un gradiente de BSA, con la distribución en un gradiente preformado de Percoll, que posee una viscosidad mucho menor que la albúmina y permitiría teóricamente una mayor movilidad celular a lo largo del gradiente durante un tiempo similar de centrifugación. Los resultados indican que no hubo ninguna diferencia siendo recuperadas las células a densidades similares en ambos gradientes (datos no mostrados).



**Figura 17.** *Distribución de células T47-D y HL-60 en gradientes de albúmina; efecto de la concentración. Células T47-D (A.) ó HL-60 (B.) fueron resuspendidas en un ml y sembradas en un gradiente de BSA (●-●) ó en 3ml, concentradas a través de filtros y sembradas en un gradiente (□-□).*

Otro paso previo a la separación de los tumores primarios por gradientes de densidad consistió en determinar si las variaciones en las densidades celulares pueden ser atribuídas al estado proliferativo de la población celular. Para ello se

determinó el perfil de densidad de la línea T-47D durante la fase estacionaria y durante la fase logarítmica. Pudimos observar que el patrón de separación de las células por densidad es muy similar en ambas situaciones. Asimismo la medición del TLI confirmó la fase de crecimiento, ya que éste fue del 42% en fase logarítmica y del 3,4% en fase estacionaria, confirmando que a pesar de que las células en fase estacionaria han quedado detenidas en su gran mayoría en  $G_0 - G_1$  y no se dividen, no han modificado su densidad, al menos dentro de la sensibilidad del método.

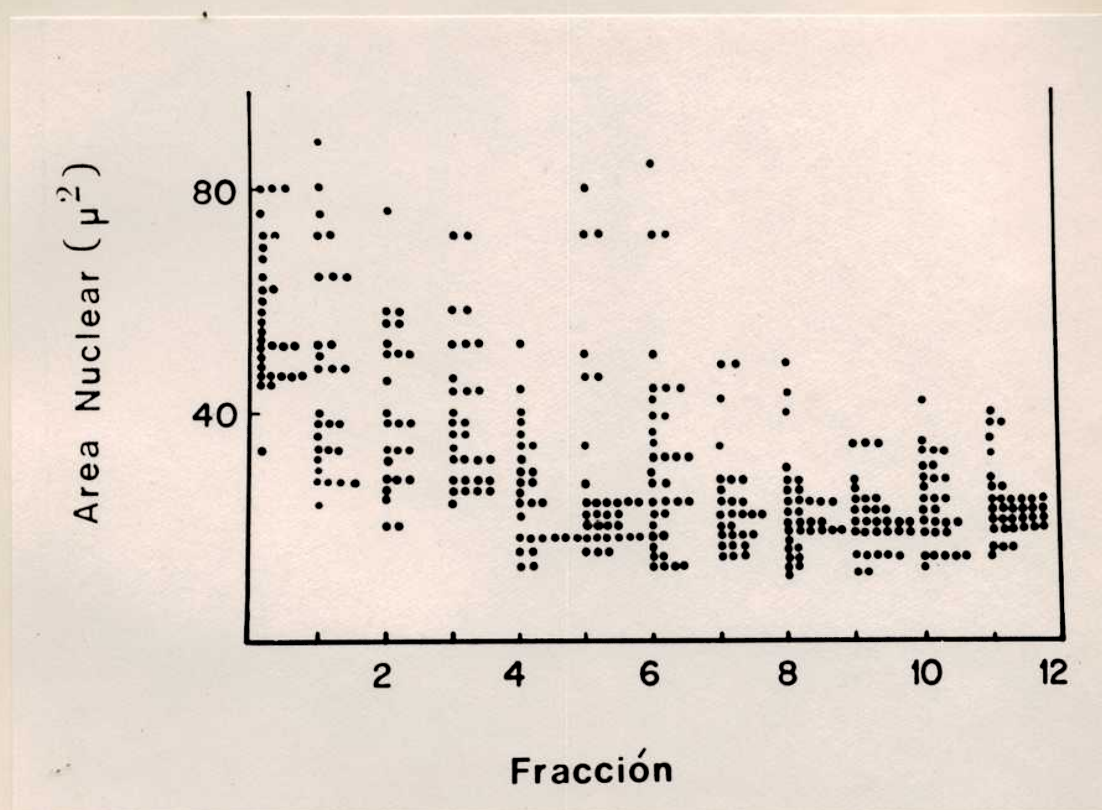
### **III.b. Separación de los tumores primarios**

Luego de que las células aisladas de los diferentes tumores fueran centrifugadas en los gradientes de albúmina, se determinaron los diferentes marcadores en todas las fracciones como se describió en Métodos. La metodología empleada incluyó la centrifugación de las células en los gradientes, seguido de la inclusión y el corte por micrótopo de los precipitados celulares. Debido a que estos precipitados no son uniformes y podría existir una distribución desigual de las células de acuerdo a su tamaño (205), pusimos especial cuidado en obtener cortes representativos de todo el precipitado celular.

### **III.c. Relación entre densidad y superficie nuclear**

La figura 18 ejemplifica la relación existente entre la densidad celular y la superficie nuclear. Se puede observar que las mayores superficies nucleares se obtienen en las células de menor densidad; a medida que la densidad aumenta, la superficie nuclear de las células disminuye progresivamente. Las cuatro fracciones de mayor densidad poseen células con superficies nucleares que son la mitad de las que se observaron en las células de menor densidad. Luego de teñir las células con eosina pudimos observar que las células grandes de baja densidad, po-

seían en general citoplasmas altamente vacuolados, un fenómeno que no pudo ser observado en células con densidades intermedias y altas.



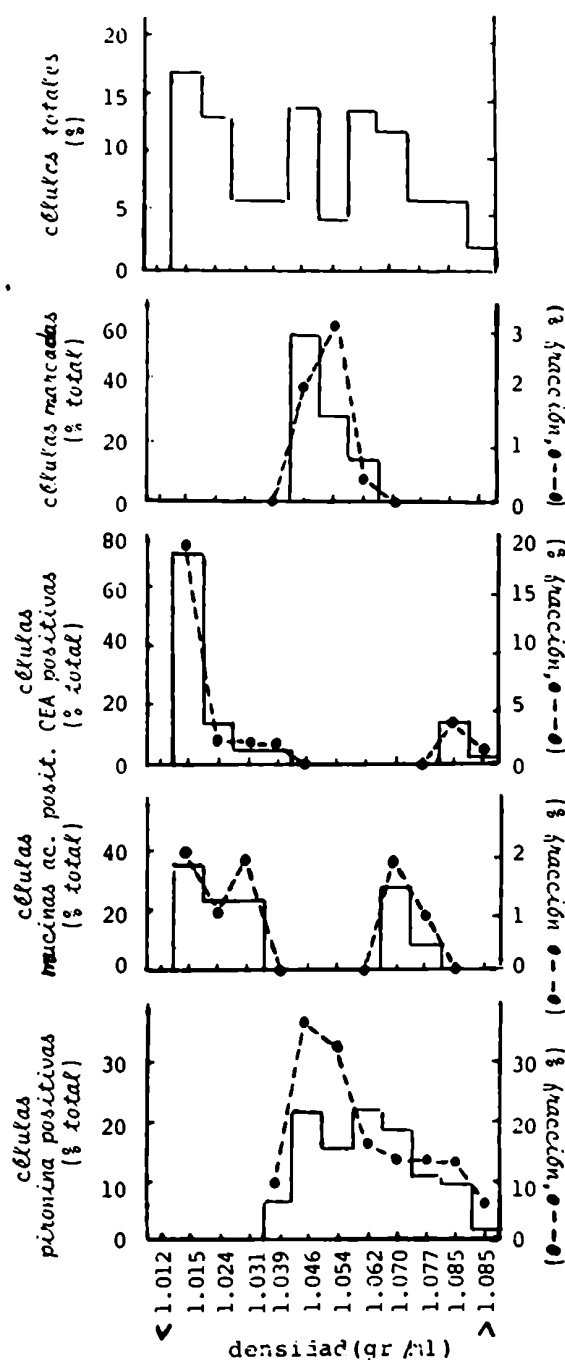
**Figura 18.** Correlación entre la densidad celular y el área nuclear. Se determinó el diámetro de 25-35 células por fracción con un micrómetro ocular a un aumento de X 1000 usando un microscopio Zeiss 516. El área se determinó según  $A = \pi Dd/4$ ,  $D$ : diámetro mayor,  $d$ : diámetro menor.

### **III.d. Expresión de CEA - RE y TLI en suspensiones celulares**

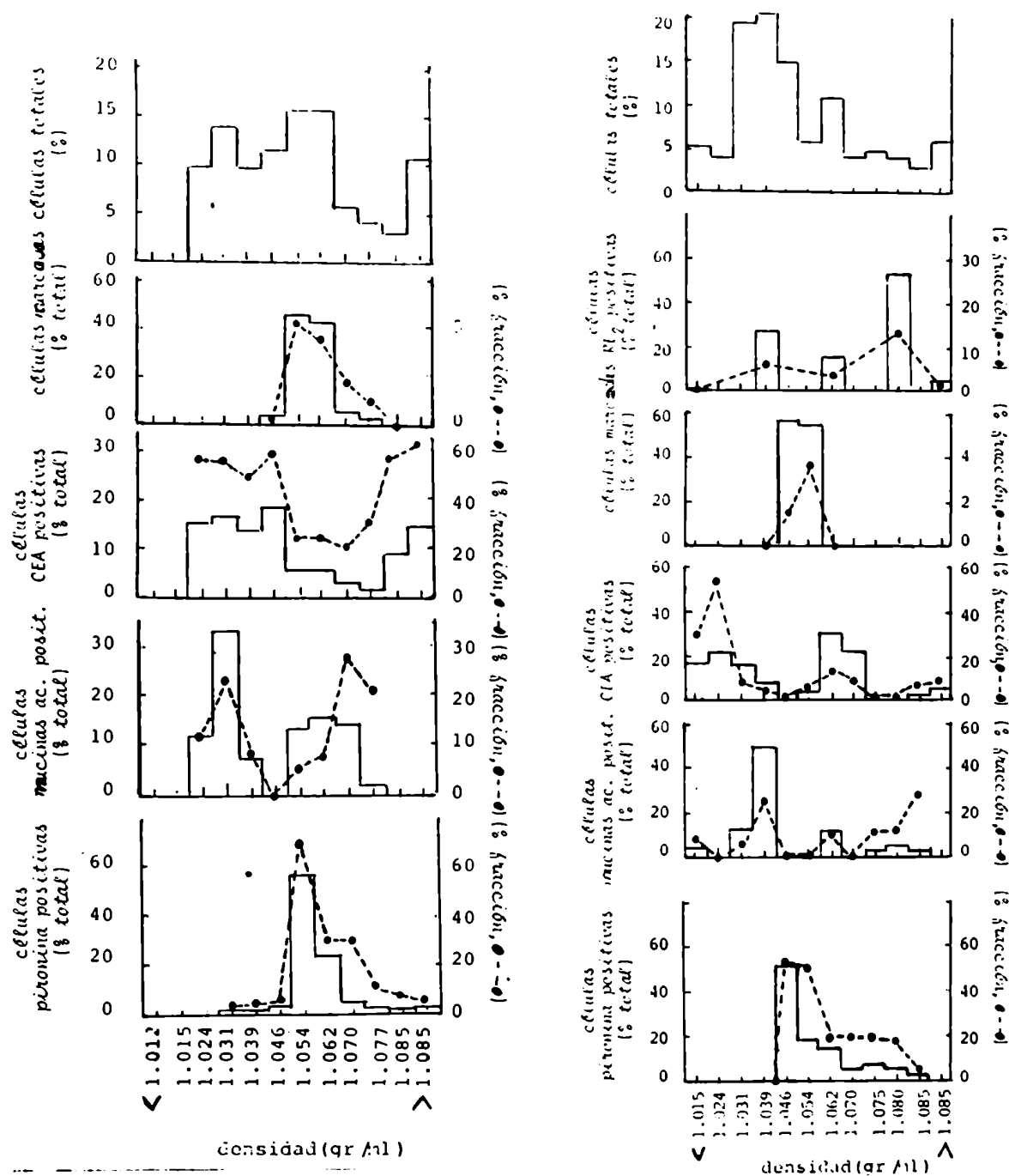
En las figuras 19 y 20 se observa la expresión de los diferentes marcadores en los pacientes 1, 3 y 5. En estos tres casos no se pudo medir la incorporación de  $^3\text{H-E}_2$  debido al bajo número de células obtenidas luego del tratamiento enzimático. En general se puede decir que la dispersión de células a lo largo de los gradientes fue muy heterogénea, muy diferente a lo que habíamos visto en líneas celulares en cultivo. Esta heterogeneidad también se observa en la expresión de los diferentes marcadores, aunque se vislumbra que la expresión de éstos se halla circunscripta a determinadas zonas del gradiente.

Estos datos fueron confirmados cuando los tumores fueron también incubados en presencia de  $^3\text{H-E}_2$  (casos 2, 4, 6 y 10, figuras 21 y 22) ya que se pudo ver que las células que poseen receptores no se encuentran dispersas a lo largo de todo el gradiente sino que se localizan en una parte del mismo. Por último las figuras 23, 24 y 25 muestran también la presencia de otros tres tumores en los cuáles se midió la expresión de diversos parámetros tanto en el primario, así como en una metástasis ganglionar.

Resultan muy evidentes las diferencias entre cada paciente, empezando por las variaciones en el porcentaje de células en cada una de las fracciones. Sin embargo y con el objeto de facilitar el desarrollo de los resultados se decidió hacer un promedio con los datos más importantes que permitiera un análisis más general, para luego hacer mayor hincapié en lo específico de cada tumor.



**Figura 19.** *Separación y caracterización de células de cáncer de mama en gradientes de densidad. El TLI, la positividad para CEA, mucinas ácidas y pironina se obtuvo como se describe en Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas por fracción y como porcentaje del total de células positivas (caso 1.).*



**Figura 20.** Separación y caracterización de células de cáncer de mama en gradientes de densidad. Ver figura 19. Los datos corresponden al caso 2 (izquierda) y 3 (derecha). En el 3 se determinó también la expresión de RE por autorradiografía.

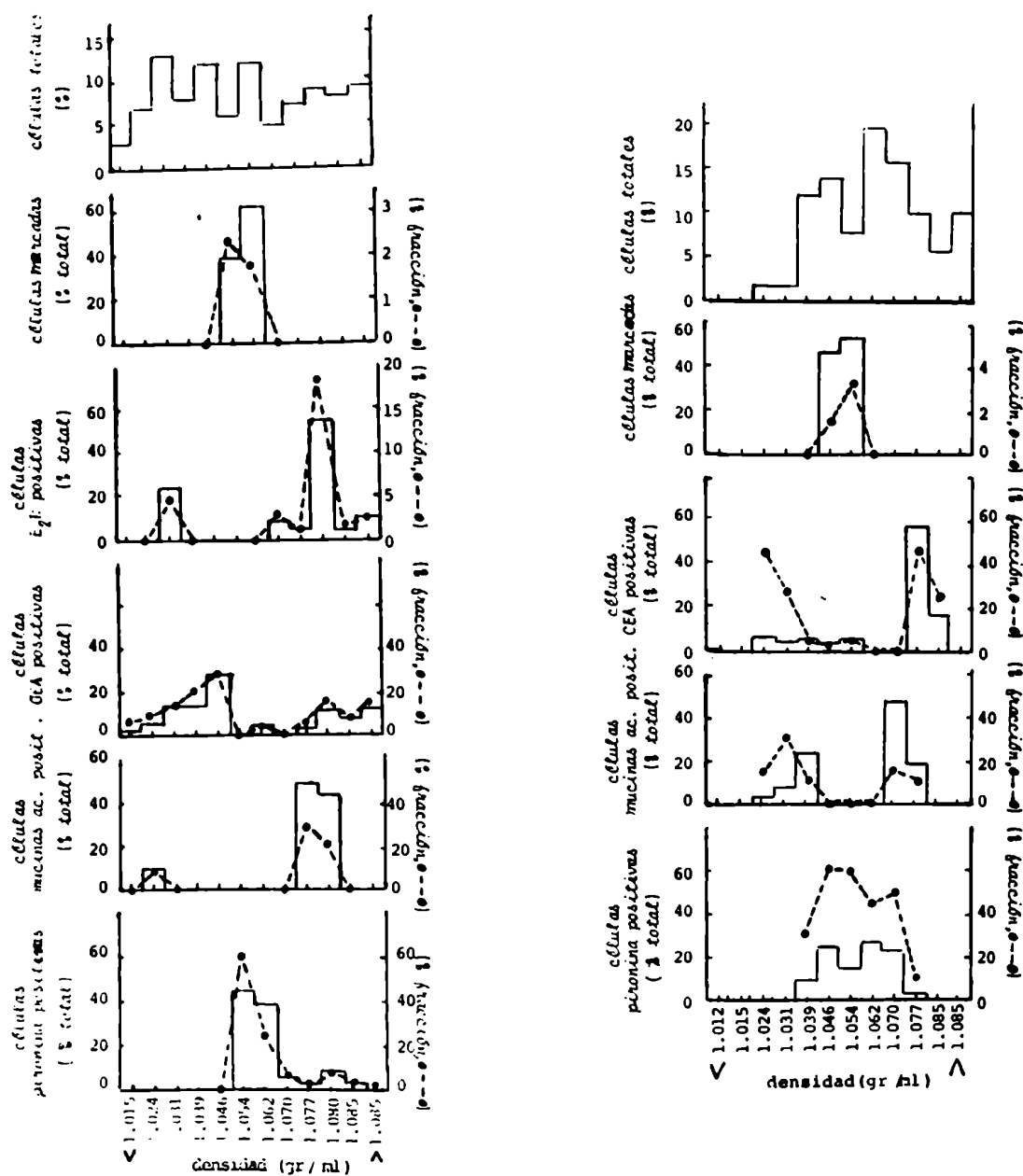


Figura 21. Separación y caracterización de células de cáncer de mama en gradientes de densidad. Ver figura 20, casos 4 (izquierda) y 5 (derecha).



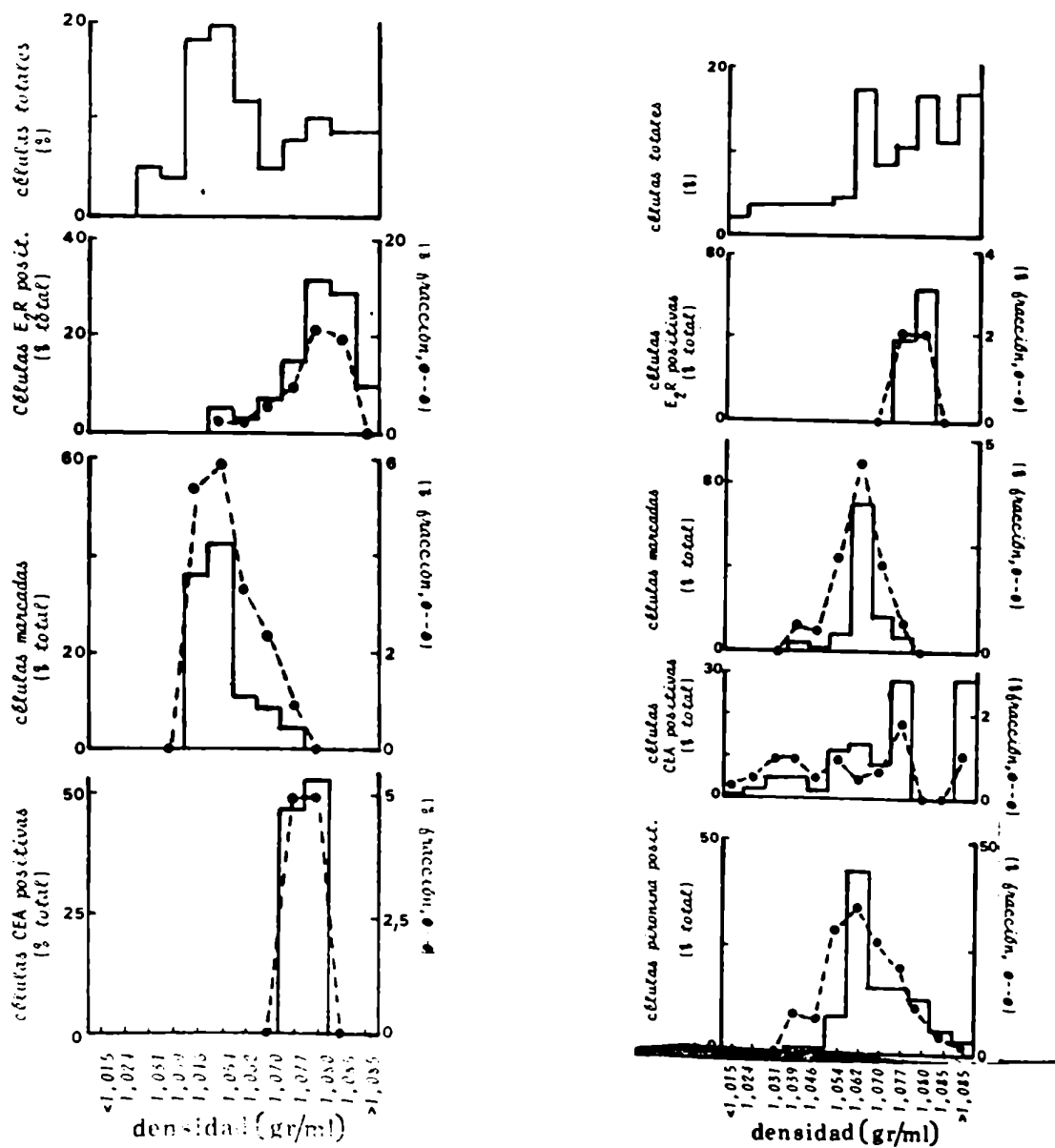
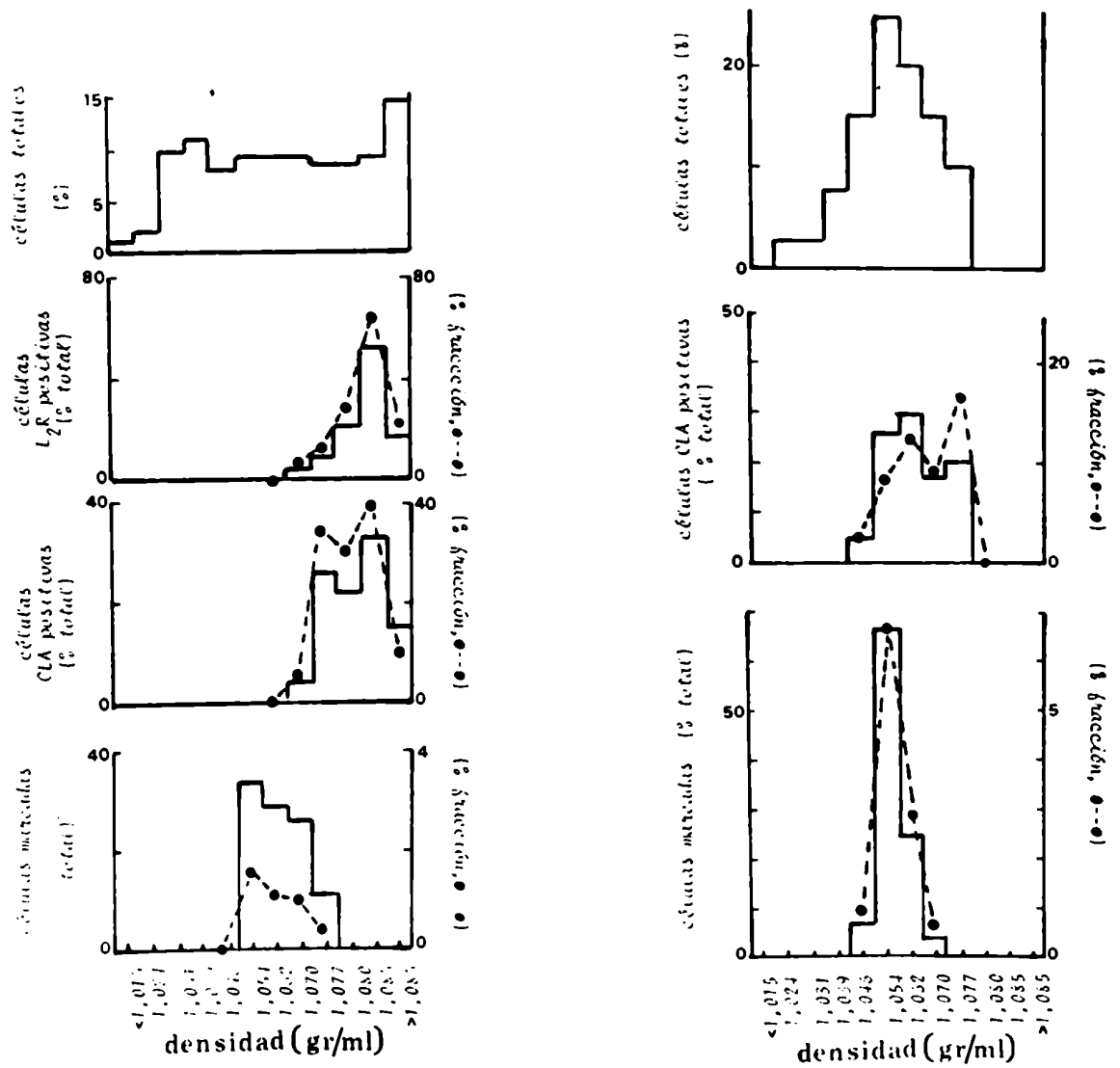


Figura 22. Separación y caracterización de células de cáncer de mama en gradientes de densidad. (Ver figura 20, casos 6 (izquierda) y 7 (derecha)).



**Figura 23.** Separación y caracterización de células de cáncer de mama primario y metastásico en gradientes de densidad. Ver figura 20. caso 8, tumor primario (izquierda) y metástasis (derecha).

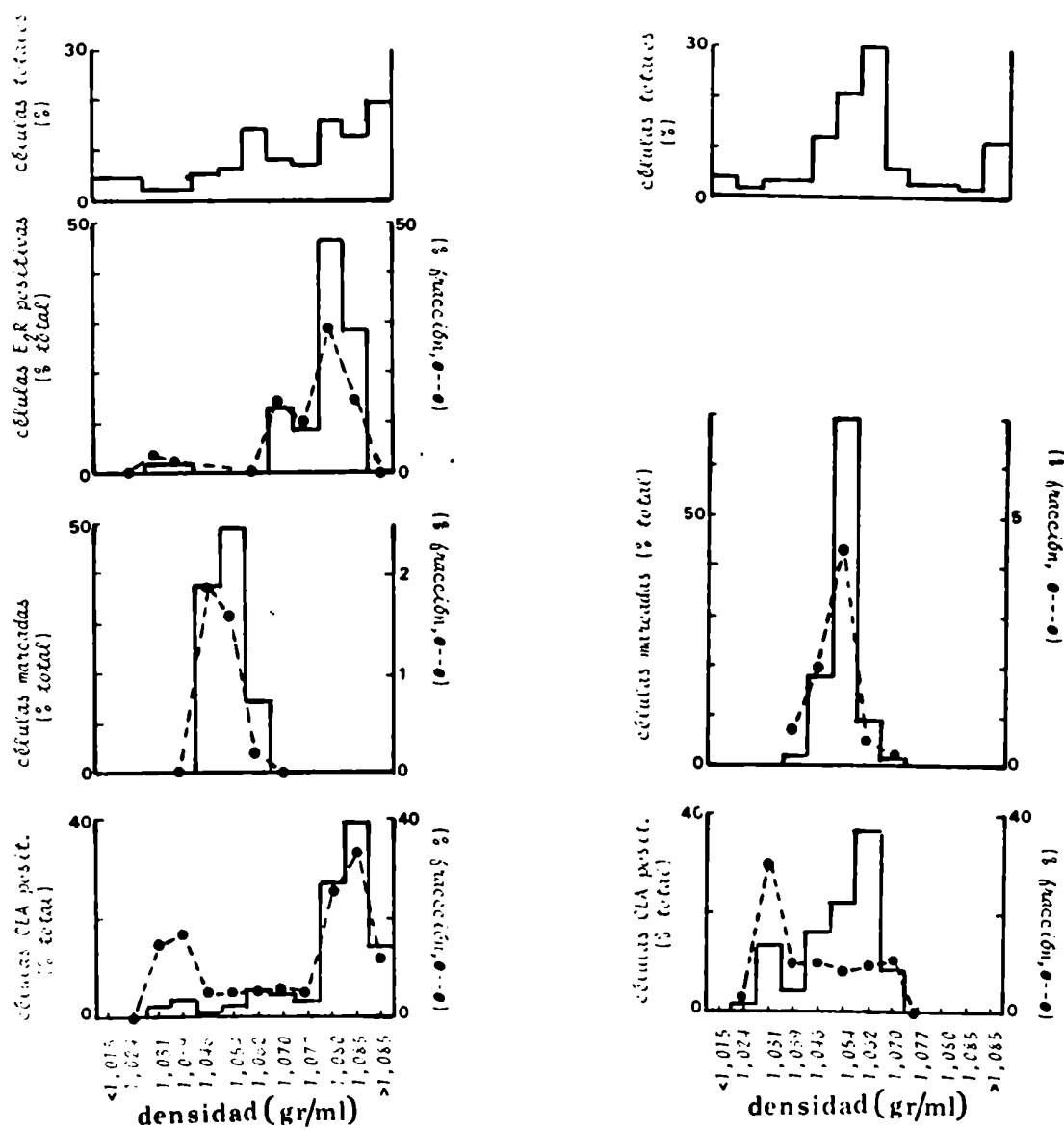


Figura 24. Separación y caracterización de células de cáncer de mama primario y metastásico en gradientes de densidad. Ver figura 20. caso 9, tumor primario (izquierda) y metástasis (derecha).

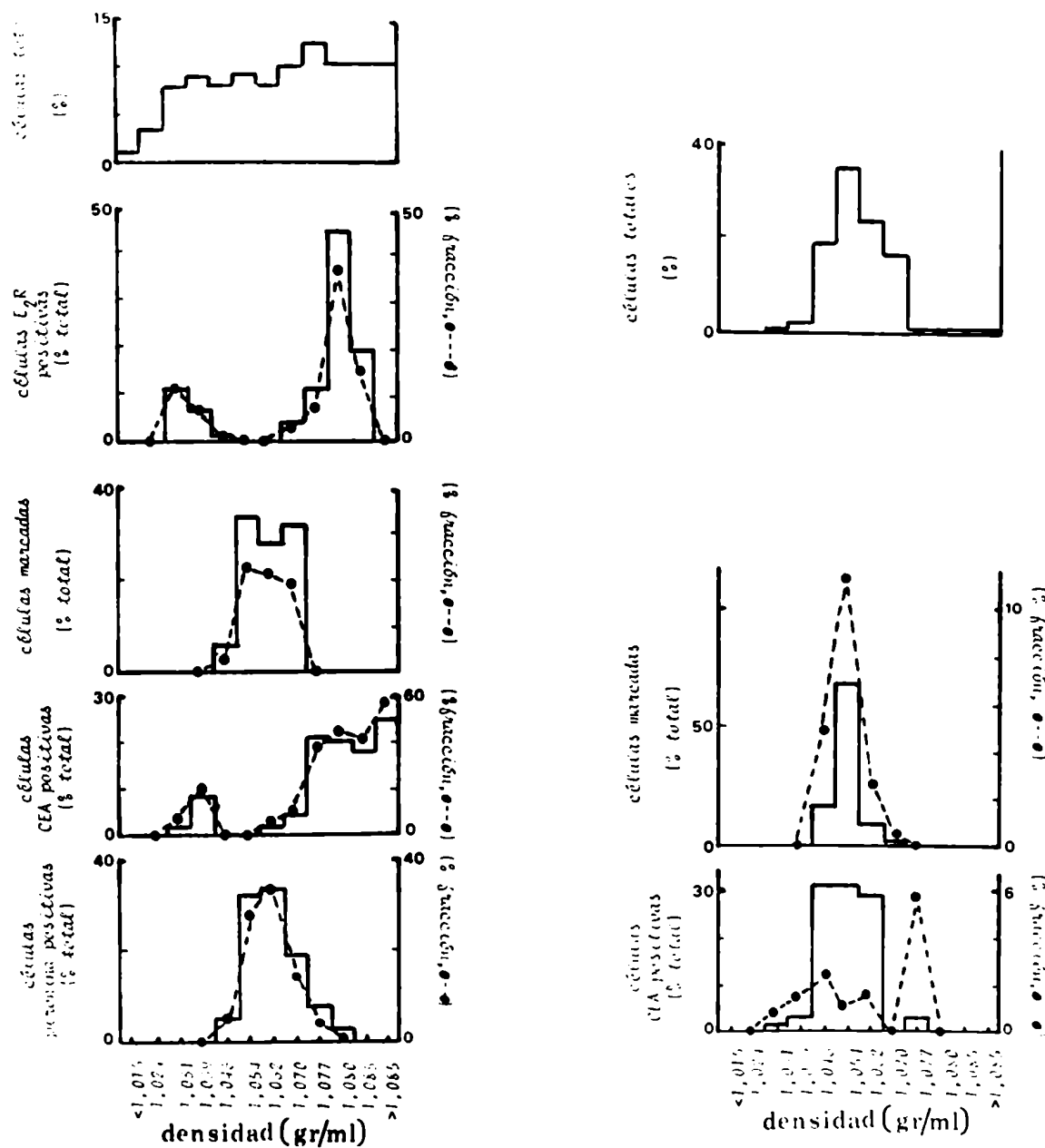
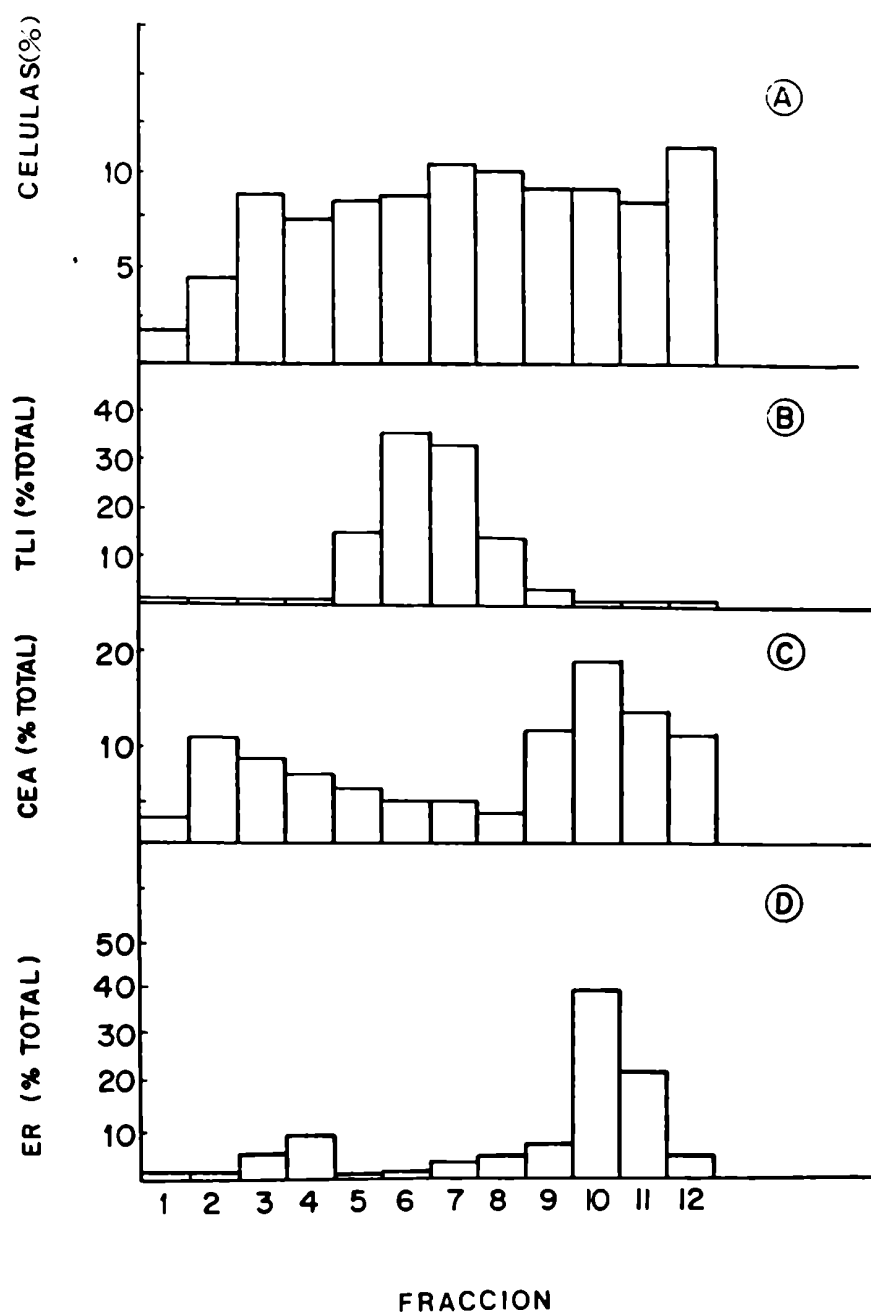


Figura 25. Separación y caracterización de células de cáncer de mama primario y metastásico en gradientes de densidad. Ver figura 20, caso 10, tumor primario (izquierda) y metastasis (derecha).

Los resultados completos de los diez pacientes cuyos tumores primarios fueron analizados se encuentran en la tabla 5. Para cada fracción se muestra su densidad y la media  $\pm$  la desviación estandar (D.S). En lo que respecta al TLI, CEA y RE, los resultados se expresan en las dos formas en que fueron presentados los histogramas, es decir: como porcentaje de células positivas por cada fracción (% por fracción) y como porcentaje de células positivas del total de la población de células positivas (% del total). De los resultados es posible ver que existe una considerable variabilidad entre los diferentes pacientes, lo que se vió reflejado en las altas D.S. Asimismo la figura 26 A-D muestra el promedio obtenido para los parámetros más importantes: distribución celular a lo largo del gradiente, índice de marcación con timidina (% del total), expresión de CEA (% del total) y presencia de RE (% del total).

A pesar de que se encontraron variaciones entre los diferentes tumores, no caben dudas de que la mayor parte de las células que incorporaron  $^3\text{H}$ -tim estuvieron confinadas en todos los tumores, a una zona de densidad intermedia que en general fue la de 1,046 a 1.054 g/ml (Tabla 5 y figura 26B). Como se puede observar en los diferentes casos estudiados, el grupo de células que fue positivo para la tinción con pironina, resultó tener una distribución en el gradiente similar a la de las células que incorporan  $^3\text{H}$ -tim. En lo que respecta a los marcadores de diferenciación celular, en el panel C de la figura 26 y en la tabla 5 se muestra el promedio de la distribución de CEA intracitoplasmático a lo largo del gradiente. A pesar de que se observó una gran variación en el porcentaje de células que expresan CEA al comparar las fracciones de los diferentes tumores (la variación es mayor que la del TLI, posiblemente por las diferencias en el contenido total de CEA entre cada tumor) (tabla 4) se encontró que la mayor frecuencia de células positivas para CEA estaba localizada en las fracciones de baja y alta densidad. A pesar de que



**Figura 26.** *Caracterización de las subpoblaciones celulares en cáncer de mama. Se muestra la distribución promedio. Los datos se expresan como el porcentaje del total de células positivas.*

**Tabla 5.** Determinación de T.L.I., CEA y RE en supoblaciones celulares aisladas

Fracción	Número de células	T.L.I.		células C.E.A. +		células R.E. +	
		% total	% fracción	% total	% fracción	% total	% fracción
1	1,8±1,7 (a)	0	0	2,1±5,0	4,0±9,9	0	0
2	4,6±4,6	0	0	10,7±21,11	8,4±16,9	0	0
3	8,8±5,2	0	0	8,1±6,2	14,9±19,1	5,5±7,8	3,0±3,9
4	7,7±4,1	0,2±0,6	0,1±0,2	7,1±5,7	15,1±16,8	9,3±17,0	3,5±4,5
5	8,6±3,5	14,8±18,9	1,1±1,6	7,1±5,7	9,2±16,0	0,2±0,4	0,2±0,6
6	8,6±3,3	35,7±16,8	2,4±1,4	4,3±6,0	7,6±16,9	1,2±2,6	0,2±0,4
7	10,5±3,8	33,3±29,3	2,5±1,7	4,6±4,8	5,6±7,7	3,2±5,5	1,3±2,6
8	10,2±4,5	13,1±14,0	1,2±1,4	2,9±2,7	5,6±2,7	5,0±4,0	4,7±4,5
9	9,4±3,7	2,5±3,6	0,4±0,7	11,7±14,8	11,5±14,6	7,8±4,8	5,8±4,4
10	9,4±3,3	0,4±1,2	0,1±0,4	19,0±19,4	20,4±18,2	40,0±11,9	28,9±10,3
11	8,7±3,6	0	0	13,2±12,9	21,5±18,4	22,8±17,9	18,8±23,8
12	11,5±4,4	0	0	10,6±8,1	16,8±23,1	5,2±5,7	3,0±4,2

Los gradientes de densidad de BSA y la recolección de fracciones se describe en Métodos. Las células tumorales fueron contadas en un hemocitómetro.

La distribución de las células positivas para RE es un promedio de los tumores 2, 4, 7, 8, 9, y 10.

(a) promedio ± desvío standard (% del total de células).

existe una superposición en las fracciones de densidad intermedia entre las células que incorporan  $^3\text{H}$ -tim y las que expresan CEA (comparar los paneles B y C, figura 26 y los respectivos casos individuales) no se observó ninguna célula que haya incorporado  $^3\text{H}$ -tim en su DNA y que expresara simultáneamente CEA intracitoplasmático. Es de hacer notar que en todos los casos, el porcentaje de células positivas para CEA en cada fracción fue siempre mayor que el de las que fueron marcadas con  $^3\text{H}$ -tim (tabla 5). Además es importante mencionar que las fracciones 9 a 12 concentran alrededor del 47 % de las células CEA positivas, mientras que las fracciones 1 a 4 de baja densidad, solo el 27 %.

En lo que respecta a la detección de RE, la mayor parte de las células positivas están localizadas en la zona de alta densidad (fig. 26D); sin embargo células grandes de baja densidad expresan alrededor del 15% del total de RE (tabla 5); la ligera superposición que se observa entre el TLI y la expresión de RE resulta ser insignificante o nula en cada tumor en forma individual. Como se puede ver, no se incluyó el caso 6 (figura 22) debido a que el contenido total de RE era negativo (tabla 4), lo que fue efectivamente confirmado ya que en el gradiente realizado con este tumor se encontró solo un 2 % de células positivas para RE en las fracciones 9 y 10.

La figura 27 muestra dos fracciones de células obtenidas de un tumor incubado con  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> y cuyas células fueron separadas por gradientes de albúmina. La parte inferior muestra la fracción 1 del gradiente de albúmina, que evidentemente no posee células que contengan RE, ya que la marca nuclear en presencia de  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> solo, no difiere de la que se obtuvo incubando en presencia de  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> y un exceso de DES. En la parte superior del gráfico podemos ver que las células de la fracción 10 del mismo tumor incorporan  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> en niveles mucho más importantes. Además se nota claramente el desplazamiento hacia un menor número de granos por núcleo, cuando se incubó en presencia de  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> y exceso de DES. Este desplazamiento indica que el  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> ha sido incorporado en forma específica.



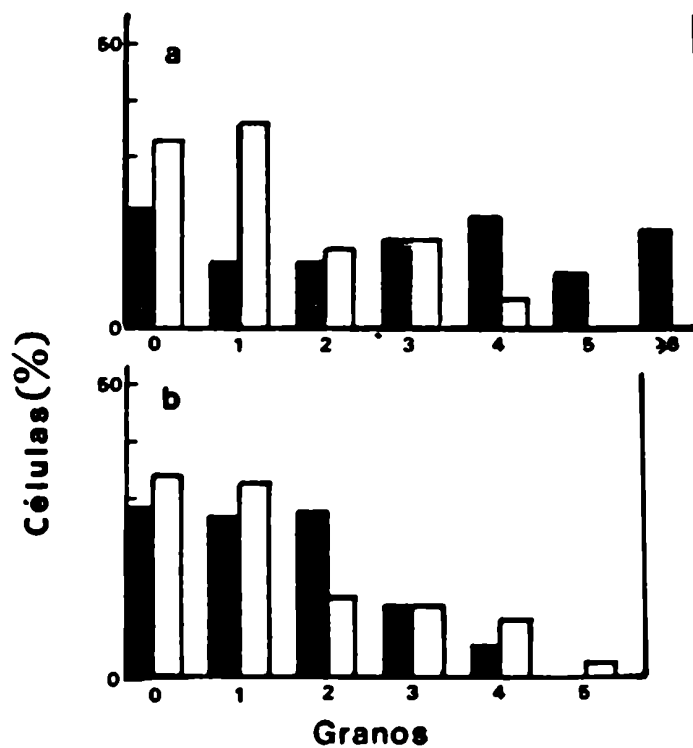


Figura 27. *Determinación de RE por autoradiografía en suspensiones celulares. Se cuentan 200 células incubadas con  $^{174}\text{E}_2$  (■) o  $^{174}\text{E}_2 + \text{OES}$  (□) en cada fracción: (a) fracción 10 del caso 4; (b) fracción 1 del mismo caso.*

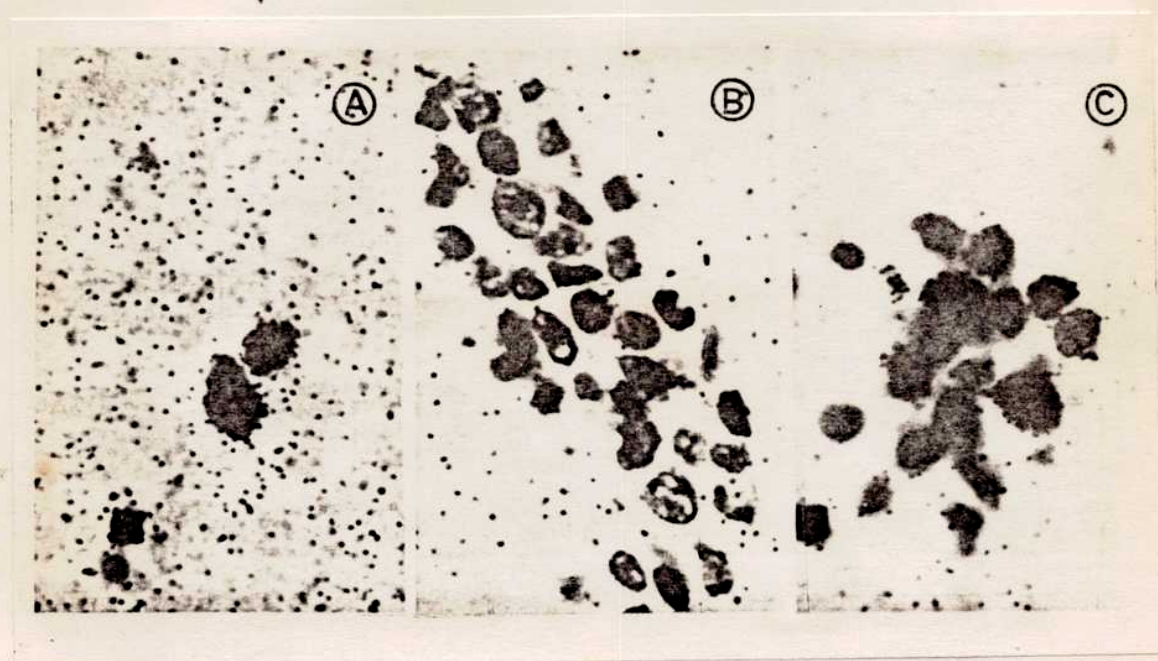
Uno de los datos más importantes que surge de estos resultados es que la subpoblación de células que se encuentra en activa proliferación llega a equilibrio a una densidad menor y diferente de aquellas células que poseen receptores estrógenos. A pesar de que la presencia de CEA y de RE está asociado con la diferenciación celular, los resultados muestran que no existe una completa superposición en la expresión de ambos marcadores. Se puede ver que cuando se comparan el porcentaje de células positivas para cada marcador, los resultados son diferentes en cada una de las fracciones, siendo la distribución de las células positivas para CEA mucho más heterogénea que la de células con RE.

Un estudio en detalle de la expresión de ambos marcadores demostró que mientras en las fracciones de baja y alta densidad, las células podían no expresar ningún marcador o solo uno de ellos, una proporción (que fue diferente en cada tumor) de las células de alta densidad expresó simultáneamente CEA intracitoplasmático y RE (por ejemplo: en el caso 4, el 45 % de las células RE positivas fueron también CEA positivas).

En la figura 28 se ven microfotografías de células representativas de las fracciones 7 y 4 que han sido incubadas en presencia de  $^3\text{H}$ -tim y teñidas para CEA como se describió en los Métodos. Las células de la fracción 7 poseen sus núcleos fuertemente marcados con  $^3\text{H}$ -tim, su citoplasma es escaso y no expresan CEA. Las células de la fracción 4 poseen un aspecto heterogéneo, en algunas el citoplasma es abundante y contiene CEA. No se observó incorporación de  $^3\text{H}$ -tim en el DNA en ninguna de ellas. En la misma figura se pueden ver células de la fracción 10 que fueron marcadas con  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> y teñidas para CEA. La mayor parte de la marca específica de  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> se encuentra localizada en el núcleo, aunque se observa algo de marca en el citoplasma. Las células están ordenadas en dicha figura en la forma en que pensamos ocurre la diferenciación celular.

### **III.e. Estudios sobre ganglios metastásicos**

En las figuras 23, 24 y 25 se puede ver la dispersión de células a lo largo de un gradiente de seroalbúmina y la expresión de CEA e incorporación de  $^3\text{H}$ -tim de dichas células en cada uno de los gradientes de tres ganglios conteniendo metástasis.



**Figura 28.** *Microfotografía de células aisladas con incorporación de  $^3\text{H}$ -tim,  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> y expresión de CEA. A y B, fueron marcadas con  $^3\text{H}$ -tim y teñidas para CEA, corresponden a la fracción 7 y 4 respectivamente. C, células marcadas con  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> y teñidas para CEA, fracción 10. Aumento X 1000.*

En estas tres metástasis es posible observar que la variabilidad en la distribución celular a lo largo del gradiente no es tan grande como en los tumores primarios. En los tres casos las células tienden a concentrarse en la mitad del gradiente y prácticamente no se observan células de bajas o altas densidades. Es interesante resaltar que este patrón de distribución se asemeja bastante al que se observó con las líneas celulares en cultivo.

Todas las células que incorporaron  $^3\text{H}$ -tim se ubicaron en la mitad del gradiente en las mismas densidades que se habían observado en los tumores primarios (como se observa en las figuras respectivas). Comparando con las fracciones del primario, se nota un aumento de 2 a 3 veces en el porcentaje de células que incorporan  $^3\text{H}$ -tim.

En lo que respecta a la expresión de CEA, se observa en líneas generales que decayó en forma muy importante en los 3 casos. La desaparición de la subpoblación de células de altas y bajas densidades produce un desplazamiento de tal manera que el pequeño porcentaje de células que expresa CEA se encuentra casi totalmente superpuesto con aquellas que incorporaron  $^3\text{H}$ -tim. Es de hacer notar sin embargo, que a pesar de esta superposición, no se observó ninguna célula con  $^3\text{H}$ -tim y expresión simultánea de CEA.

En general los tamaños de los núcleos celulares que componen las metástasis fueron más grandes que los de los primarios pero a la vez más homogéneos (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos utilizando suspensiones celulares a partir de cáncer de mama humano permiten extraer las siguientes conclusiones parciales:

- \* la distribución de células en un gradiente de isodensidad es muy heterogénea.
- \* la subpoblación celular que expresa en mayor proporción marcadores de diferenciación (CEA, RE) está compuesta por células pequeñas y de alta densidad; sin embargo un porcentaje de células grandes y baja densidad también expresa RE ó CEA.
- \* por otra parte las células proliferantes se encuentran dentro de una subpoblación de células de tamaño y densidad intermedia.

#### **IV. Efecto estrogénico sobre la proliferación tumoral**

##### **IV.a. Inducción proliferativa por diferentes concentraciones de estradiol**

Los resultados previos obtenidos en este trabajo de Tesis demostraron que el segmento de células que se encuentra en activa proliferación en cáncer de mama no expresa receptores estrogénicos. La presencia de dichos receptores fue asociada en mayor medida a un segmento de células diferenciadas parte de las cuáles también expresaba CEA y en menor medida a un segmento de células de mayor tamaño y baja densidad.

Debido a que estudios previos realizados especialmente sobre líneas celulares demostraron el efecto mitogénico del estradiol surgió inmediatamente la pregunta si la ausencia de RE en células proliferantes estaría indicando que los estrógenos no poseen efectos mitogénicos en el cáncer de mama humano.

Debido a la importancia de este tema, no solo desde el punto de vista del análisis de los mecanismos de proliferación tumoral sino también desde el terapéutico, decidimos intentar el estudio de los efectos estrogénicos en nuestro sistema. Diversos trabajos habían demostrado que concentraciones fisiológicas de estradiol inducirían el "reclutamiento" de células en  $G_0 / G_1$  y su entrada en ciclo. El tiempo de entrada de estas células a fase S fue calculado en alrededor de 9-11 horas en la línea celular de cáncer de mama MCF7 (207). Por lo tanto decidimos incubar tumores primarios de cáncer de mama durante 18 horas en presencia de diferentes concentraciones de estradiol.

En las tablas 6 y 7 se presentan los datos de todos los tumores incubados durante 18 horas. Los tumores fueron divididos en aquellos con valores positivos de RE (tabla 6) y el resto con valores negativos (tabla 7).

En 6 casos no se consiguió determinar el contenido total de RE por diversos motivos (escaso material remitido, fragmento no tumoral, etc.). Como se observa, no en todos los casos pudimos realizar todas las determinaciones debido a la insuficiencia del material recibido.

La clasificación histológica de los tumores fue la siguiente: 18 fueron tumores ductales, 7 NOS, 4 lobulillares y 1 tubular. Veintidós tumores fueron gradados como bien diferenciados, 15 de los cuáles correspondieron a los tumores RE positivos. Siete tumores fueron gradados como moderadamente diferenciados, 4 de ellos correspondientes a los RE positivos, mientras que solo un tumor fue considerado indiferenciado, siendo RE negativo. Usando un valor límite de 10 f moles/mg de proteína, 19/30 pacientes fueron RE positivos (63%). En las tablas 6 y 7 se puede observar el TLI de los diferentes tumores. Los tumores RE positivos tuvieron un TLI de  $0,71 \pm 1,19$  (promedio  $\pm$  D.S.) siendo el rango 0,2%-5,4%. Por otra parte los tumores RE negativos tuvieron un TLI promedio de  $1,4 \pm 1,47$  (rango 0,2%, -4,3%) no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p > 0,1$ ).

Luego de una incubación en presencia de diferentes concentraciones de  $E_2$  pudimos observar un incremento significativo (mayor de 30%) en el índice de captación de timidina (TLI) en la mayoría de los pacientes (20/30); en el caso de los tumores RE+, el incremento se produjo en 14/19 tumores con aumentos del orden de  $> 0,3$  hasta 7,5 veces más que en el control.

Con respecto a los tumores RE negativos,  $E_2$  tuvo efecto mitogénico en 6/11 (55%) con incrementos de  $> 0,3$  hasta 15,7 veces más que en el control. Además se observó que la concentración a la cual se produce el efecto fue indistintamente  $10^{-8}$  M ó  $10^{-9}$  M de  $E_2$ . Solo en dos casos (11 y 19, tabla 6) se produjo un significativo incremento a una concentración de  $10^{-7}$  M de  $E_2$ . Los datos obtenidos indican que no existe correlación entre el efecto proliferativo del estradiol y el contenido total de receptores estrogénicos (figuras 29 y 30).

Con el objeto de realizar un estudio global comparativo, en la figura 31 se muestra el efecto promedio de las diferentes concentraciones de estradiol sobre la proliferación celular. Se observa que en aquellos positivos para RE, el mayor efecto mitogénico se produjo a una concentración de  $10^{-8}$  M de  $E_2$ . Cabe señalar que  $10^{-7}$  M de  $E_2$  produjo un aumento promedio de alrededor del 50% aunque este valor

**Tabla 6.** *Efecto estrogénico y antiestrogénico sobre la proliferación del cáncer de mama humano. Los tumores fueron incubados como se describe en la sección Métodos. En esta tabla se muestran los tumores con contenido positivo de receptores estrogénicos (>10 fmoles/mg de proteína).*

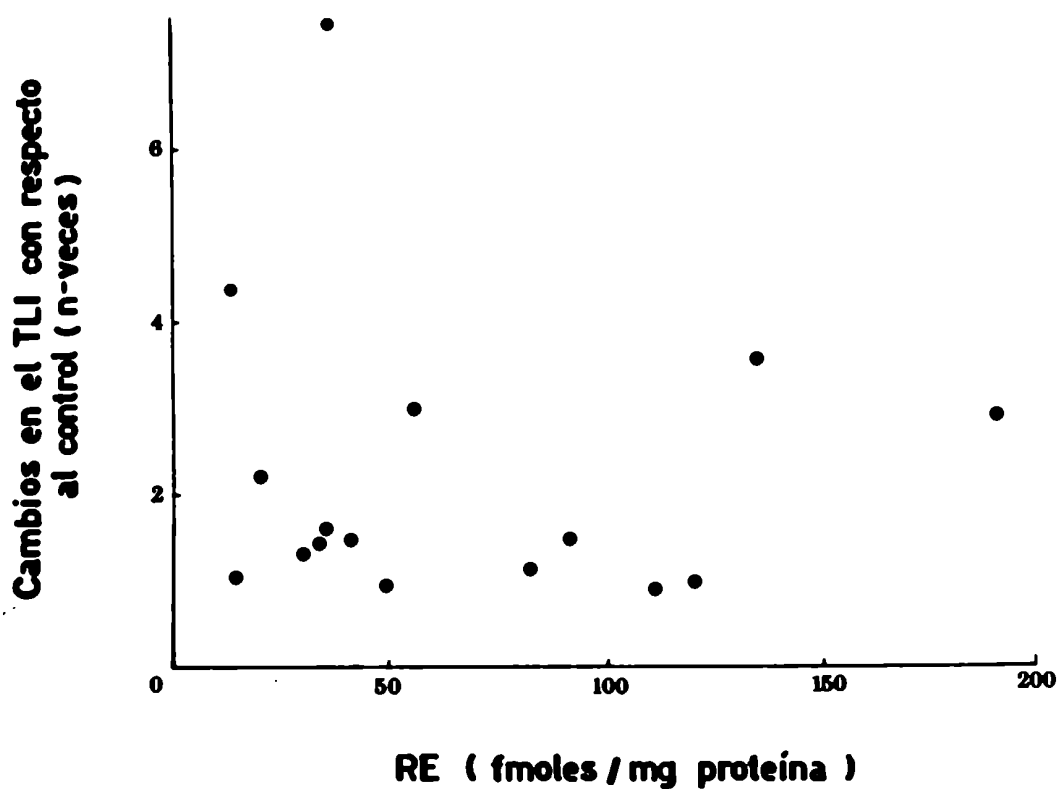
Caso	T.L.I	[ E <sub>2</sub> ]			10 <sup>-9</sup> M E <sub>2</sub>			10 <sup>-8</sup> M E <sub>2</sub>		
	Basal	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	+DES	+NAF	+TAM	+DES	+NAF	+TAM
Incremento (n veces)										
1	5.4	0.8	1.2	0.81	1.2	-	-	-	-	-
2	1.5	1.5	3.0	1.3	-	-	-	-	-	-
3	0.5	1.6	7.8	0.8	1.0	-	-	-	-	-
4	0.3	3.8	1.6	0.8	1.6	-	-	-	-	-
5	0.2	3.8	-	-	1.2	-	-	-	-	-
6	0.2	5.6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1.0	0.9	1.5	0.8	1.0	-	-	-	-	-
8	0.7	0.7	0.9	1.0	1.2	-	-	0.9	-	-
9	0.2	1.1	2.8	0.6	1.1	1.2	0.8	2.4	0.6	1.1
10	0.25	1.0	4.3	-	1.0	-	-	1.0	-	-
11	0.2	3.7	2.2	7.4	1.6	-	-	2.2	-	-
12	0.2	5.1	7.5	1.5	3.2	0.9	1.7	5.5	6.0	1.7
13	0.4	0.8	1.0	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0	0.8	1.2
14	0.5	0.8	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8
15	0.7	3.2	1.5	-	-	-	-	-	-	-
16	0.6	2.6	1.4	-	1.6	0.9	0.9	-	-	-
17	0.3	1.2	1.5	0.9	1.1	1.1	0.9	1.2	0.9	0.9
18	0.1	1.3	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	0.9
19	0.1	2.1	3.6	2.3	1.7	1.4	1.4	2.3	1.4	1.4

**Tabla 7.** *Efecto estrogénico y antiestrogénico sobre la proliferación del cáncer de mama humano. Los tumores fueron incubados como se describe en la sección Métodos. En esta tabla se muestran los tumores con valores negativos de RE.*

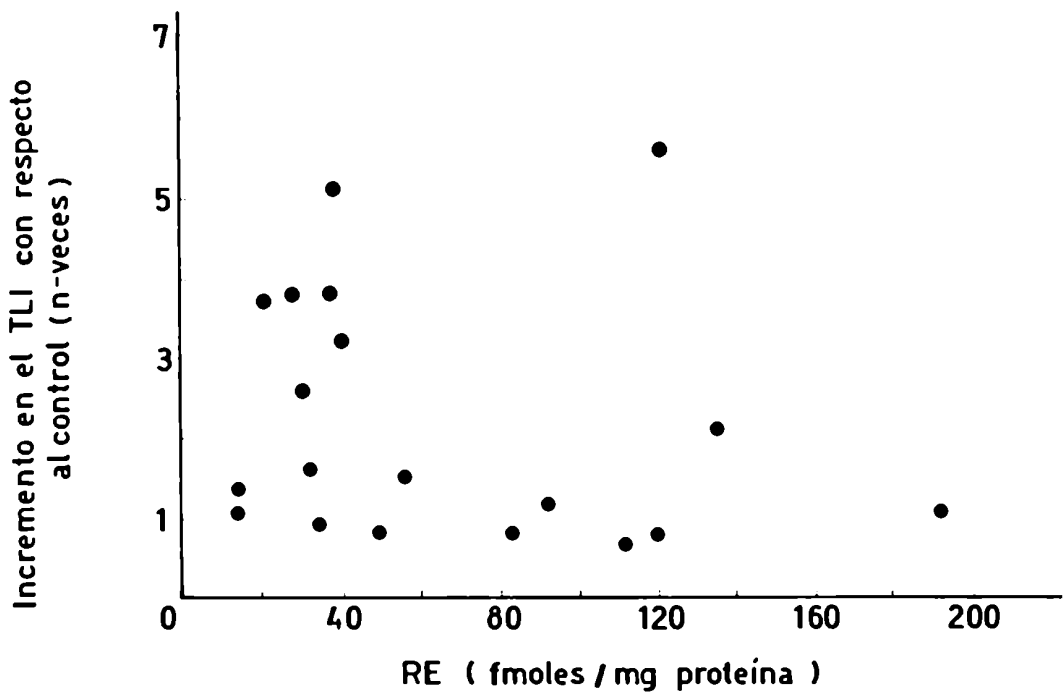
Caso	T.L.I.			$10^{-9}$ M $E_2$			$10^{-8}$ M $E_2$			
	Basal	[ $E_2$ ]		+DES	+NAF	+TAM	+DES	+NAF	+TAM	
	Z	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	Incremento (n veces)					
1	0,4	3,2	-	-	1,5	-	-	-	-	-
2	0,4	1,1	2,4	0,8	1,1	-	-	-	-	-
3	4,3	1,0	1,2	0,9	0,9	-	-	-	-	-
4	1,3	0,8	0,9	1,2	-	-	-	-	-	-
5	3,6	0,7	0,5	-	0,5	0,4	-	0,5	1,0	-
6	2,2	2,2	1,1	0,9	1,8	0,8	0,9	-	-	-
7	0,6	1,9	15,7	-	1,2	-	-	-	-	-
8	0,3	10,0	3,3	-	2,0	-	-	3,7	-	-
9	0,3	1,2	1,2	-	1,2	-	-	1,0	-	-
10	0,2	1,0	0,8	1,1	0,9	1,0	1,0	1,1	1,0	-
11	2,4	2,5	5,0	-	1,5	0,8	1,0	3,4	1,5	1,2



aumento en la proliferación tumoral producido por  $10^{-8}$  M y  $10^{-9}$  M de  $E_2$  fue prácticamente similar (fig. 33). Sin embargo en tumores RE negativos, mientras que el incremento en el TLI en presencia de  $10^{-9}$  M  $E_2$  fue de alrededor de 4 veces, este se incrementó hasta 6,6 veces en presencia de  $10^{-8}$  M de  $E_2$ , duplicando el aumento producido por similar concentración de  $E_2$  en tumores positivos para RE (fig. 33).



**Figura 30.** Incremento en el TLI por efecto estrógeno vs contenido total de RE.  
Ver figura 29. Se graficaron los tumores incubados en presencia de  $10^{-8}$  M  $E_2$ .

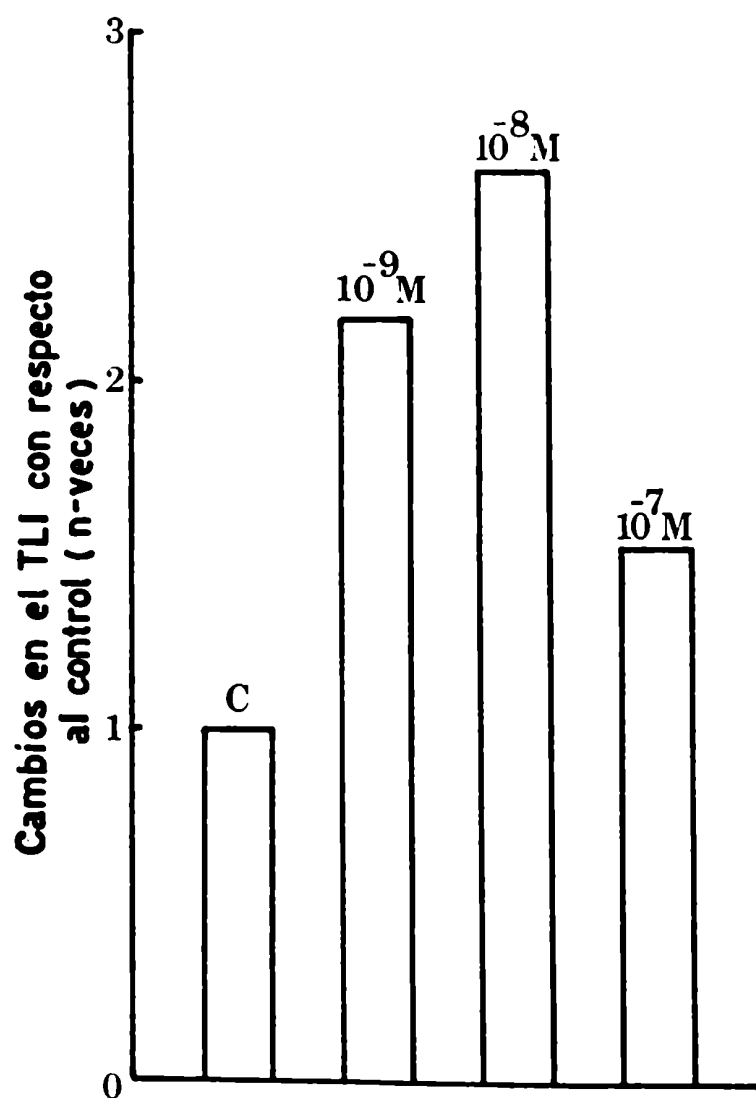


**Figura 29.** *Incremento en el TLI por efecto estrógeno vs contenido total de RE. Se graficaron todos los tumores RE positivos incubados en presencia de  $10^{-9}$  M  $E_2$ . El incremento se expresa en unidades arbitrarias con respecto al control.*

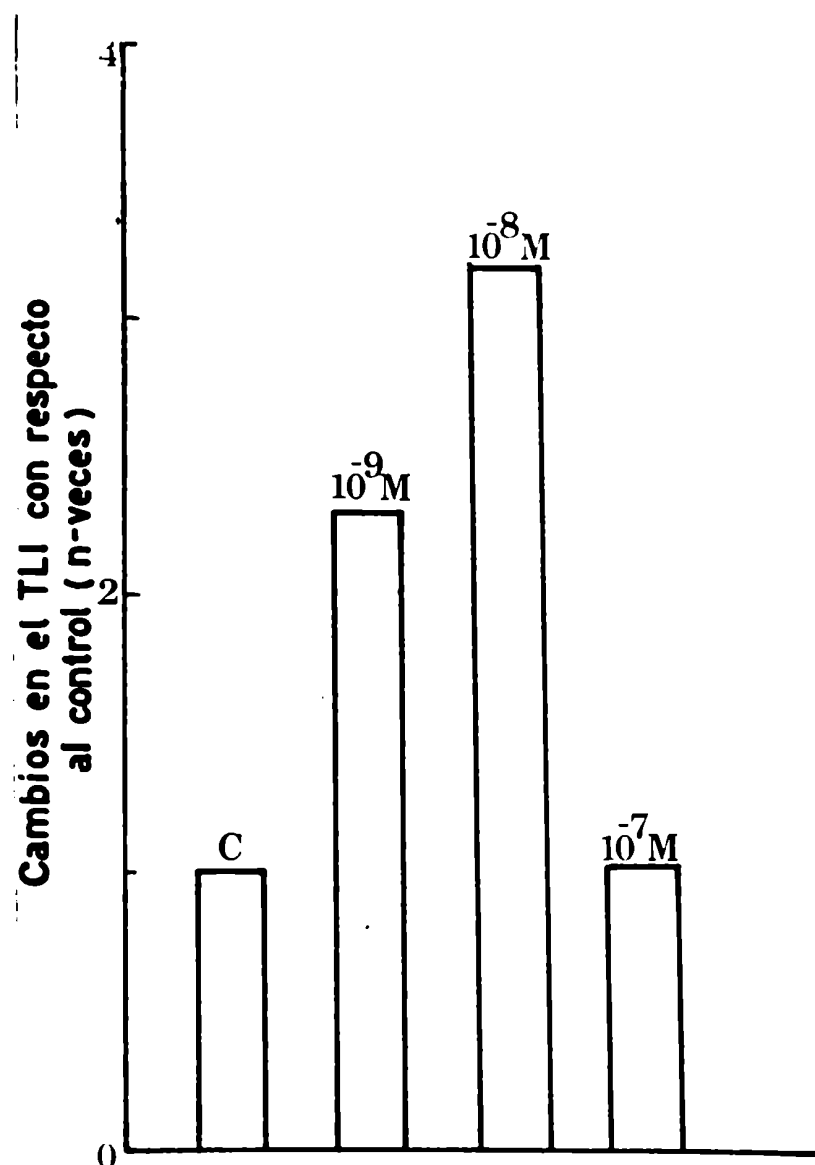
es el resultado del efecto producido en los casos 11 y 19.

La figura 32 muestra que los estrógenos también poseen un efecto de inducción proliferativa en carcinomas primarios de mama RE negativos. Este efecto que en principio podría ser inexplicable será analizado durante la discusión. El mayor efecto se observa también a una concentración de  $10^{-9}$  M mientras que  $10^{-7}$  M de  $E_2$  no posee ningún efecto.

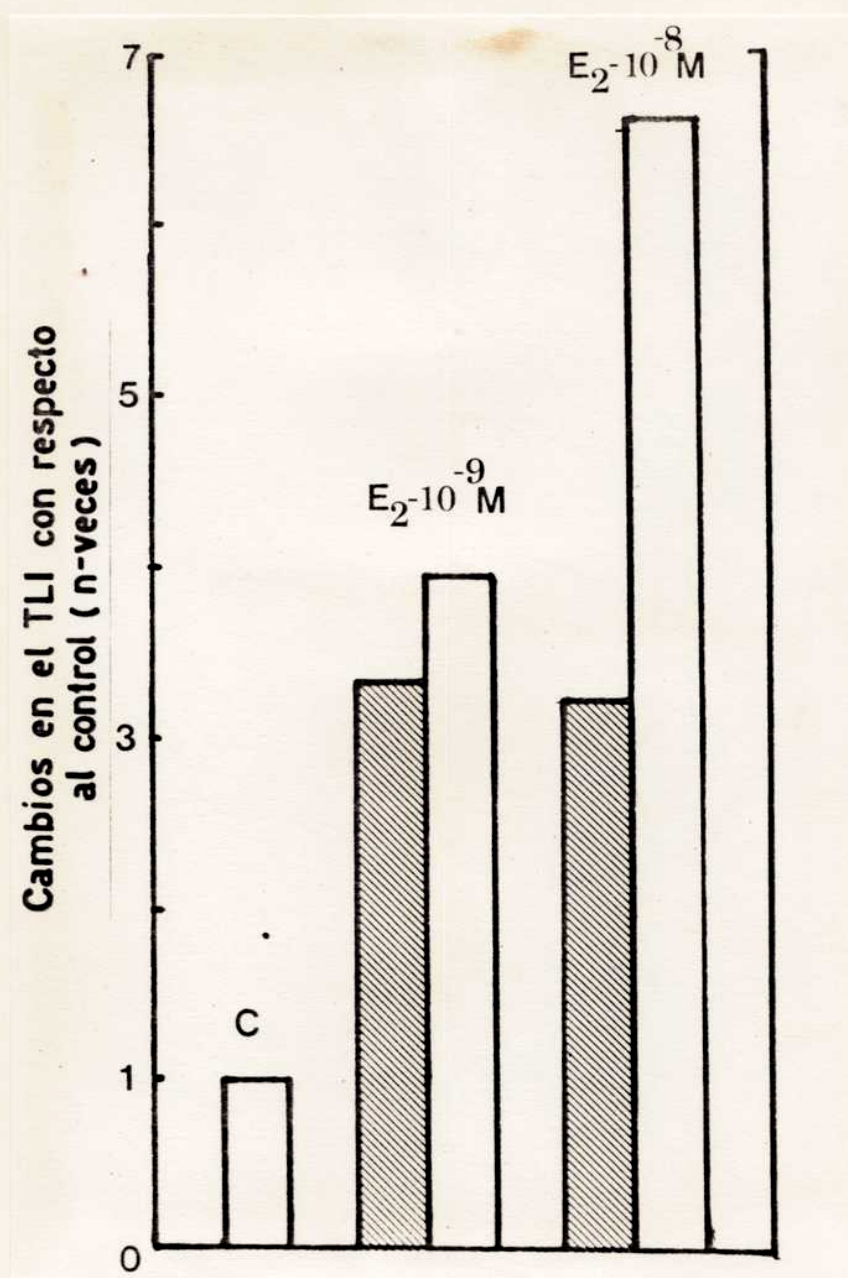
La particularidad de los datos previamente analizados fue que se tomaron en consideración todos los tumores estudiados. En una segunda serie de datos, nos remitimos solo a aquellos casos donde se produjeron aumentos en TLI por el efecto estrógeno. Como podemos ver en la serie de tumores positivos para RE, el



**Figura 31.** *Efecto estrogénico sobre la proliferación celular de tumores RE positivos.* Los datos corresponden al promedio de todos los tumores estudiados; C.) control; el efecto obtenido se expresa en unidades arbitrarias con respecto al control.



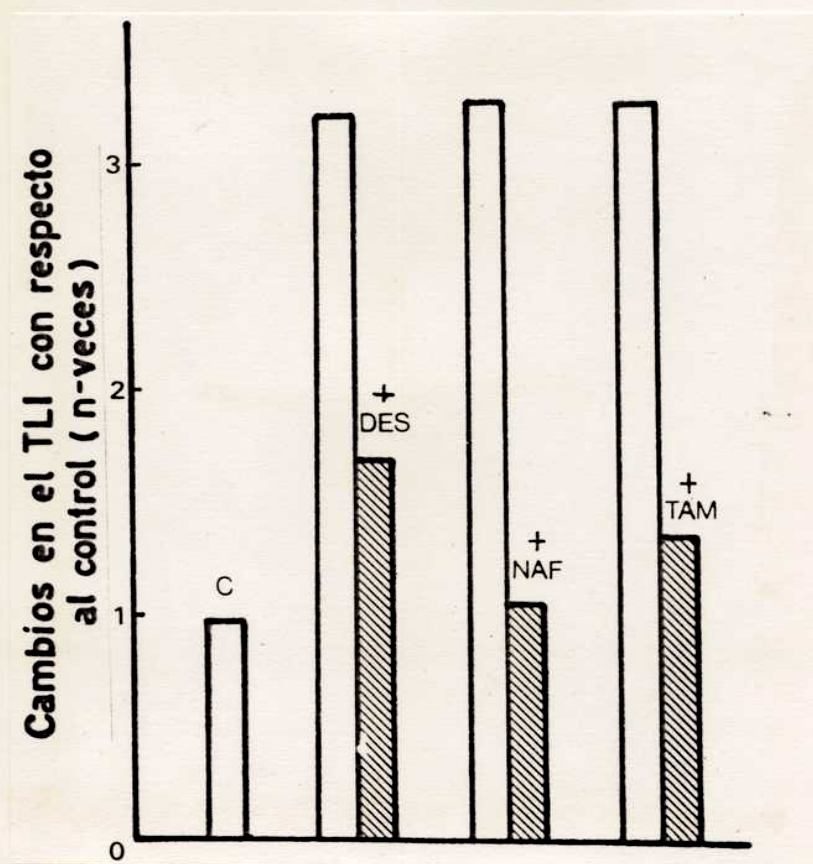
**Figura 32.** *Efecto estrogénico sobre la proliferación celular de tumores RE negativos. Ver figura 31*



**Figura 33.** Efecto estrogénico sobre la proliferación del cáncer de mama. Se grafican solo los tumores en los que se observó incremento en el TLI por efecto estrogénico a las diferentes concentraciones. ▨ ) promedio del incremento en tumores RE positivos; □ ) promedio en tumores RE negativos.

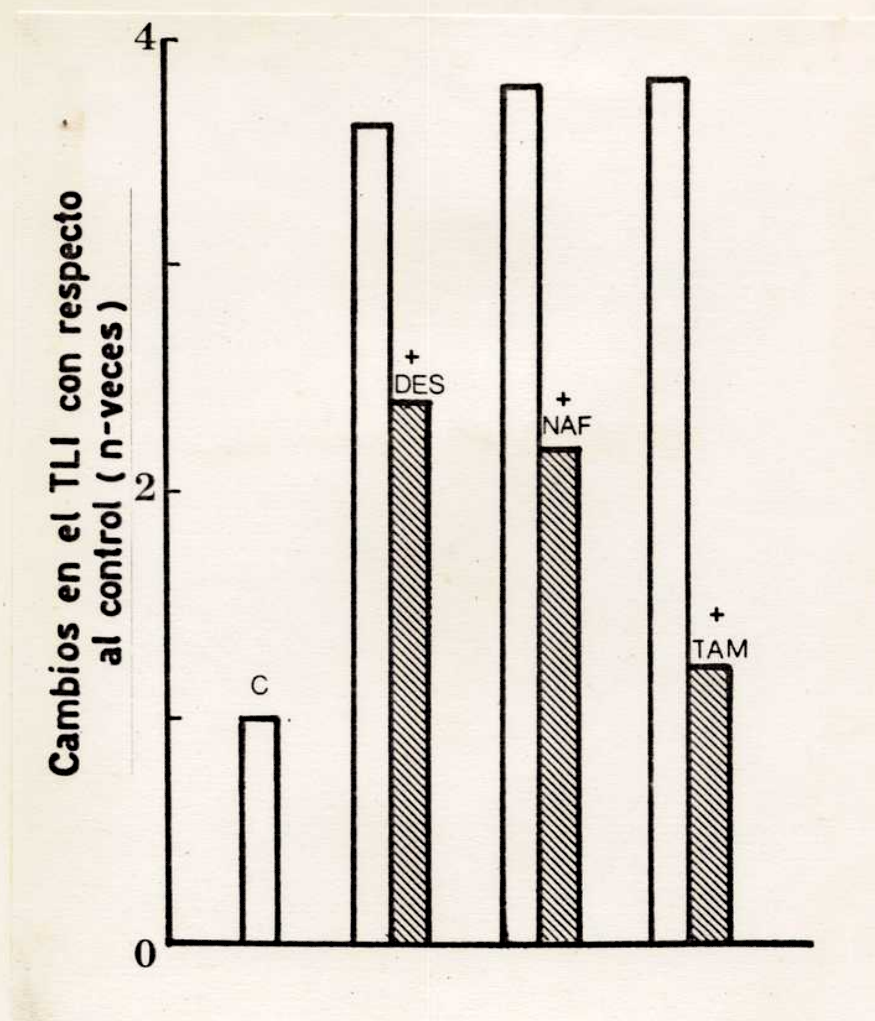
#### IV.b. Efecto de agonistas y antagonistas estrogénicos

Cuando analizamos los efectos inhibitorios producidos por agonistas o antagonistas estrogénicos en tumores RE positivos observamos que la mayor inhibición en presencia de  $10^{-9}$  M de  $E_2$  se obtuvo con el agregado de un exceso de nafoxidina que inhibió casi totalmente el efecto proliferativo inducido por  $E_2$ . La inhibición en presencia de tamoxifeno fue de alrededor del 85 % y se redujo al 69 % en presencia de DES (Fig. 34). Esta situación se revirtió parcialmente cuando se analizó el efecto de los inhibidores en presencia de  $10^{-8}$  M de  $E_2$ ; tamoxifeno produjo



**Figura 34.** Efecto de DES, NAF y TAM sobre el efecto proliferativo inducido por  $E_2$ . Los datos corresponden a tumores RE positivos incubados en presencia de  $10^{-9}$  M  $E_2$ ; □) efecto de  $E_2$  solo; ▨)  $E_2$  + inhibidor; DES (n=9 casos), NAF y TAM (n=3).

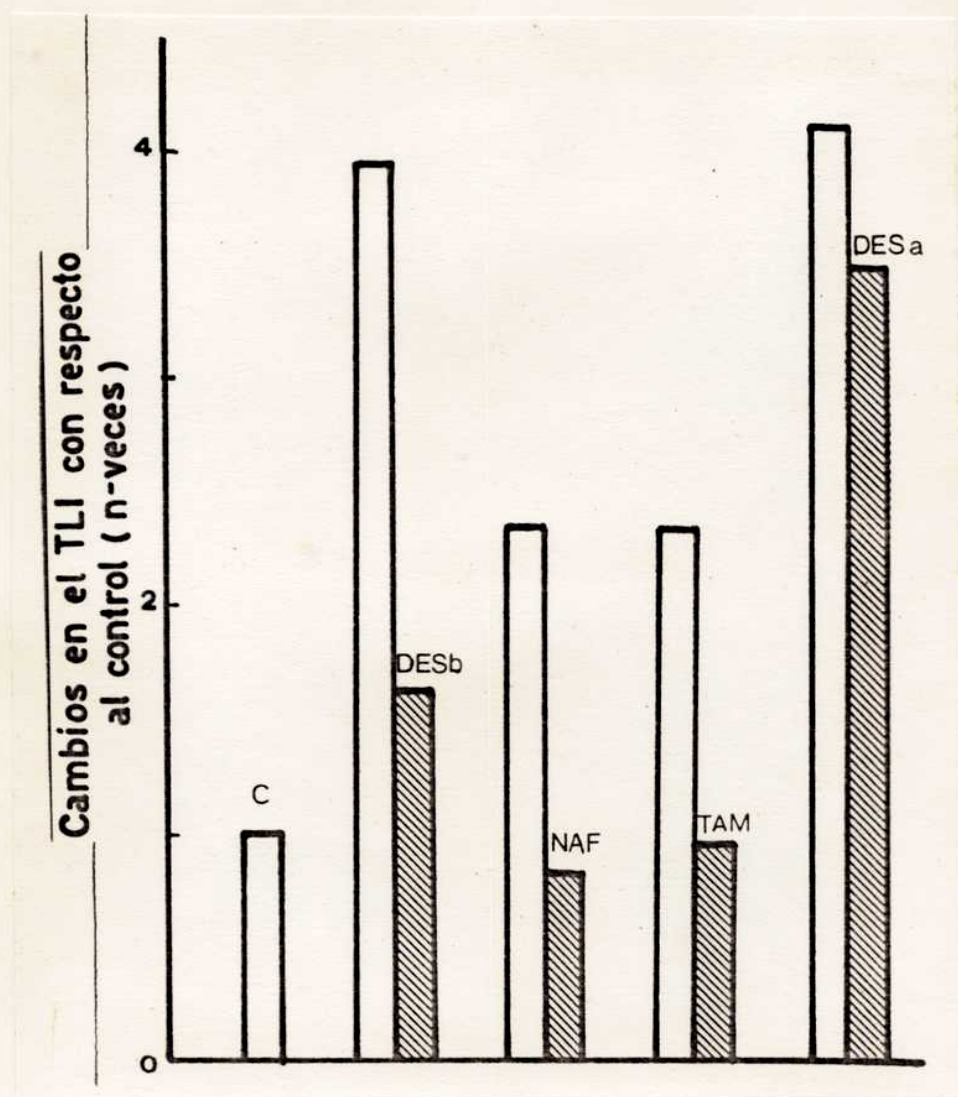
una inhibición de casi el 100 %, mientras que nafoxidina inhibió solo en alrededor de un 60 %. El agregado de DES produjo la menor inhibición que fue de alrededor del 45% (figura 35).



**Figura 35.** *Efecto de DES, NAF y TAM sobre el efecto proliferativo inducido por  $E_2$ . Los datos corresponden a tumores RE + incubados en presencia de  $10^{-6}$  M  $E_2$ : (□) efecto de  $E_2$  solo; (▨)  $E_2$  + inhibidor; DES (n=6), NAF y TAM (n=4).*

Estos datos fueron también analizados en los tumores RE negativos (figura 36). A una concentración de  $10^{-9}$  M de  $E_2$ , nafoxidina y tamoxifeno inhibieron totalmente el efecto estrogénico con la salvedad de que estos datos corresponden solo a dos casos. El agregado de DES produjo una inhibición de casi un 80 %. Merece destacarse asimismo que un exceso de DES no produjo prácticamente ningún e-

fecto inhibitorio sobre la actividad mitogénica de  $10^{-8}$  M de  $E_2$ . Los datos acerca de la inhibición producida por nafoxidina y tamoxifeno corresponden a un solo paciente y se puede observar que ambos antiestrógenos inhibieron casi totalmente el efecto producido por  $10^{-8}$  M de  $E_2$  (caso 11, tabla 7).

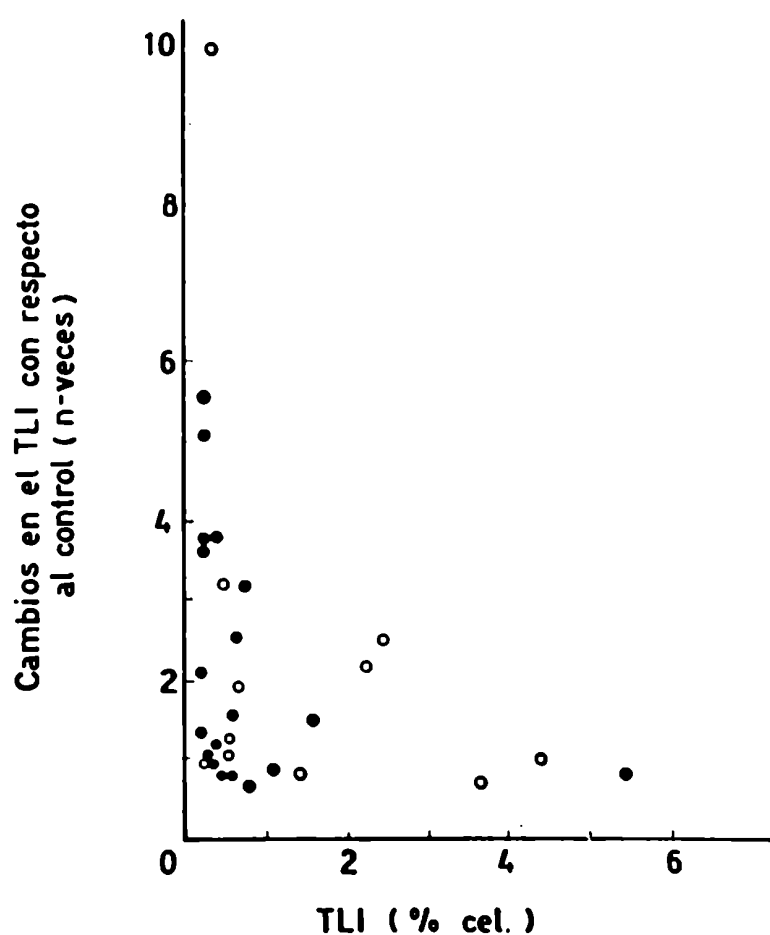


**Figura 36.** Efecto de DES, NAF y TAM sobre el efecto proliferativo inducido por  $E_2$ . Los datos corresponden a tumores RE negativos. DES a,  $10^{-8}$  M  $E_2$  (n=4); DES b,  $10^{-9}$  M  $E_2$  (n=5); NAF y TAM,  $10^{-9}$  M  $E_2$  (n=2).



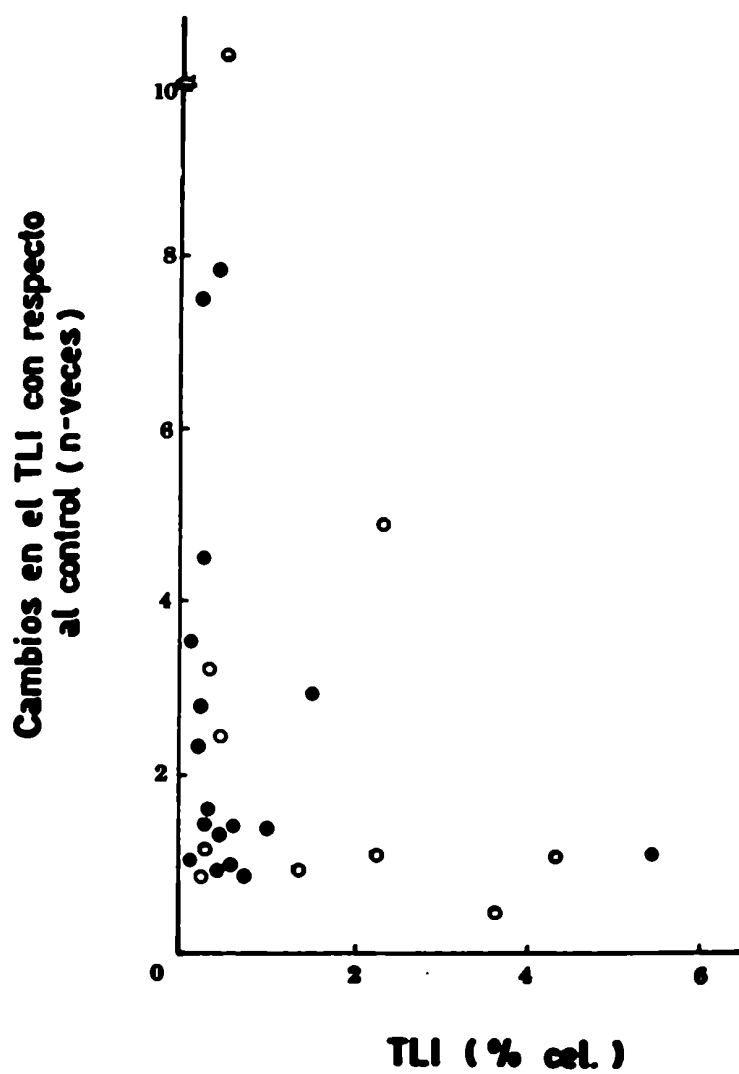
**IV.c. Correlación entre el nivel basal de TLI y el incremento en el TLI por efecto estrogénico**

Con el objeto de determinar si la variación en el TLI producida por el estradiol posee alguna relación con el nivel basal de TLI, ambos parámetros fueron comparados entre sí. Los resultados obtenidos muestran que existe una correlación inversa entre el aumento en el TLI por la inducción estrogénica y el nivel basal de TLI. Esta correlación inversa se evidencia tanto a  $10^{-9}M$  de  $E_2$  (fig. 37) como a



**Figura 37. Incremento en el TLI por efecto estrogénico vs TLI basal.** Se graficaron los datos de todos los tumores incubados en presencia de  $10^{-9}M E_2$ . El incremento está graficado en unidades arbitrarias con respecto al control. ●) tumores RE+; ○) RE-.

$10^{-8}$  M de  $E_2$  (fig. 38), parece ocurrir en forma independiente de la presencia de RE, siendo sin embargo más notable en aquellos tumores considerados RE negativos.



**Figura 38.** Incremento en el TLI por efecto estrogénico vs TLI basal. Corresponde a los datos de todos los tumores incubados en presencia de  $10^{-8}$  M  $E_2$ . Para más detalles ver figura 37.

#### **IV.d. Efecto estrogénico y expresión de ras p-21 y CEA**

Con el objeto de analizar con mayores detalles las características celulares de los tumores que fueron inducidos a una mayor proliferación por  $E_2$ , cortes histológicos fueron analizados para la expresión de ras p-21 y CEA. El análisis morfológico *in situ* demostró que las células "reclutadas" de la quiescencia por el  $E_2$  se asemejan a las que se encuentran normalmente ciclando en el momento de la excisión quirúrgica, es decir células de tamaño intermedio o grande, relación núcleo/citoplasma elevada y sin expresión de CEA. Por otro lado observamos que gran parte de las células reclutadas expresaron ras p-21. El análisis global de la expresión de ambos marcadores se ve en la tabla 8; los tumores RE positivos expresan ras p-21 en menor proporción que los RE negativos (67% contra 82%). A pesar de que es también menor el porcentaje promedio de células ras-p21 positivas en los tumores RE positivos, este dato no es estadísticamente significativo. Cuando los tumores RE positivos fueron discriminados entre aquellos que respondieron al  $E_2$  y los que no lo hicieron, el porcentaje promedio de células ras p-21 positivas resultó ser 3 veces menor en los tumores respondedores, siendo este dato estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias cuando se analizó el nivel de ras p-21 en tumores RE negativos respondedores y no respondedores. Un dato que cabe mencionar fue que el nivel de ras p-21 en los tumores RE positivos no respondedores fue similar al de los tumores RE negativos ( $33,5 \pm 33,7\%$  contra  $39 \pm 33,6\%$ ).

La expresión de CEA es mayor en tumores RE positivos que en los RE negativos, tanto en lo que respecta al porcentaje de tumores positivos como en el promedio de células CEA positivas. No se observaron diferencias cuando los tumores fueron discriminados en respondedores y no respondedores a  $E_2$  (tabla 8).

**Tabla 8.** *Efecto estrogénico y expresión de ras p-21 y CEA*

<b>Tumores</b>	<b>RE positivos</b>	<b>RE negativos</b>
ras p-21 positivos	67% <sup>a</sup> (12/18) <sup>b</sup>	82% (9/11)
<b>% de células positivas para ras p-21</b>		
a) todos los tumores	17 ± 25% <sup>c</sup> (18)	39 ± 33,6% (11)
b) tumores respondedores a E <sub>2</sub>	10,6 ± 19,1% (13)	41 ± 38,5% (5)
c) tumores no respondedores a E <sub>2</sub>	33,5 ± 33,7% (5)	37,3 ± 32,5% (6)
<hr/>		
<b>CEA positivos</b>	64% (16/19)	36% (4/11)
<b>% de células positivas para CEA</b>		
a) todos los tumores	29,9 ± 27,7% (19)	19,4 ± 26% (11)
b) tumores respondedores a E <sub>2</sub>	29,7 ± 27,2% (11)	16,8 ± 24,4% (6)
c) tumores no respondedores a E <sub>2</sub>	30,2 ± 29,2% (5)	22,5 ± 27,4% (5)

*a: porcentaje de tumores; b: número de tumores; c: promedio ± D. S.*

#### **V. Caracterización de células transicionales en tumores primarios de mama**

Como pudimos determinar al comienzo de estos estudios, el número de células positivas para CEA se encuentra inversamente relacionado con el índice de proliferación tumoral. Asimismo demostramos una correlación similar entre la presencia de RE y el valor de TLI. Uno de los datos más interesantes que habíamos

podido observar era que mientras que CEA y RE pueden ser expresados simultáneamente, no se observó ninguna célula que tuviera marcado su núcleo y que expresara CEA luego de una incubación durante 4 horas en presencia de  $^3\text{H}$ -tim. Sin embargo durante el estudio del efecto estrogénico sobre la proliferación del cáncer de mama, pudimos observar en los controles de ciertos tumores imágenes de células con precipitado de plata como resultado de la incorporación de  $^3\text{H}$ -tim y que expresaban CEA en forma simultánea.

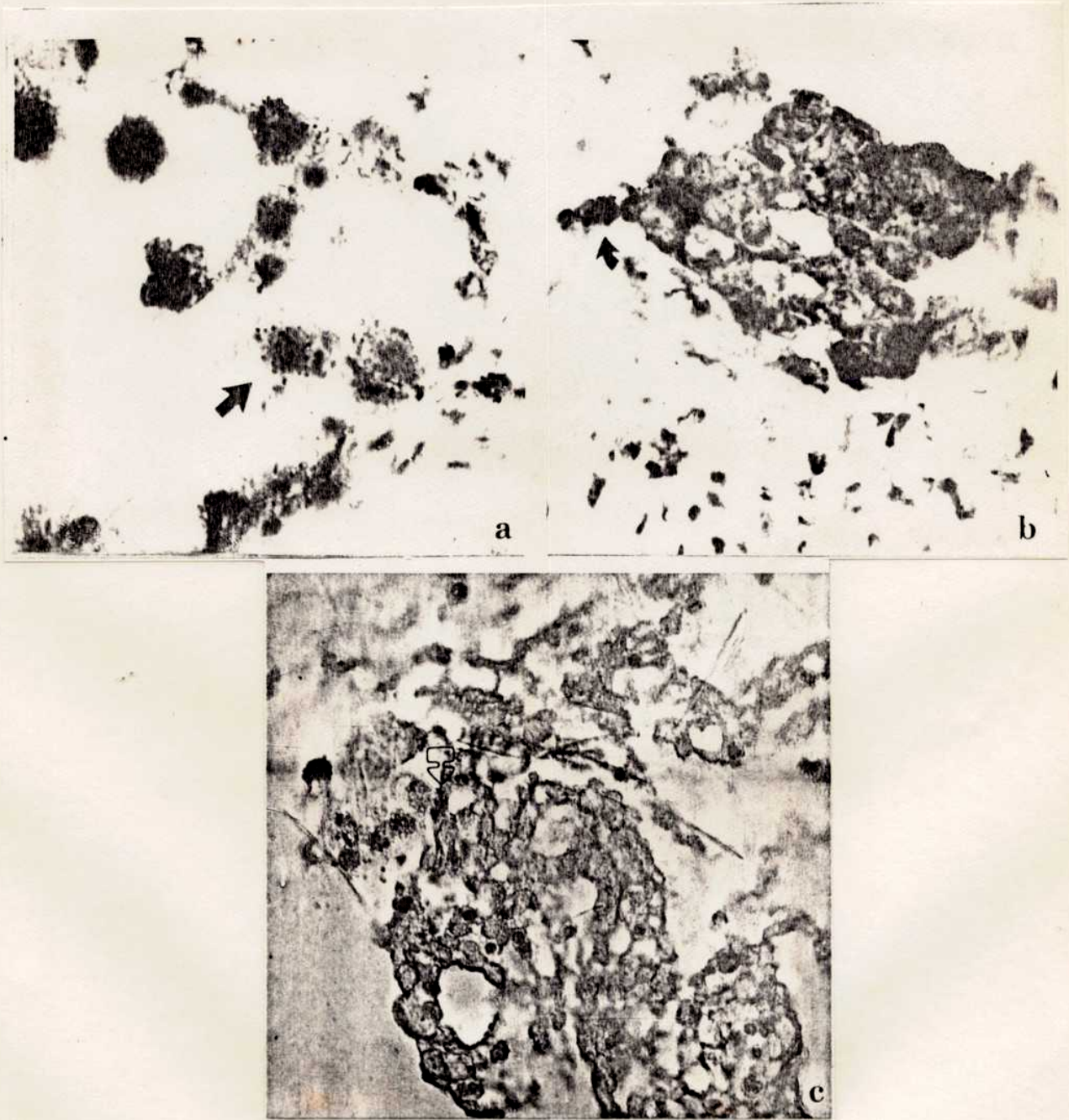
Dado lo interesante del hallazgo por la posibilidad de que éstas fueran células en transición hacia la diferenciación, decidimos ampliar estos estudios. Se estudiaron 35 tumores, 29 de los cuáles poseían porcentajes variables de células con expresión positiva de CEA y solo en 6 no se observaron células positivas para CEA. En 23 de los 29 tumores positivos, pudimos observar que las células en fase S o en mitosis no expresaron CEA. Sin embargo en 6 de los 29 tumores, un porcentaje variable de células en fase S del ciclo celular o en mitosis expresó CEA simultáneamente. En la tabla 9 se puede observar que el TLI de los tumores que poseen células con marca en el núcleo y positividad para CEA es bastante variable. A pesar de ser también muy variable el porcentaje de células con marca en el núcleo y positivas para CEA en los diferentes tumores, existe una tendencia hacia niveles más elevados de este tipo de células con valores más altos de TLI.

**Tabla 9.** *Correlación entre la síntesis de DNA y la expresión simultánea de CEA.*

Caso	T.L.I.	RE/RPg <sup>a</sup> (fmoles/mg Prot)	Células marcadas	
	%		CEA + (%)	CEA - (%)
1	0,49	32/ND	11	89
2	0,71	ND	17	83
3	1,02	34/28	36	64
4	2,20	6,3/ND	30	70
5	3,60	0/0	57	43
6	5,40	83/93	37	63

*a.) RE/RPg = Receptores Estrogénicos/Receptores de progesterona*

Morfológicamente estas células poseen tamaños intermedios y su disposición intratumoral dependió del tipo de tumor. En algunos tumores se las observó dentro de nidos de células positivas para CEA, morfológicamente similares y sin marca en el núcleo (figura 39 A y B). En otros tumores se las localizó formando



**Figura 39.** *Microfotografías de tumores con incorporación de 3H-tim y expresión de CEA. Para detalles técnicos ver figura 8 y Métodos. Las flechas señalan células que incorporaron 3H-tim y expresan CEA simultáneamente. a, aumento X 1000; b, aumento X 500; c, aumento X 400.*

grandes colgajos celulares, en asociación con células de otro tipo. En el colgajo que se muestra en la figura 39 C podemos observar en el extremo izquierdo de la parte superior un grupo de células que no expresa CEA, parte de las cuáles se encuentran en activa síntesis de DNA; éstas están separadas de la gran masa de células que expresa CEA y cuyo tamaño es menor que el de las que no expresan. Asimismo se puede observar una célula con marca y CEA positiva, en una posición muy cercana a las células en proliferación que no expresan CEA.

Otro de los resultados interesantes que surgió de la incubación de los tumores durante 18 horas en presencia de  $^3\text{H}$ -tim fue la aparente falta de correlación observada al comparar los valores de TLI con la expresión de CEA o con el contenido total de RE.

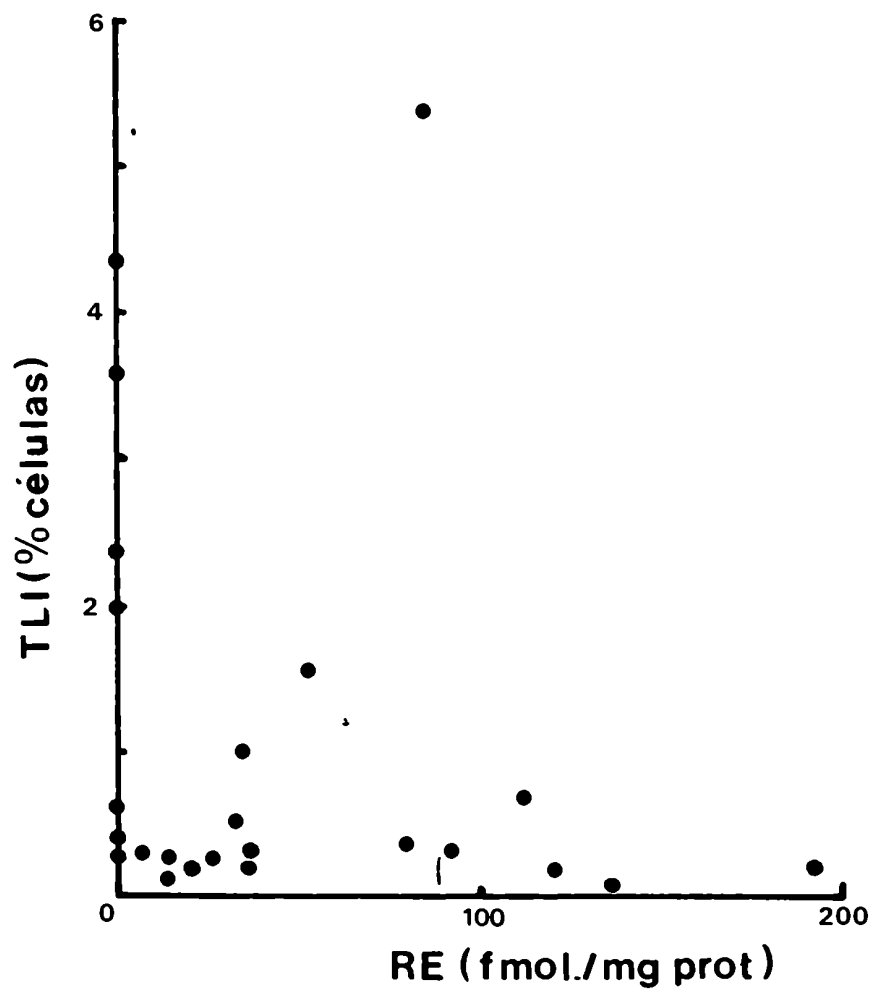
En la figura 40 se comparó el índice de proliferación tumoral con el contenido total de RE en los diferentes tumores estudiados. Resulta difícil establecer una correlación entre ambos valores y solo se observa una tendencia por la cuál aquellos tumores con altos valores de TLI poseen bajos niveles de RE.

La figura 41 muestra que no existe ningún tipo de correlación cuando se compararon los valores de TLI con los de CEA encontrándose tumores con altos niveles de TLI que no poseen células positivas para CEA mientras otros contienen más de un 75 % de células positivas. Este dato se origina principalmente por la detección de células en fase S que como hemos visto expresan simultáneamente CEA.

## **VI. Expresión de p-21 en tumores primarios de cáncer de mama**

Como hemos visto a lo largo de este trabajo, existe una considerable heterogeneidad celular en cáncer de mama humano dentro de la masa de células epiteliales tumorales. Esta heterogeneidad se puso especialmente de manifiesto a través de la expresión de marcadores de diferenciación y el potencial proliferativo.

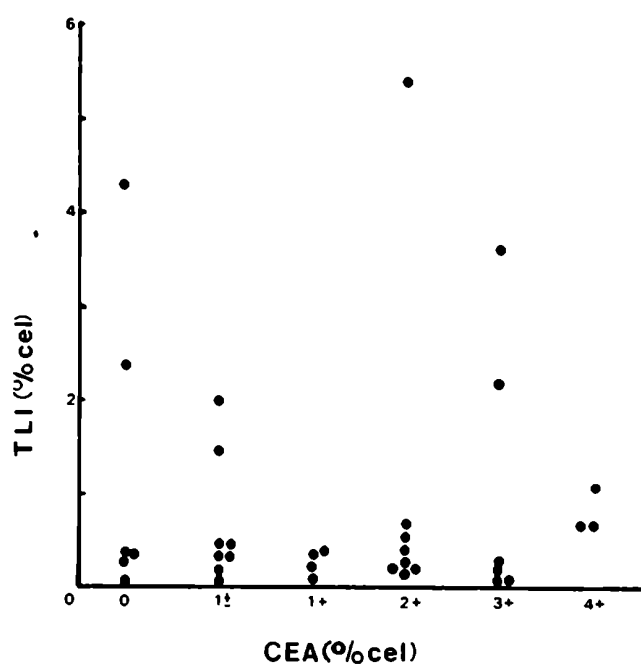
---



**Figura 40.** *Correlación entre el TLI y el contenido de RE. El TLI corresponde a tumores incubados durante 18 hs. Los RE se obtuvieron por desplazamiento con DCC. Cada símbolo corresponde a un caso.*

Uno de los oncogenes que ha sido asociado en mayor medida a tumores sólidos de origen epitelial ha sido el c-ras. En función de los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis decidimos realizar un estudio acerca de la expresión del producto proteico del c-ras en cáncer de mama y su posible asociación con alguna subpoblación de las descritas en forma precedente.



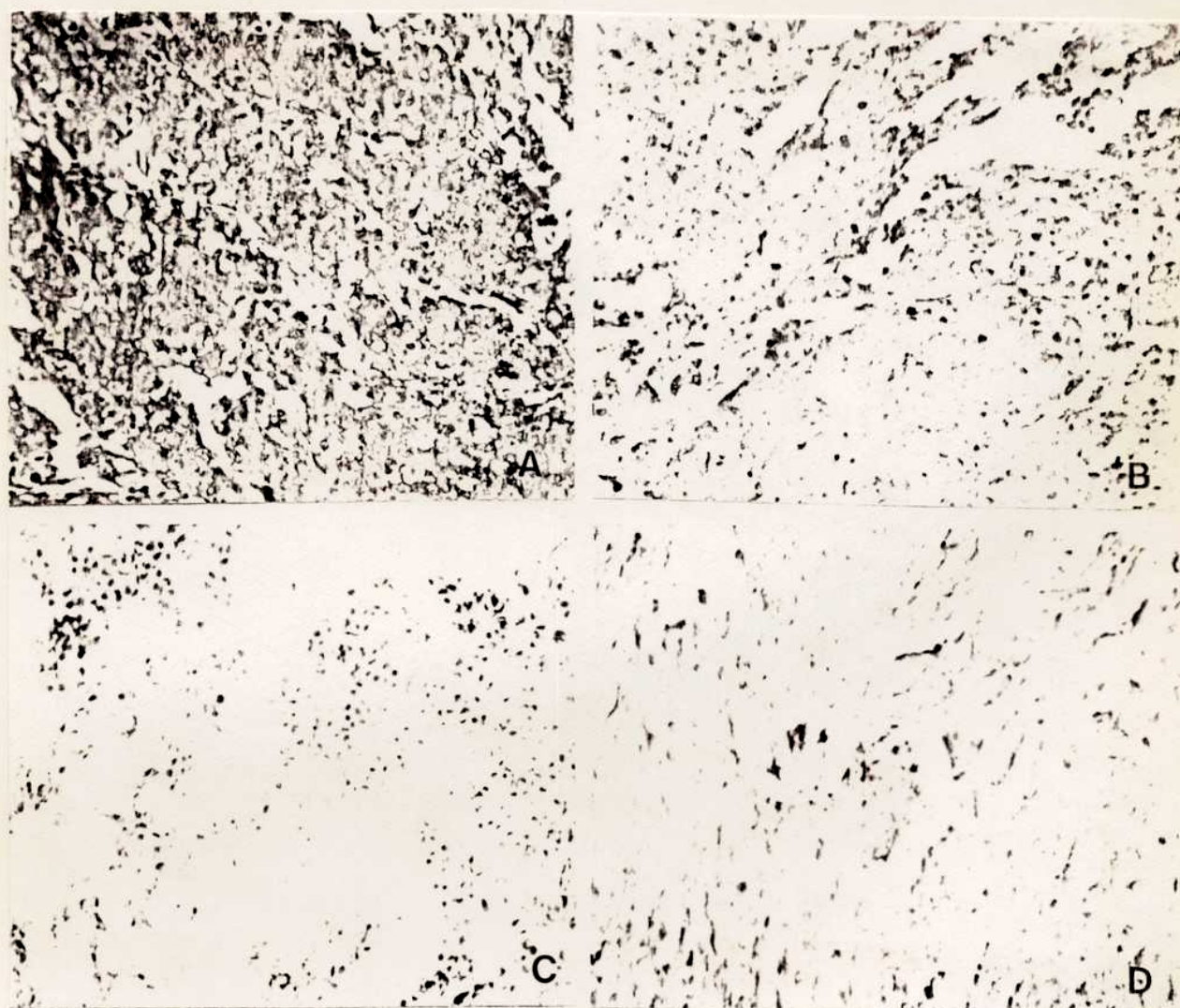


**Figura 41.** *Correlación entre el TLI y la expresión de CEA. Para detalles técnicos ver figura 40 y Métodos.*

Inicialmente se realizaron diversos estudios para la determinación de p-21 en diferentes condiciones. Cortes de tumores obtenidos por congelación fijados como se describió previamente, fueron incubados en presencia del anticuerpo como se describe en la sección Métodos. Para nuestra sorpresa no pudimos detectar expresión positiva en ninguno de los tumores probados. Sin embargo, se detectó expresión positiva en cortes de tejido obtenidos de tumores fijados con 4 % de p-formaldehído e incluidos en parafina.

En las microfotografías de la figura 42 se puede observar la expresión de p-21 en cortes de tejido, usando diluciones diferentes (concentración original: 100  $\mu\text{g/ml}$ ), del anticuerpo monoclonal Y13-259. El tipo de células que expresan p-21 son las del epitelio maligno (figura 42, a, b). Además de la reducción en el porcentaje de células positivas, se puede observar también una reducción en la intensidad de la positividad. En la misma figura se observa la falta de positividad

cuando se usaron cortes por congelación (fig. 42 c), así como cuando en los cortes de parafina se substituyó el anticuerpo anti p-21 por cualquiera de los mencionados en la sección Métodos (fig. 42 d).



**Figura 42.** *Determinación inmunohistoquímica de ras p-21 con el Ac M Y13-259.* cortes histológicos de tumores de mama fueron reaccionados con el Ac M como se describe en Métodos; A y C, 5 µg/ml; B, 1 µg/ml; D, Ac M de rata inespecífico usado como control. A, B y D fueron fijados con p-formaldehído; C, corte por congelación.

### **VI.a. Expresión de ras p-21 a diferentes concentraciones del anticuerpo Y13-259**

Debido a que estudios previos sugerían que la expresión aberrante del oncogene ras en tumores humanos sólidos sería de orden cuantitativo y no cualitativo (por mutación) decidimos evaluar la expresión de su producto proteico p-21 a tres concentraciones diferentes del anticuerpo Y13-259.

Con el objeto de definir con mayor precisión el significado biológico de la expresión de p-21 en carcinomas primarios de mama se estudió dicho protooncogene en función de otros parámetros de proliferación y diferenciación. Se estudiaron 34 tumores de los cuales 21 (62%) expresaron ras p-21 a una dilución de 1:20. Los resultados se muestran en la tabla 10. Como se puede ver, a medida que decrece la concentración del Ac M Y13-259 tanto el porcentaje de tumores positivos como el número de tumores con alta expresión de ras p-21 disminuye.

**Tabla 10.** *Expresión de ras p-21 en cáncer de mama humano.*

Y13-259 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tumores positivos		Distribución de la positividad (n)				
	n	%	$\pm$	1+	2+	3+	4+
5	21/34	62	8	3	3	5	2
2	14/34	41	4	5	2	1	2
1	12/34	35	3	6	1	2	0

*n= número de tumores*

### **VI.b. Correlación entre la expresión de ras p-21 y la diferenciación tumoral**

Cuando se compararon estos dos parámetros (tabla 11) se observó que la expresión de ras p-21 estaba asociada en forma significativa con tumores pobre-

mente diferenciados. Todos los tumores p-21 negativos a 5µg/ml fueron tumores bien diferenciados (grado I). De los tumores con expresión positiva de p-21, 8/21 tenían menos del 1% de células positivas, siendo 7 de estos 8, tumores diferenciados (grado I). Por otra parte, de los 10 tumores con >25% de células positivas, solo 2 eran diferenciados.

En la tabla 11 se puede observar también, que a 2µg/ml del anticuerpo 19 de los 20 tumores negativos son bien diferenciados. A esta dilución, todos los tumores con más del 25 % de células p-21 positivas fueron semidiferenciados.

#### **VI.c. Correlación entre la expresión de p-21 y el contenido total de RE**

El valor promedio de RE en 9 tumores negativos para p-21 fue de  $44,0 \pm 62,0$  fmoles/mg. de proteína, que no fue muy diferente del valor obtenido para los tumores p-21 positivos que fue de  $42,9 \pm 16,2$  fmoles/mg. proteína. El valor promedio de RE descendió en los tumores positivos para p-21 a  $32,2 \pm 36,7$  fmoles/mg de proteína a una dilución del anticuerpo de 1:100, sin diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se encontraron grandes diferencias cuando se comparó entre la presencia de p-21 y la de RE, ya que el 67 % de los tumores p-21 negativos contienen RE, valor que no difiere del 65 % que se encontró para los tumores p-21 positivos.

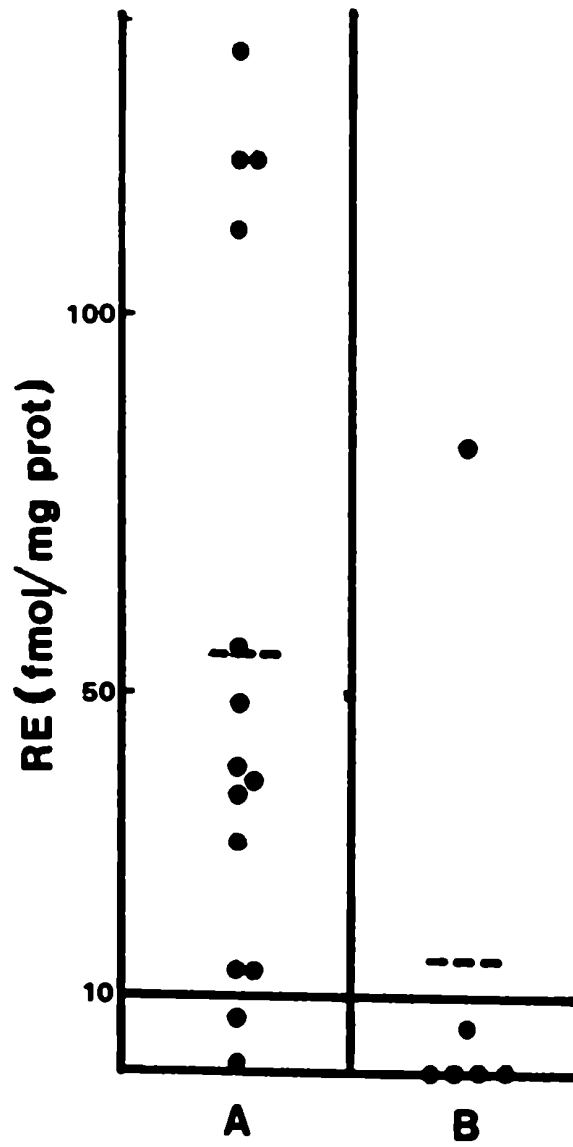
A pesar de que estos resultados estarían indicando que no existe correlación alguna entre ambos marcadores, merece destacarse el siguiente resultado cuando se consideró solo los tumores positivos para p-21: la figura 43 muestra que 5/6 tumores con más del 50 % de células p-21 positivas poseen valores negativos de RE, siendo el promedio total  $14,9 \pm 33,5$  fmoles/mg de proteína; por otra parte solo 2/14 tumores con menos del 50 % de células positivas para ras p-21 son negativos para RE siendo el promedio total  $55,0 \pm 46,6$ . Estos datos estarían sugiriendo que aquellos tumores con alta expresión del ras, tendrían una tendencia a ser RE negativos.

**Tabla 11. Correlación entre la expresión de p-21 y la diferenciación tumoral**

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Expresión de p-21 (a)	Grado de Diferenciación	
		I	II y III
5	--	b      c 100 (13/13)	0 (0/13)
	1±	88 (7/8)	12 (1/8)
	1+	67 (2/3)	33 (1/3)
	2+	33 (1/3)	67 (2/3)
	3+	20 (1/5)	80 (4/5)
	4+	0 (0/2)	100 (2/2)
2	--	95 (19/20)	5 (1/20)
	1±	67 (2/3)	33 (1/3)
	1+	50 (3/6)	50 (3/6)
	2+	0 (0/2)	100 (2/2)
	3+	0 (0/1)	100 (1/1)
	4+	0 (0/2)	100 (2/2)
1	--	90 (26/29)	10 (3/29)
	1±	33 (1/3)	67 (2/3)
	1+	50 (3/6)	50 (3/6)
	2+	0 (0/1)	100 (1/1)
	3+	0 (0/2)	100 (2/2)
	4+	N.C.	N.C.

a. --) 0% de células positivas; 1±)  $\leq$  1% de células positivas;  
1+) 1-25 %; 2+) 26-50%; 3+) 51-75%; 4+) 76-100 %

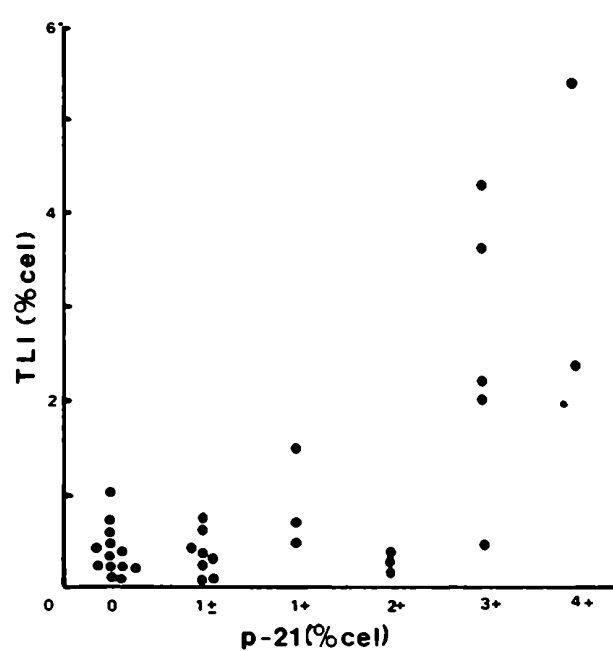
b. porcentaje; c. número de tumores; N.C) ningún caso



**Figura 43.** *Correlación entre la expresión de ras p-21 y el contenido de RE. La expresión de ras p-21 se determinó a 5  $\mu$ g/ml del AcM Y13-259. A, tumores con menos del 50% de células positivas para ras p-21; B, tumores con más del 50% de células positivas. La línea llena (10 fmol/mg proteína) señala la división entre tumores RE positivos y negativos; la línea cortada indica el promedio de RE.*

**VI.d. Correlación entre la expresión de p-21 y el índice de marcación con timidina (TLI).**

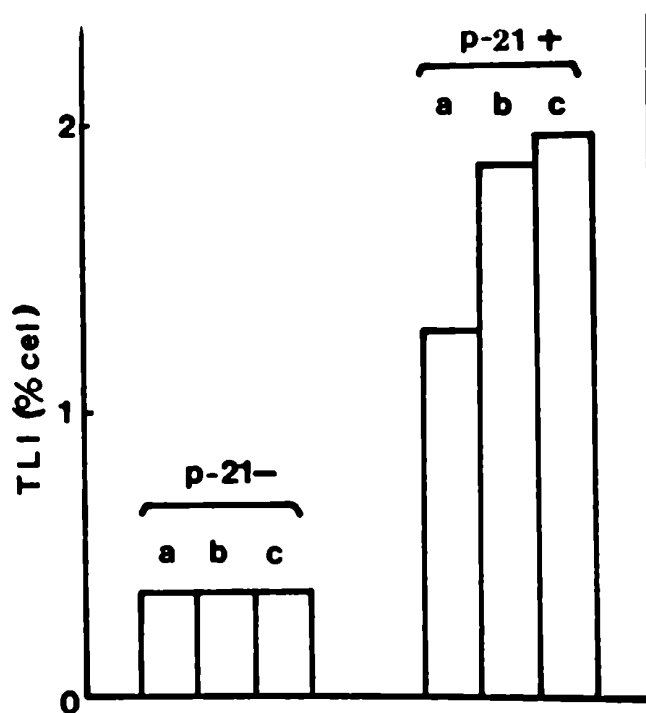
En la figura 44 se encuentra graficada la relación entre el estado proliferativo de los diferentes tumores y el patrón de expresión de p-21. Se puede observar un aumento paulatino en el TLI a medida que aumenta el número de células positivas para p-21. Exceptuando un solo caso, el resto de los tumores con menos del 50 % de células positivas (26 casos) posee un  $TLI \leq 1\%$ . Por otro lado, 5/6 tumores con  $> 50\%$  de células positivas para p-21 poseen un  $TLI \geq 2\%$ .



**Figura 44. Correlación entre el TLI y la expresión de ras p-21. Tumores incubados durante 18 horas con  $^3H$ -tim fueron reaccionados con el AcM Y13-259 a una concentración de  $5 \mu g/ml$ . Cada símbolo corresponde a un caso.**

La correlación directa entre la expresión de ras p-21 y la proliferación tumoral fue confirmada cuando ambos parámetros fueron comparados a las diferentes concentraciones del Ac M Y13-259. En la figura 45 es posible ver que existe un aumento paulatino en el TLI de los tumores ras p-21 positivos a medida que aumenta la dilución del Ac M. Las diferencias con los tumores ras p-21 negativos

fueron estadísticamente significativas a todas las concentraciones ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  y  $p < 0,001$  en 1:20, 1:50 y 1:100 respectivamente).

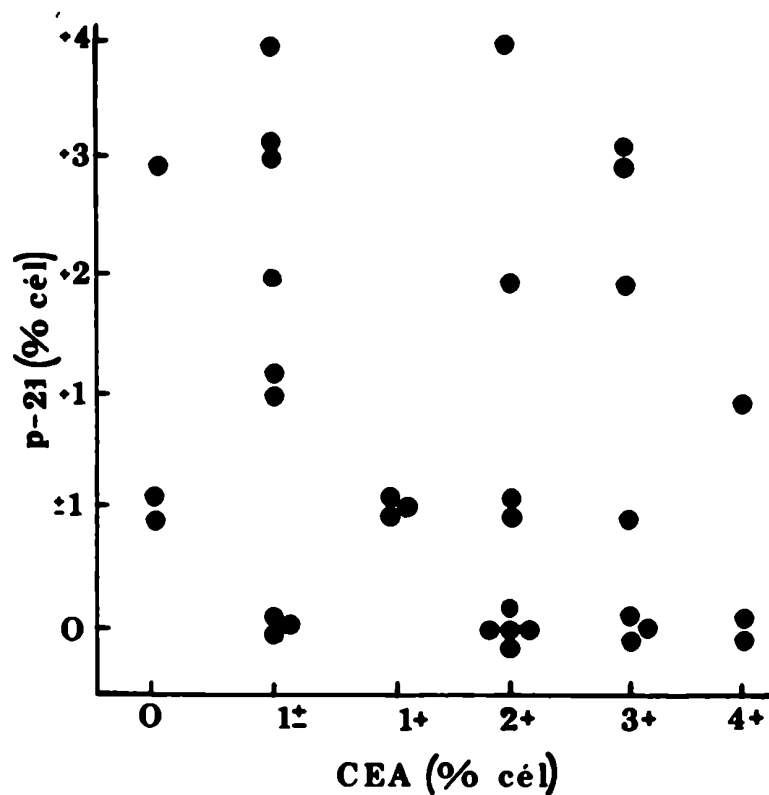


**Figura 45.** *Correlación entre el TLI y la expresión de ras p-21 a diferentes concentraciones del AcM Y13-259. Tumores incubados 18 horas con 3H-tim fueron reaccionados con el AcM anti ras p-21; a, 5 µg/ml; b, 2 µg/ml; c, 1 µg/ml; p-21-, tumores ras p-21 negativos; p-21+, tumores ras p-21 positivos.*



**VI.e.** Correlación entre la expresión de p-21 y la de CEA

En la figura 46 se puede ver que no existe ninguna relación aparente entre la expresión de ras p-21 y CEA. Sin embargo resalta el hecho de que un número importante de tumores tuvo la capacidad de expresar simultáneamente niveles elevados de la proteína oncogénica y de un aparente marcador de diferenciación como CEA. La pregunta que surgió inmediatamente fue intentar demostrar si las subpoblaciones celulares reponsables de la expresión de la proteína ras p-21 eran las mismas que expresaban CEA.



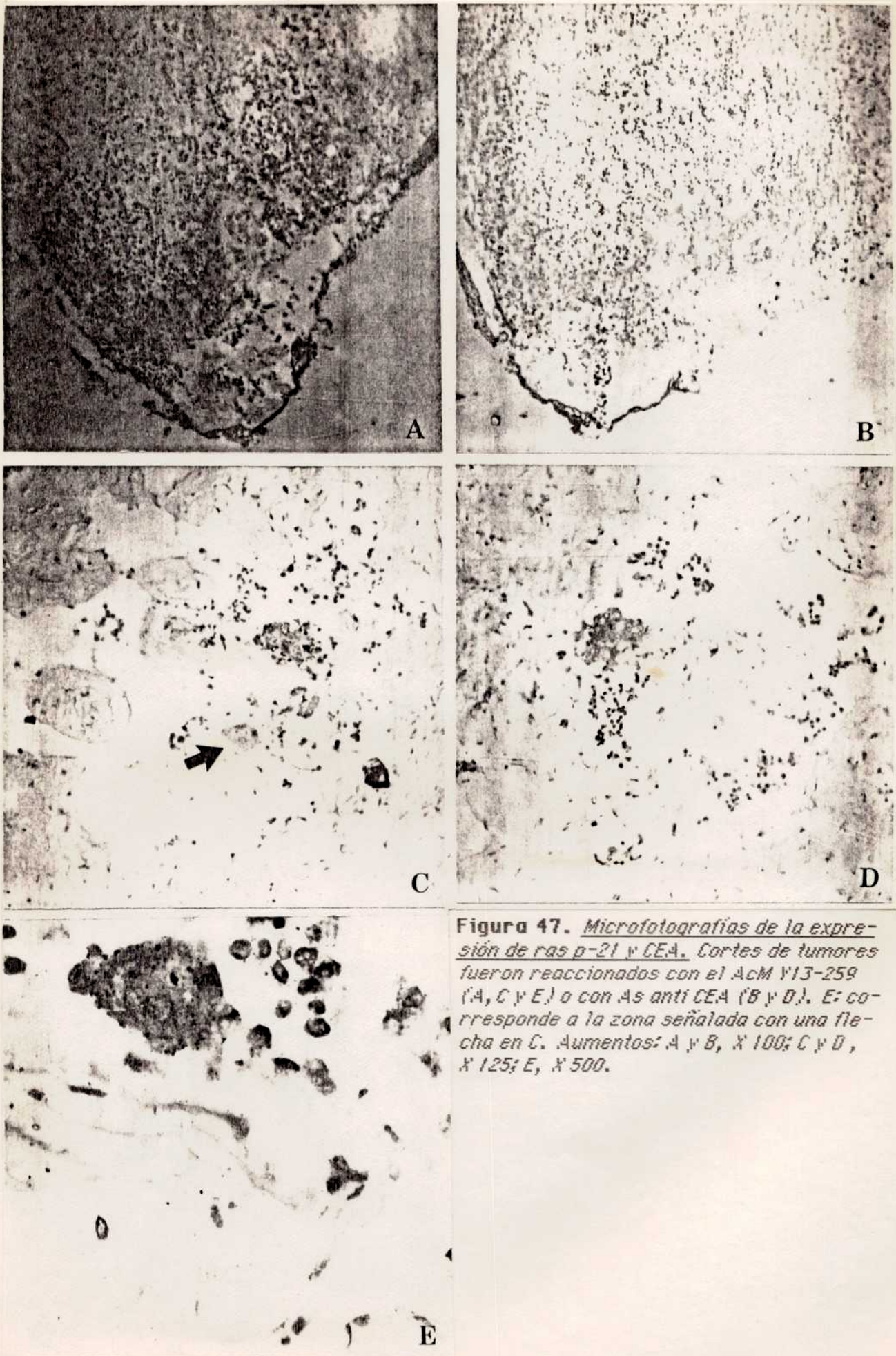
**Figura 46.** Expresión de ras p-21 vs expresión de CEA. Ras p-21 fue determinado a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cada símbolo corresponde a los datos de un tumor.

**VI.f. Identificación in situ de las células positivas para p-21 y para CEA:**  
**comparación con las células en activa síntesis de DNA**

Como se observó previamente en la parte de la tesis dedicada al estudio de la relación entre las células que sintetizan DNA y las que expresan CEA, se determinó que en la mayoría de los tumores la expresión de CEA estuvo asociada a células pequeñas, con núcleos oscuros localizadas formando nidos o distribuidas en el tejido estromal y que en general no se encontraban ciclando. Sin embargo en varios tumores observamos que además de estas células, otro tipo de células más grandes y con núcleos más claros también podían expresar CEA.

Al estudiar en forma comparativa aquellos tumores con expresión simultánea de p-21 y CEA, observamos que en gran parte de éstos la subpoblación de células con expresión positiva de ras p-21 no expresaba CEA (fig. 47 a,b). En otros tumores la misma subpoblación de células podía expresar CEA y ras p-21 como se observa en los nidos celulares de la figura 47 c y d; sin embargo las células de menor tamaño que se encuentran rodeando a los nidos de células positivas para ambos marcadores, expresaron solo CEA y no ras p-21. Esto se observa con mayor claridad en la figura 47 e donde la ampliación de parte de la microfotografía de la figura 47 c, permite observar que los citoplasmas de las células de mayor tamaño poseen expresión positiva para ras, mientras que los de las células más pequeñas que rodean el nido no han reaccionado con el Ac M Y13-259.

La expresión de ras p-21 asociada a células de tamaños intermedios o grandes y núcleos claros fue el patrón celular observado en forma mas frecuente. A lo largo de todos estos estudios no pudimos observar expresión de ras p-21 asociada a células de tamaño pequeño y núcleos oscuros. Cabe mencionar asimismo que los tumores sin expresión de ras p-21 incluso a la mayor concentración del anticuerpo Y13-259 (5µg/ml) demostraron estar formados por una absoluta mayoría de células de pequeño tamaño y núcleos oscuros.



**Figura 47.** *Microfotografías de la expresión de ras p-21 y CEA. Cortes de tumores fueron reaccionados con el AcM Y13-259 (A, C y E) o con As anti CEA (B y D). E: corresponde a la zona señalada con una flecha en C. Aumentos: A y B, X 100; C y D, X 125; E, X 500.*

La disposición intratumoral de las células con expresión positiva de ras p-21 fue muy variable; en ciertos casos se las localizó en forma de nidos o colgajos donde la mayoría ó todas eran positivas para p-21 con intensidades similares (fig. 47, a, c e y fig. 48 a). En otras oportunidades se las encontró en nidos de células morfológicamente similares, que poseían diferentes intensidades de expresión de ras p-21 ó que no expresaron (fig. 48 b). También se las observó entremezcladas con células más pequeñas negativas (fig. 47 e) o esparcidas en grupos de células dentro del estroma (fig. 48 c, d).

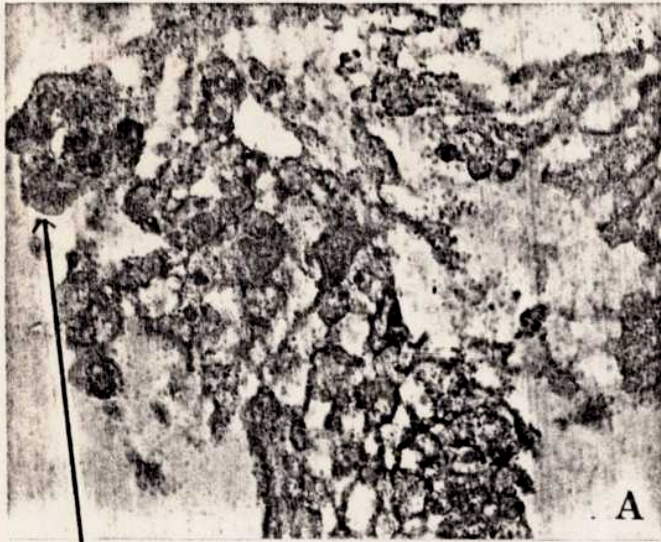
La incubación de estos tumores con  $^3\text{H}$ -tim nos permitió comparar las células en replicación con la expresión de ras p-21. La figura 48 a muestra una célula en activa síntesis de DNA con gran precipitación de granos en su núcleo y que posee expresión citoplasmática de ras p-21; dicha célula se encuentra en un nido compuesto por células morfológicamente similares con gran expresión de ras p-21 y que no replican su DNA. En la figura 48 b se observa que la única célula en replicación es la que posee la mayor intensidad de expresión citoplasmática de p-21; por otro lado la figura 48 c nos muestra dos células con gran precipitado de granos en su núcleo, mientras que solo una de ellas expresa ras p-21.

En la figura 49 podemos ver asimismo el colgajo de células descrito anteriormente para la expresión de CEA, que fue también teñido para determinar la expresión de p-21. La microfotografía muestra que el nido de células que se encuentra en el extremo señalado por la flecha y en el cuál parte de las células están en fase S es negativo para CEA, pero todas sus células expresan p-21. Por otro lado dentro de la masa de células positivas para CEA, solo parte de ellas expresan p-21 simultáneamente.

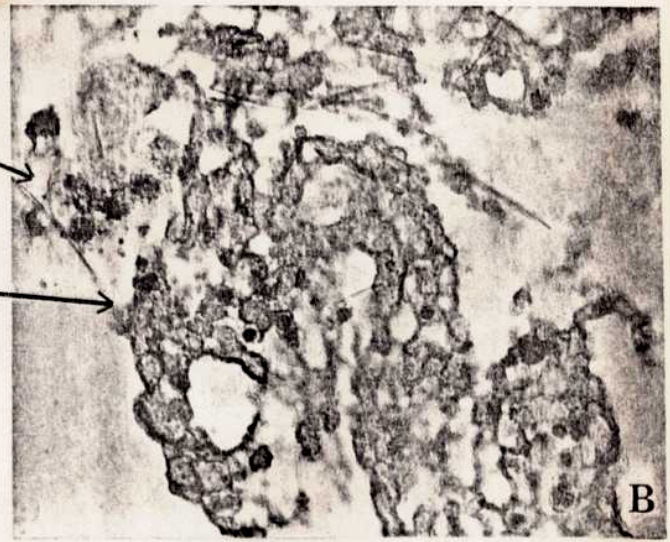
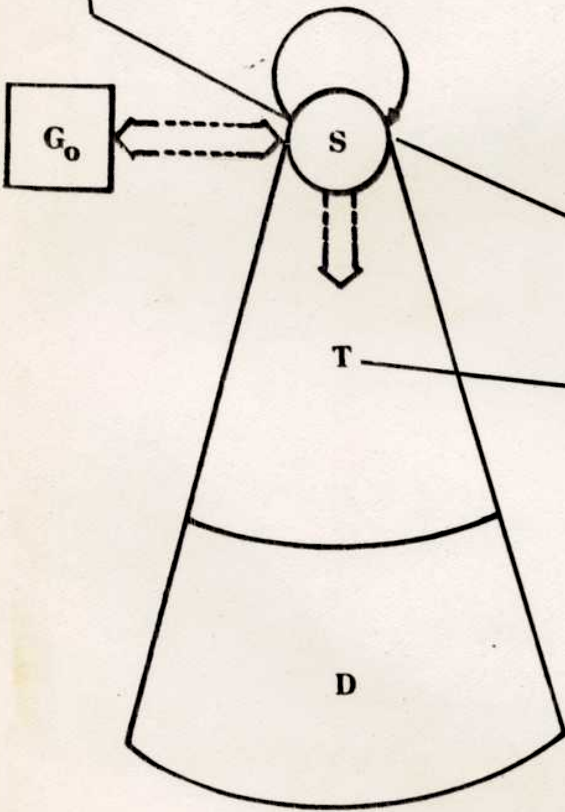
Un esquema acerca de la correspondencia entre los tres tipos celulares descriptos y el modelo de las jerarquías celulares se muestra en la misma figura. Las células marcadas estarían en un nido de células stem que no expresan CEA pero sí ras p-21 y en el cual algunas células estarían en G<sub>0</sub> mientras otras replican su DNA. La gran masa de células de esta colonia son positivas para CEA y

**Figura 48.** Microfotografías de tumores con incorporación de  $^3\text{H}$ -tim y expresión de ras p-21. Tumores incubados 18 horas con  $^3\text{H}$ -tim fueron reaccionados con el AcM Y13-259. A, B y C, las flechas señalan células que expresan ras p-21 y tienen marcado su núcleo; D, la flecha señala la expresión de ras p-21 en la cara interna de la membrana plasmática. Aumento  $\times 500$  en todos los casos menos en C ( $\times 900$ ).

no están marcadas, presumiblemente por ser células en transición hacia la diferenciación que ya han perdido la capacidad de dividirse. Entre un tipo y el otro de células, se encontrarían las células transicionales que a pesar de que han comenzado a sintetizar marcadores de diferenciación, aún poseen la capacidad de duplicar su DNA. Parte de estas células en transición tendrían la capacidad de expresar CEA y p-21 simultáneamente.



**Figura 49.** *Expresión de ras p-21, CEA e incorporación de 3H-tim. Comparación con el modelo de las jerarquías celulares. Para las abreviaturas ver figura 1.*



#### **VI.g. Localización intracelular de p-21**

En líneas generales la localización intracelular de p-21 fue citoplasmática. Sin embargo en diversas oportunidades se observó que en parte de las células la expresión de p-21 se encontraba localizada en la cara interna de la membrana plasmática (fig. 48 D). La diferente localización intracelular no estuvo relacionada con ninguno de los parámetros estudiados.

### **VII. Expresión de c-myc en cáncer de mama humano**

Estudios previos ya descriptos en la introducción sugirieron que la transformación maligna de una célula requiere de al menos 2 protooncogenes activados. Además del c-ras, otro oncogene que ha sido demostrada su amplificación en tumores humanos es el c-myc.

Con el objetivo de poder establecer la posible relación entre las diferentes subpoblaciones celulares que componen un tumor y la expresión del c-myc intentamos desarrollar una técnica de determinación simultánea de un antígeno por inmunohistoquímica y el análisis de la expresión del mRNA del c-myc por hibridación in situ, utilizando cortes de tejidos de tumores de mama.

#### **VII.a. Detección de la expresión del c-myc por hibridación in situ**

La puesta a punto de la técnica de hibridación in situ o hibridación histoquímica se basó en la utilización como control positivo de la línea promielocítica humana HL-60 ya que diversos estudios establecieron que esta línea posee amplificado el gene c-myc y que su expresión está considerablemente aumentada durante la fase exponencial de crecimiento (144). Como control negativo utiliza-

mos cortes de tejido placentario a término (196). En la figura 50 A y B se pueden observar microfotografías con la expresión del mRNA de c-myc aumentada en HL-60 que se manifiesta por la presencia de un precipitado de marca sobre el citoplasma o en algunos casos sobre el núcleo mismo. En comparación con la expresión en HL-60 podemos observar que en la placenta a término se pueden detectar ocasionalmente algunas células con precipitado de plata (fig. 50 D).

El análisis cuantitativo de los datos obtenidos de cinco experimentos no simultáneos, nos permitió determinar que en placenta el porcentaje de células con probable expresión del c-myc no superó el 2,0 % del total de células. Este porcentaje incluye además la hibridación inespecífica como resultado de la unión de la sonda a diversos componentes celulares. Diversas modificaciones en la temperatura de hibridación y de lavado así como en la concentración de sales fueron realizadas hasta conseguir la mejor relación entre la señal y el fondo.

Luego de obtenidas las mejores condiciones de hibridación intentamos demostrar en un siguiente paso si la señal de hibridación que se detecta es específica para RNA; para ello se tomaron células HL-60 en las cuáles se determinó la expresión del c-myc con un control paralelo tratado en forma previa a la hibridación con una solución conteniendo 2.0 mg/ml de RNasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Como podemos ver en la microfotografía de la figura 50 C la señal de hibridación es reducida a los niveles del fondo luego del tratamiento con RNasa, tanto a nivel del citoplasma como del núcleo, sugiriendo que la señal obtenida en el núcleo estaría identificando RNA y no DNA.

La confirmación de estos resultados se obtuvo al realizar experimentos similares en cortes histológicos de tumores de mama fijados con 4% de p-formaldehído. En la figura 50 E (izquierda) podemos ver el precipitado de granos obtenido al hibridar tumores de mama con la sonda del c-myc. La distribución de granos es diferente a la observada con las HL-60 ya que mientras en la línea celular el RNA parecería estar disperso en el citoplasma, en el caso de las células de



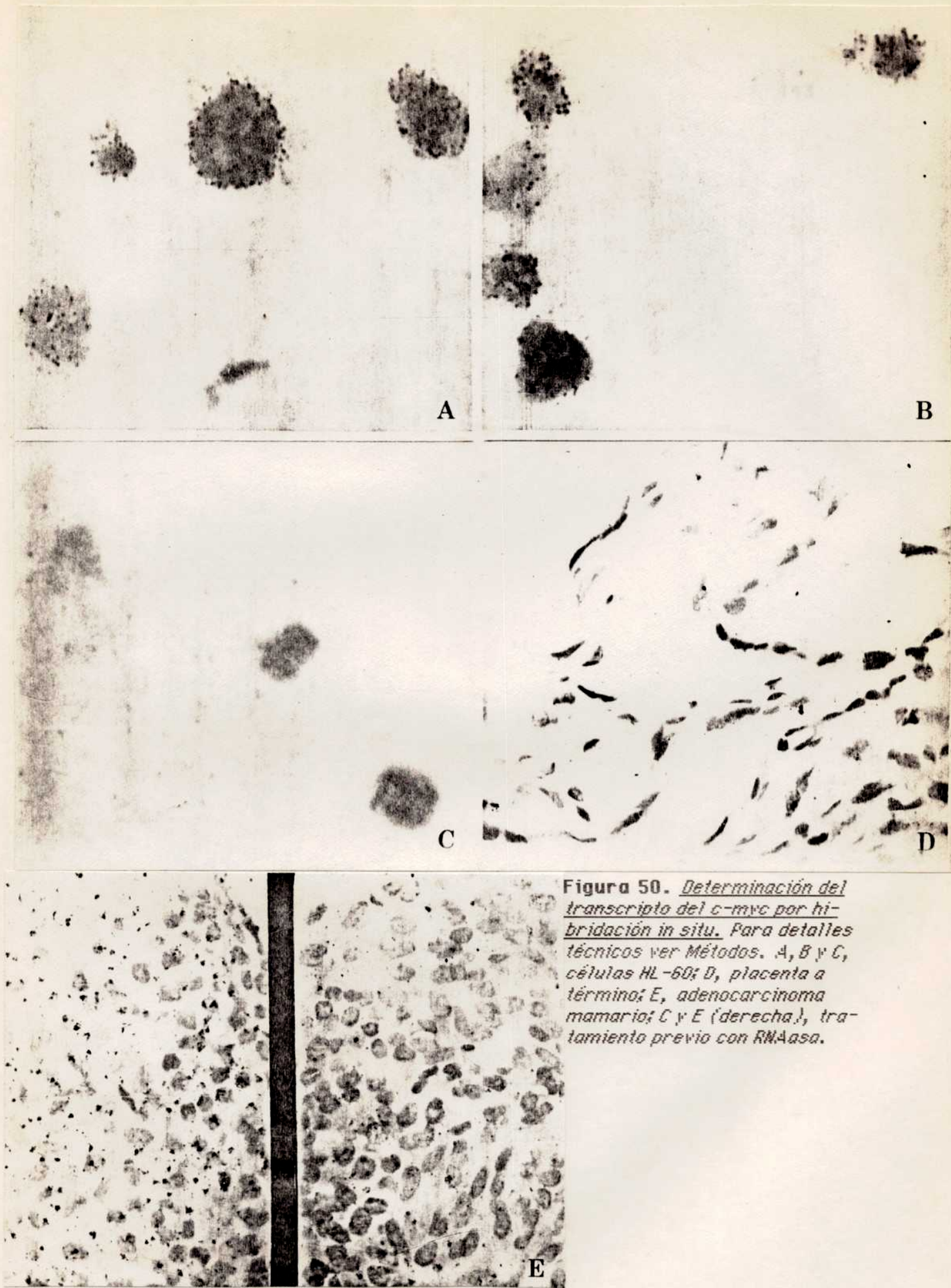


Figura 50. *Determinación del transcripto del c-myc por hibridación in situ. Para detalles técnicos ver Métodos. A, B y C, células HL-60; D, placenta a término; E, adenocarcinoma mamario; C y E (derecha), tratamiento previo con RNAasa.*

los tumores de mama la localización estaría más focalizada. La especificidad del precipitado en granos fue confirmada cuando se trataron cortes histológicos de los mismos tumores con RNasa en forma previa a la hibridación. Estos controles tratados con RNasa no mostraron hibridación específica (fig. 50 E, derecha).

Experimentos realizados utilizando como sonda solo el vector de clonado dieron imágenes similares a las obtenidas con un tratamiento previo con RNasa.

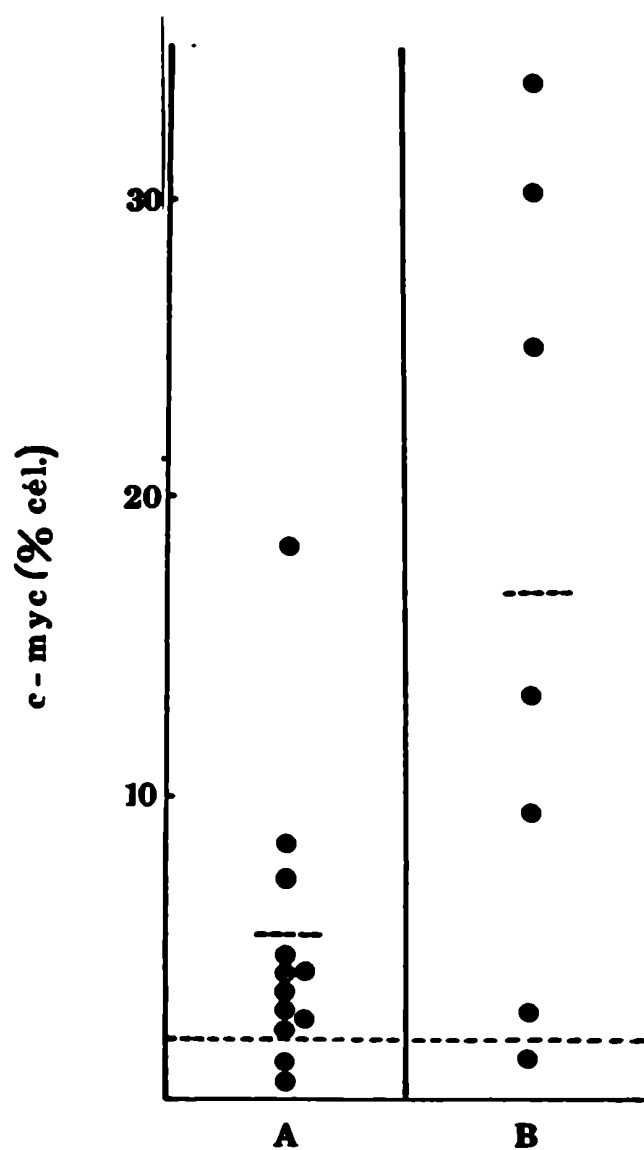
#### **VII.b. Correlación entre la expresión del c-myc y la diferenciación tumoral**

La expresión del c-myc por hibridación in situ utilizando una sonda marcada conteniendo el tercer exón de dicho gene fue determinada en 19 carcinomas primarios de mama.

Tomando como base el valor de 2 % de células positivas para c-myc obtenido en placenta humana, 12 de 19 tumores mostraron significativos incrementos de 2 a 15 veces en el número de células que expresaban c-myc. En 6 de estos 12 tumores se observó un incremento de más de 5 veces.

Cuando comparamos la expresión del transcripto del c-myc en función de la diferenciación tumoral pudimos observar que el porcentaje promedio de células con expresión del c-myc en los 12 tumores bien diferenciados fue de  $5,1\% \pm 4,8\%$  del total de células.

Por otra parte en los tumores más indiferenciados (7 casos) este porcentaje fue 3 veces mayor y llegó a  $16,7\% \pm 13,1\%$  de células con expresión aumentada del c-myc. En la figura 51 se puede ver asimismo la dispersión de tumores en función del grado de diferenciación.



**Figura 51.** *Correlación entre la expresión del c-myc y la diferenciación tumoral.* La línea cortada inferior corresponde al nivel basal detectado en placenta; la línea cortada superior corresponde al promedio de expresión. A, tumores bien diferenciados; B, tumores semi ó indiferenciados.

#### VII.c. Correlación entre la expresión del c-myc y el nivel de RE

Cuando se comparó el nivel de expresión del m RNA del c-myc con la presencia de RE no se observó ninguna correlación aparente. El promedio de células

con expresión del c-myc en tumores positivos para RE fue de  $9,7\% \pm 12,2$  (10 tumores), mientras que el de los negativos para RE fue de  $8,2\% \pm 6,4\%$  (6 tumores).

#### VII.d. Correlación entre la expresión del c-myc y la expresión de CEA

En la tabla 12 se puede observar la correlación entre la expresión del c-myc y la de CEA. A pesar del bajo número de tumores en cada uno de los grupos de expresión de CEA es posible observar que la mayor expresión del oncogene está asociada con tumores que poseen hasta 1% de células positivas para CEA. Tomado en forma conjunta este grupo de 7 tumores posee expresión de c-myc en  $11,6\% \pm 9,7\%$  de sus células, mientras que el resto de los tumores (12) con más del 1% de células CEA positivas, expresa c-myc solo en el  $4,9 \pm 6,8\%$  de sus células.

**Tabla 12.** Correlación entre la expresión del c-myc y la de CEA. La expresión del c-myc y la de CEA se obtuvieron en forma simultánea como se describe en Materiales y Métodos.

	Expresión de CEA					
	-	±	1+	2+	3+	4+
Expresión de c-myc	<sup>a</sup> 18,8	8,9	1,1	6,8	5,2	6,6
	<sup>b</sup> (2)	(5)	(2)	(5)	(4)	(1)

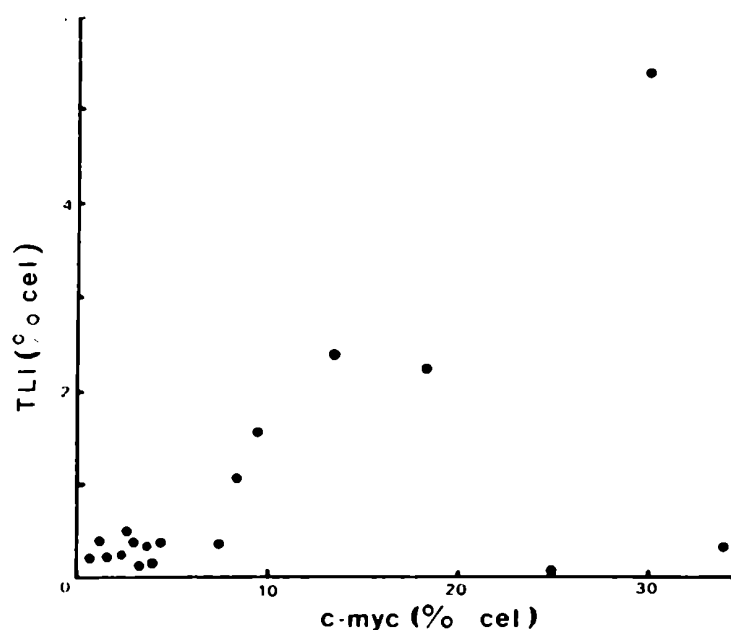
*a. porcentaje promedio de células positivas; b. número de tumores estudiados*

### VII.e. Correlación entre la expresión del c-myc y la proliferación tumoral

En el gráfico de la figura 52 podemos observar que, exceptuando dos casos, existe una aparente correlación entre un mayor estado proliferativo y una mayor expresión del c-myc.

La alta expresión del c-myc asociada a un bajo TLI en dos tumores se originó aparentemente por dos motivos diferentes. En uno de ellos consideramos que se debió a que los fragmentos utilizados para la determinación del TLI fueron morfológicamente diferentes de los que se utilizaron para la hibridación in situ.

En lo que respecta al segundo caso, la imagen histológica de los fragmentos fue muy similar. Cabe resaltar sin embargo que a pesar de tener un muy bajo TLI (0,08%) este tumor expresó CEA solo en el 0,05% de sus células.



**Figura 52.** Correlación entre la expresión del c-myc y el TLI. El TLI corresponde a tumores incubados 18 horas con  $^3\text{H}$ -tim. Cada punto corresponde a los datos de un paciente.

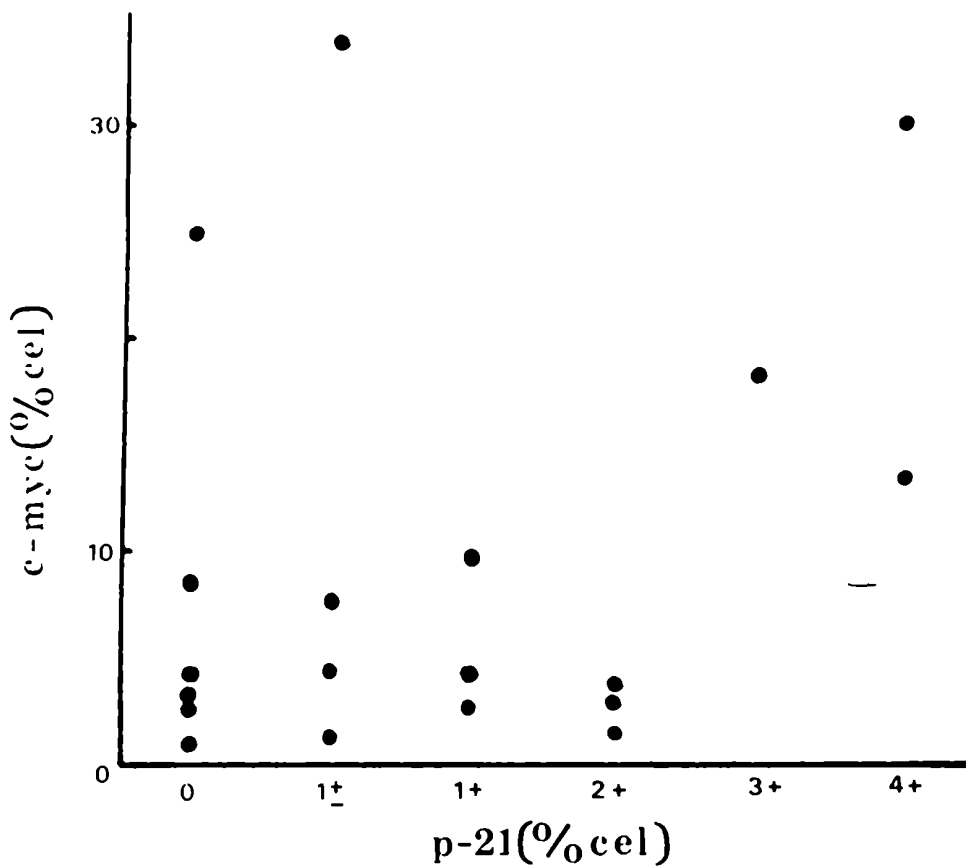
#### VII.f. Expresión de c-myc y ras p-21

Como pudimos ver en la introducción, una de las conclusiones más importantes obtenidas en el estudio de oncogenes fue que la activación de solo uno de ellos no sería suficiente para la obtención de la transformación maligna. Sobre la base de estos resultados, intentamos correlacionar la expresión del mRNA del c-myc con la de p-21.

En la figura 53 se muestra la correlación entre la expresión del oncogene c-myc y la del oncogene c-ras. Nuestros resultados nos permiten afirmar que aquellos tumores con alta expresión del ras (> 50 % de células positivas) y los mayores índices de proliferación tumoral (2,4 %, 2,2% y 5.4 % de células proliferantes), poseen alta expresión del oncogene c-myc (18.4 %, 13.5 % y 30.3% respectivamente).

#### VII.g. Descripción morfológica de la hibridación in situ

Usando la sonda del c-myc marcada con  $^3\text{H}$  pudimos identificar los transcritos del gene c-myc a nivel de células individuales. Resulta claro que las células que muestran aumentado el c-myc son las epiteliales tumorales. Estas células con marca se encontraban dispuestas a nivel intratumoral de diversas formas. Por ejemplo en la figura 54A podemos ver un tumor compuesto por formaciones de nidos celulares. A bajo aumento se observa que en todos los nidos es posible detectar precipitado de plata. Una mayor aproximación nos permite ver que no todas las células que conforman los nidos poseen expresión del gene c-myc y que ésta se localiza en el citoplasma o en la zona perinuclear (fig. 54 B,C). En la misma figura podemos observar que la marcación de fondo es muy baja en comparación a la marca citoplasmática lo que indicaría que el precipitado que se observa es específico. Asimismo es posible ver que existen diferencias

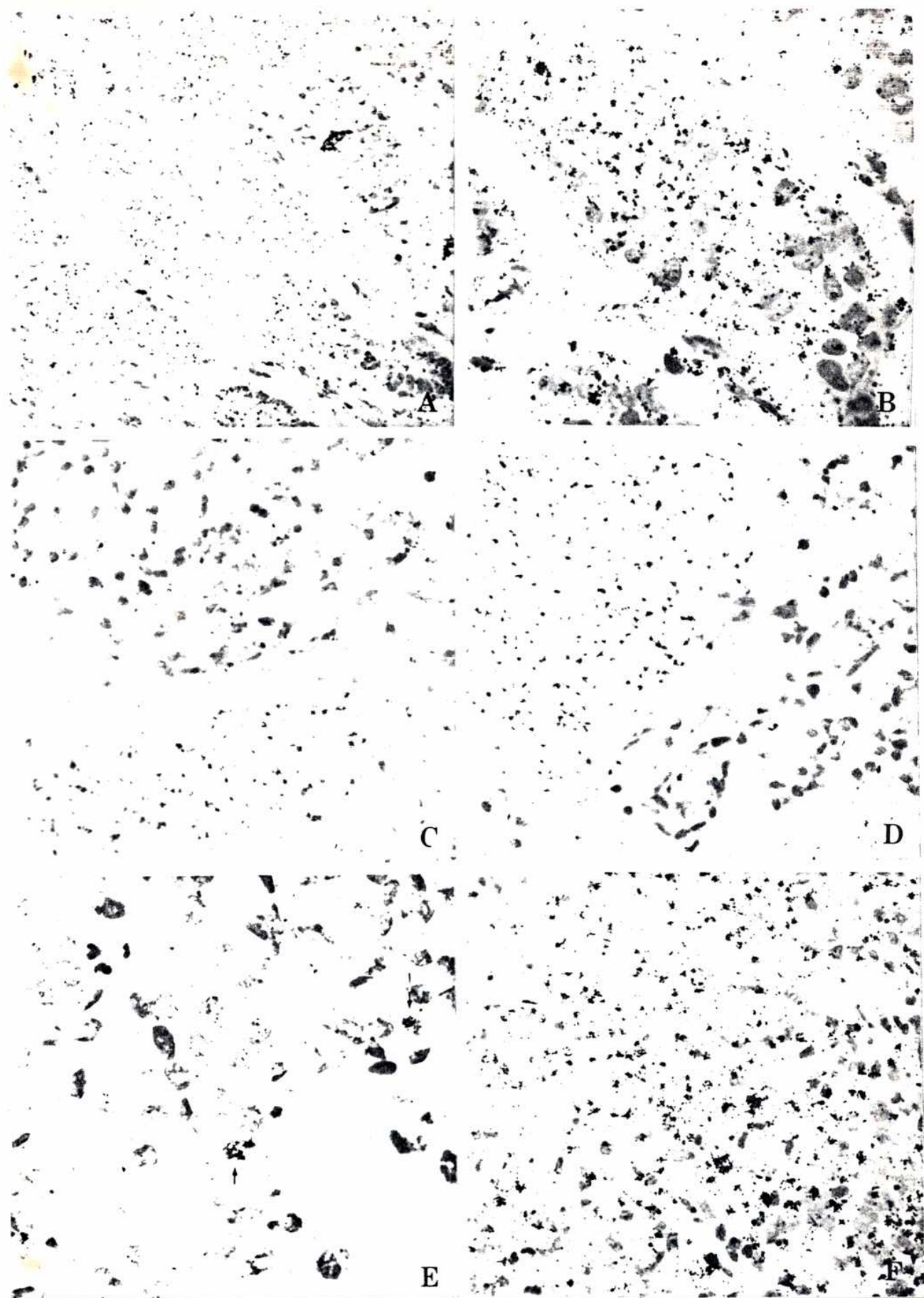


**Figura 53.** *Correlación entre la expresión del c-myc y la de ras p-21. Cortes de tejido fueron incubados con el AcM Y13-259 (5 µg/ml) seguida de la hibridación para c-myc. Para detalles técnicos ver Métodos.*

en la densidad del precipitado de granos entre las diferentes células que componen el tumor, lo que supondría niveles variables de expresión del c-myc.

En la figura 54 C y D es posible observar la presencia de dos tipos diferentes de células epiteliales, por un lado las más grandes y de núcleos claros y por el otro las más pequeñas de núcleos más oscuros. Estas últimas que pueden ser confundidas en las microfotografías con un infiltrado de tipo linfocitario cumplen requisitos de células epiteliales ya que expresan CEA y forman estructuras tubulares características de este tipo de células. Se puede observar que la expresión del c-myc se encuentra asociada con exclusividad a las células de mayor tamaño.

Un patrón diferente en la distribución del RNA mensajero del c-myc se observó en otros tipos de tumores. La microfotografía de la figura 54E muestra un



**Figura 54.** *Microfotografías de la expresión del c-myc en cáncer de mama.* Cortes histológicos fueron hibridados con la sonda del c-myc como se describe en Métodos. Aumentos: A, X 125; B, C, D y F, X 500; E, X 630.



tumor con un bajo número de células con expresión del oncogene. En la figura 54F las células se encuentran dispersas infiltrando en el estroma pero no en forma de nidos observándose señal de hibridación en gran parte de ellas. Esta señal no es uniforme siendo evidente las diferencias en la densidad de marca entre las diferentes células. Cabe señalar nuevamente que la señal del fondo es muy baja en comparación a la específica que en su gran parte se encuentra localizada en la periferia nuclear.

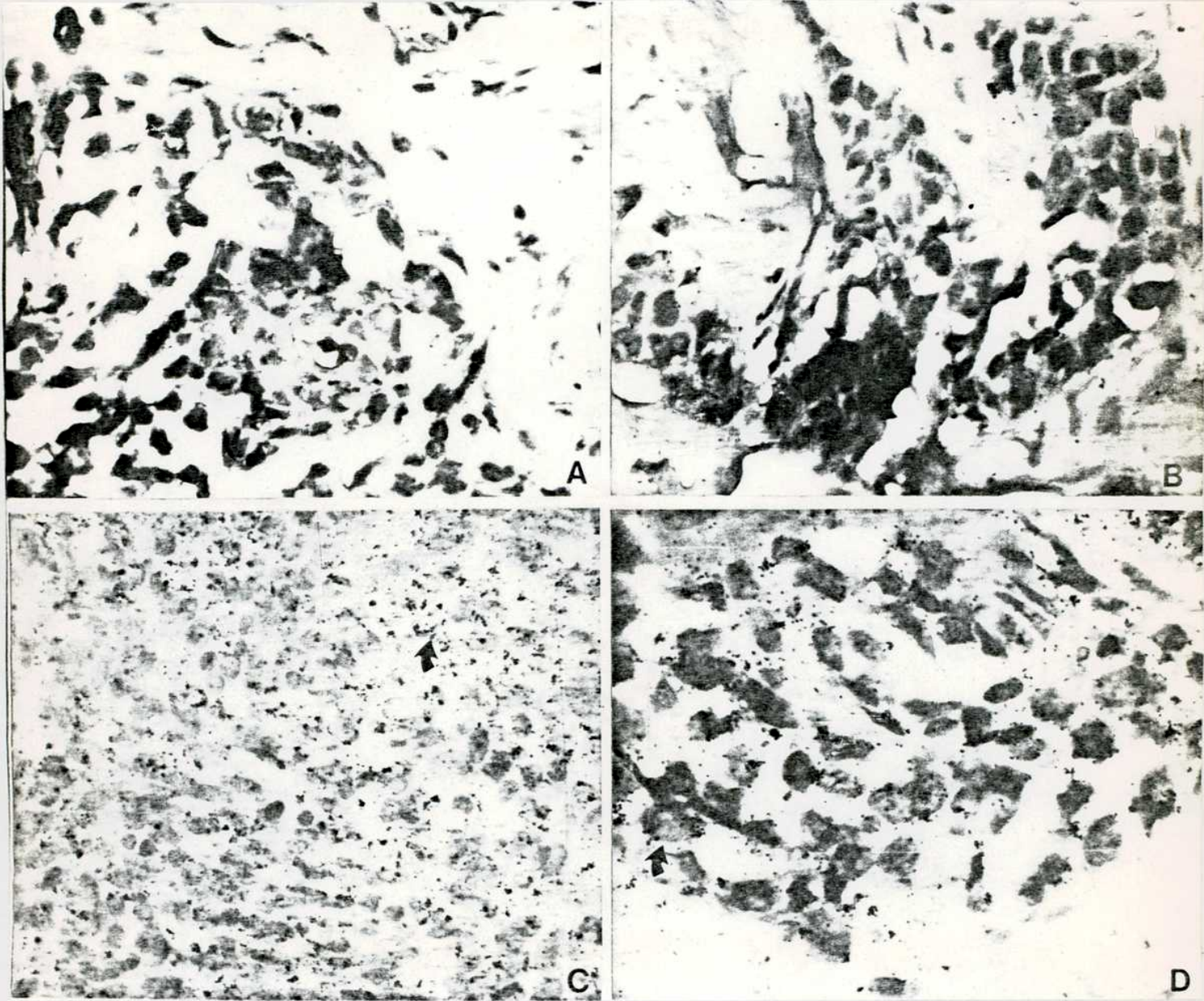
**VII.h. Determinación simultánea de CEA ó ras p-21 por inmunohistoquímica y c-myc por hibridación in situ**

Dado que la técnica de hibridación in situ permite determinar la subpoblación de células responsables de la expresión de un RNA mensajero específico, decidimos intentar el desarrollo de una técnica que nos permitiera visualizar simultáneamente la expresión del transcripto del c-myc y de un antígeno celular en el mismo fragmento tumoral. La puesta a punto de esta técnica se llevó a cabo en el tejido mamario eligiéndose finalmente los pasos que se consignan en Materiales y Métodos.

En la figura 55 A y B podemos observar dos tumores semidiferenciados que muestran nidos celulares con expresión positiva para CEA. En 55 A no se observa hibridación específica, mientras que en 55B es posible ver un escaso número de células con precipitado de plata citoplasmático; sin embargo el porcentaje de células con precipitado no superó el obtenido con placenta por lo que el tumor fue considerado negativo.

La figura 55 muestra dos tumores con una importante expresión del RNA del c-myc; en el caso C está acompañada de una moderada expresión de ras p-21 en todas las células que componen el nido. En la microfotografía de la figura 55 D, se observa a mayor aumento que en la anterior, expresión específica del c-

*myc* que en algunos casos se encuentra acompañada de la expresión intracito-  
plasmática de ras p-21.



**Figura 55.** *Microfotografías de la expresión de ras p-21, CEA y c-myc. Cortes histológicos fueron reaccionados con el AcM Y13-259 o con el As anti CEA seguido de la hibridación con la sonda del c-myc. A y B, expresión de CEA; C y D, expresión de ras p-21. Las flechas señalan células con expresión del c-myc.*

## DISCUSION

La heterogeneidad celular dentro de un tumor puede ser tanto el resultado de un proceso de diferenciación normal o distorsionado dentro de un clon o puede deberse a la coexistencia de diferentes clones dentro de un tumor. El conocimiento de las características principales de esta heterogeneidad puede tener implicancias muy importantes para la comprensión del desarrollo y crecimiento tumoral, así como para determinar la probable respuesta a una terapia determinada.

El objetivo de esta tesis fue poner de manifiesto, en la medida de lo posible, diferentes propiedades celulares, cada una de las cuáles estaría reflejando un estado funcional diferente de las células del cáncer de mama.

### **I. Correlación entre la expresión de CEA y el estado proliferativo celular**

Está generalmente aceptado que cuando una población de células tumorales es llevada hacia la indiferenciación su ritmo de crecimiento es mayor y el tumor progresa más rápidamente que en circunstancias en las cuáles el equilibrio es desplazado hacia la diferenciación. Como fue demostrado en esta tesis, la síntesis de DNA y la presencia de CEA ó RE reflejan estas dos situaciones opuestas respectivamente. En relación con este punto, en cáncer de mama se ha demostrado que altos valores de TLI están asociados con un peor pronóstico de la enfermedad (35). Asimismo la expresión de RE está directamente relacionada con un mejor pronóstico que se refleja en un mayor lapso libre de recurrencia (52); sin embargo la posible utilidad de CEA tisular como factor pronóstico ha tenido resultados contradictorios (208,209). Estas discrepancias pueden deberse a diversas razones como las diferentes especi-

ficidades de los anticuerpos utilizados, la selección de diferentes poblaciones de pacientes y los diferentes criterios de evaluación. Sin embargo es importante destacar que el uso de un único marcador de diferenciación como CEA, es insuficiente para determinar con precisión el tamaño de la subpoblación de células indiferenciadas. Por lo tanto y a pesar de que nuestros resultados muestran en principio que la expresión de CEA está inversamente correlacionada con el TLI, se pudo ver que para un valor dado de CEA, se observan grandes diferencias en el TLI entre los diferentes tumores. La presencia de varias subpoblaciones de células tumorales coexistentes dentro de un tumor podría dar una explicación acerca de esta observación.

Con respecto al análisis de las células que sintetizan DNA, es posible mencionar algunas observaciones interesantes. En aquellos tumores CEA positivos, las células marcadas con  $^3\text{H}$ -tim eran en general más grandes y claramente diferentes de aquellas células CEA positivas. A pesar de que no existen evidencias definitivas de que todas las células que incorporan  $^3\text{H}$ -tim y no expresan son células stem, algunas observaciones favorecen esta presunción:

- 1 Estas células aparecen formando nidos de similares características en los cuáles solo parte de las células estarían ciclando, mientras que el resto estarían en el estado  $G_0$ .
- 2 En este tipo de tumores, no se observaron células sintetizando DNA con diferente morfología a las descritas en el punto anterior.

A priori puede ser asumido que algunas células más maduras que las stem, pueden ser encontradas sintetizando DNA. Con las técnicas utilizadas en este artículo, la presencia de dichas células podría ser solo detectada si se pudieran observar dos clases morfológicamente diferentes de células CEA negativas o si ocasionalmente células conteniendo CEA estuvieran también marcadas. Como hemos podido ver, en varios tumores pudimos detectar diferentes porcentajes de células marca-

das con expresión simultánea de CEA, pero solo en aquellos que fueron incubados durante 18 horas.

La hipótesis acerca de la existencia de una jerarquía celular dentro de los tumores ha recibido un considerable apoyo en años recientes. En la parte superior de esta jerarquía estarían las células stem, responsables de la renovación celular del tumor y de la diseminación de los mismos. Dicha jerarquía celular predice entonces la existencia de tres categorías de células dentro del total de la población celular: **a** - células finales y diferenciadas no proliferantes, **b** - células proliferantes, sin capacidad de autorrenovación (transicionales) y **c** - las células stem ya descritas.

Nuestra idea es que las células marcadas que expresan CEA corresponden al compartimiento de células transicionales. La falta de detección de estas células en los tumores marcados durante 4 horas puede ser explicado en principio por una mayor duración del ciclo celular una vez que ha comenzado la síntesis de CEA. Por ejemplo se ha encontrado en células MCF-7 que butirato de sodio incrementa la producción de CEA, con una disminución paralela en el ritmo de crecimiento (210).

Una de las observaciones más interesantes obtenida aplicando un modelo matemático del crecimiento de las células stem fue que la proporción de éstas decrece a medida que aumentan las multiplicaciones en el compartimiento de células transicionales (13). A pesar de que nuestros resultados nos indican que el porcentaje de células transicionales es mayor en aquellos tumores con un mayor índice de proliferación, resulta apresurado asegurar si en carcinomas primarios de mama la diferencia en el TLI de los diferentes tumores se debe a un mayor número de divisiones en el segmento de células transicionales.

## II. Determinación de RE por autorradiografía

Las técnicas de desplazamiento por carbón activado (DCC) y de centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa han sido hasta hace un par de años los métodos de determinación de receptores estrogénicos más utilizados y cuya validez clínica ha sido ampliamente aceptada.

A pesar de la utilidad demostrada, los ensayos bioquímicos no permiten determinar la heterogeneidad de expresión de RE entre las diferentes células o regiones de un tumor. Este tipo de información podría resultar de suma importancia debido a que entre otros aspectos, la falta de respuesta de un tumor RE positivo a la terapia hormonal podría residir en la heterogeneidad de expresión de RE. En un trabajo al respecto Strauss y col. demostraron que alrededor del 30 % de los pacientes con determinación de RE por la técnica de DCC en al menos dos muestras, muestran tanto resultados negativos como positivos (211).

La necesidad de un método histoquímico confiable para la localización de RE en cáncer de mama humano resulta evidente por lo dicho anteriormente y la prueba está en la proliferación de estos métodos en los últimos años (70, 71). Sin embargo, la mayor parte de estos procedimientos han sido muy criticados por su falta de sensibilidad o de especificidad para distinguir al RE de otras proteínas de unión intracelulares más abundantes (72).

Utilizando técnicas de autorradiografía hemos demostrado en este trabajo que los tumores primarios de mama RE positivos están compuestos por una población heterogénea de células blanco (RE+) y células no blanco (RE-). Este método tiene la ventaja de utilizar el mismo ligando,  $^3\text{H}$ -estradiol, usado en los ensayos bioquímicos, evitando de esta manera los problemas asociados con el uso de análogos fluorescentes u otros. Además el desarrollo de esta metodología nos permitió determinar la expresión simultánea de CEA por técnicas de inmunoperoxidasa.

La factibilidad del uso de esta técnica para la determinación de RE fue corroborada en un reciente trabajo de Buell y Tremblay (212). Al igual que en nuestros es-

tudios, los autores demuestran una correlación significativa aunque no total entre ambas determinaciones y sugieren la utilización de la autorradiografía para la determinación de las características heterogéneas en la expresión de RE, como complemento del ensayo bioquímico.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que tanto la presencia de RE así como la de CEA estarían inversamente relacionadas con los valores de TLI. Sin embargo cuando se comparó entre sí la expresión de CEA con el contenido total de RE no observamos ninguna correlación significativa. Pensamos que esto se podría deber a la gran heterogeneidad existente en la expresión intercelular de RE.

Esta suposición fue confirmada cuando se comparó la expresión celular de CEA con la de RE por autorradiografía. Pudimos observar además la presencia de poblaciones de células que expresan ambos marcadores simultáneamente, uno solo de ellos o ninguno. Esto sugiere que cada una de las poblaciones se encontraría en un estadio diferente en la secuencia de eventos que llevan a la diferenciación final.

### **III. Localización intracelular de los receptores estrogénicos**

La teoría clásica acerca de la interacción entre estradiol y el receptor estrogénico sostenía que la unión ocurría en el citoplasma, seguido de la translocación del complejo hormona-receptor al núcleo, donde el complejo se unía a sitios "aceptores" de la cromatina, seguido del procesamiento del receptor estrogénico con la síntesis simultánea de receptores de progesterona.

Estudios muy recientes con anticuerpos monoclonales confirmaron que la mayoría de los carcinomas primarios de mama humanos están compuestos de una población heterogénea de células RE+ y RE- (76).

Sin embargo el resultado más sorprendente obtenido por este grupo fue la localización nuclear de dichos receptores. Utilizando ocho anticuerpos monoclonales diferentes, Green y col. no pudieron observar ningún tipo de tinción citoplasmática.

Se propuso que la unión de la hormona al receptor ocurriría en el núcleo, induciendo un cambio conformacional en el receptor, de tal forma que su unión a los aceptores nucleares se haría más fuerte (76). La reinterpretación de lo que anteriormente se denominaba translocación del citoplasma al núcleo, fue además sugerida en estudios de la glándula pituitaria (213).

Los resultados descritos en nuestro trabajo demuestran que en la mayor parte de los tumores la localización del estradiol radioactivo es nuclear. Sin embargo en dos de los tumores, parte de las células RE positivas poseen marcación exclusivamente citoplasmática o en citoplasma y núcleo.

Debido a que la incubación durante 45 minutos a 37° C debe permitir la translocación (214) o el cambio conformacional, la localización de marca en el citoplasma se puede deber a dos motivos diferentes:

- 1- debido a que la técnica de autorradiografía se basa en el seguimiento del estradiol y no del RE, se podría conjeturar que la hormona se unió a una proteína que no era el RE, lo que apoyaría la localización nuclear del RE.
- 2- Suponiendo que en realidad la hormona se ha unido a su receptor específico, la localización en citoplasma luego de una incubación en estas condiciones estaría indicando la incapacidad fisiológica del RE de "translocarse" del citoplasma al núcleo, al menos en algunos tumores. Esto sostendría la localización citoplasmática del RE.

La contribución de la autorradiografía para la detección del RE puede ser interesante por la posibilidad de desarrollar al mismo tiempo técnicas de inmunoperoxidasa. De esta forma sería posible determinar la presencia de RE por dos técnicas en forma simultánea; en un caso utilizando estradiol radiactivo y en el otro un anticuerpo. Este tipo de estudios se encuentran en desarrollo en nuestro laboratorio para determinar si las células que incorporan  $^3\text{H-E}_2$  son las mismas que expresan RE usando el AcM específico.



#### IV. Estudios en suspensiones celulares

Como hemos venido sosteniendo a lo largo de esta tesis las células stem son las responsables del crecimiento y diseminación de los tumores.

Estas células stem deberían ser en definitiva, el blanco esencial de cualquier tipo de terapia, por ello resulta fundamental comprender si alguna de las estrategias terapéuticas de uso corriente están realmente dirigidas contra las células stem. Por ejemplo, resultaría muy importante poder determinar si los antígenos utilizados para la producción de anticuerpos para su posterior utilización terapéutica, son realmente producidos por las células stem. En el caso específico de las células de cáncer de mama humano, resulta relevante determinar si los receptores hormonales son expresados por las células stem, debido a que el efecto antihormonal se vería reflejado en principio, solo en aquellas células que tuvieran receptores.

Como se mencionó en la introducción, la identificación de las células stem puede realizarse utilizando varias técnicas cada una de las cuáles posee ciertas limitaciones. El índice de captación de timidina utilizado en esta tesis ha sido de gran utilidad biológica, debido a que como hemos visto correlaciona con el curso de la enfermedad. Sin embargo nuestros estudios estarían indicando que la población de células que se encuentra sintetizando DNA no refleja con exactitud a la población de células stem pues: **a-** una porción del segmento de células stem se encuentra probablemente en un estadio quiescente de  $G_0$  y **b-** parte de las células conminadas a diferenciarse (transicionales) poseen aún una capacidad limitada de división.

Por otra parte, la técnica del ensayo clonogénico (78) detecta las células stem de los tumores a través de la capacidad de éstas de desarrollar colonias en agar semisólido. El número de células stem estimado mediante este método es sin embargo extremadamente bajo y refleja probablemente la capacidad de parte de la po-

blación de células stem de crecer **in vitro**. Por otra parte las células en  $G_0$  no entrarían en división luego de plaqueadas en agar semisólido (43).

Sin embargo una serie de trabajos indican que tanto el ensayo clonogénico como el índice de captación de timidina estarían enfocando a similares características debido a que se ha encontrado una correlación entre ambos, en cáncer de ovario (189) y más recientemente en tumores uroteliales (215).

Debido al no muy alto número de células recuperado en cada una de las fracciones del gradiente de albúmina, elegimos usar el TLI para estimar la población de células en crecimiento. Además con esta técnica nos fue posible detectar simultáneamente la síntesis de DNA y la expresión de CEA en células aisladas.

Con respecto a la expresión de CEA en células de cáncer de mama humano, existen resultados muy contradictorios. Mientras que Goldenberg y col. reportaron la ausencia de CEA en cáncer de mama humano (216), Wahren y col. encontraron que el 42 % de los pacientes con cáncer de mama, contienen células CEA positivas (217); sin embargo no se encontró ninguna correlación con el tipo de citología del tumor o el grado de diferenciación del tumor primario.

Por otra parte, Walker no encontró ninguna correlación entre el contenido de CEA a nivel celular y la recurrencia de la enfermedad (209). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron claramente que la expresión celular de CEA está aumentada en tumores mamarios más diferenciados (84). Los resultados obtenidos con suspensiones celulares sugieren que la subpoblación de células que posee mayor expresión de CEA difiere en principio de la subpoblación de células stem. Esta conclusión se basa principalmente en dos evidencias:

- 1- El pico de células que se encuentra en fase S es bastante agudo mientras que las células que expresan CEA están distribuidas a lo largo de todo el gradiente, con un mínimo en las fracciones 6 a 9.
- 2- En este estudio ninguna de las células que sintetizan DNA fueron positivas para CEA.

Las células detectadas en activa síntesis de DNA y con expresión de CEA corresponderían a células transicionales y no serían células stem.

Con respecto a la expresión de RE por parte de las células del cáncer de mama humano, la importancia clínica de su determinación ya ha sido claramente establecida. Sin embargo, también ha sido comprobado que incluso aquellos pacientes que inicialmente responden a la hormonoterapia, tienen recurrencia de la enfermedad a diferentes períodos de tiempo.

Esta falla terapéutica puede ser explicada esquemáticamente mediante dos hipótesis principales:

1) En cáncer de mama humano, podrían coexistir dos subpoblaciones celulares en diferentes proporciones, una de ellas compuesta íntegramente por células RE positivas que son depletadas luego del tratamiento hormonal, junto a una subpoblación de células RE negativas que son las que repoblarían el tumor luego de que las células RE positivas fueran eliminadas por dicho tratamiento (218).

2) A pesar de que existirían células con diferente contenido de RE, la subpoblación de células RE positivas expresaría dichos receptores durante el proceso de diferenciación. Las células stem de dicho clon celular serían RE negativas por lo que la hormonoterapia no sería curativa por sí misma (219). A pesar de que algunos autores han demostrado una relación inversa entre el contenido de RE y el TLI en cáncer de mama humano, estos resultados son compatibles con ambas hipótesis.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que en tumores primarios de mama, los RE son expresados en su mayoría por células diferenciadas. Esta interpretación se apoya principalmente en el hecho de que la subpoblación celular que expresa mayormente RE difiere de la que posee los más altos valores de TLI. Además alrededor de la mitad de las células RE positivas expresan también CEA, indicando que la expresión de RE está asociada a células más diferenciadas. Desafortu-

nadamente debido al tipo de técnicas empleadas no nos fue posible estimar simultáneamente RE y TLI. Nuestros resultados indican claramente que los RE se encuentran principalmente localizados en la fracción 10 que contiene células pequeñas, como se deduce de su diámetro nuclear. Esta observación contradice los resultados obtenidos por Bjoryesson y Sarfaty, quienes encontraron que la presencia de RE estaba asociada principalmente con las células más grandes en cáncer de mama (220). Estas discrepancias pueden tener su origen principalmente en las diferentes técnicas utilizadas para la disociación celular, la formación de los gradientes y la medición de RE. Más aún dichos autores reportaron una densidad celular extremadamente alta (1,12g/ml.), para las células tumorales, mientras que nosotros encontramos que las células epiteliales llegan al equilibrio a menores densidades, algo que fue confirmado con células aisladas de efusiones pleurales y con T47D.

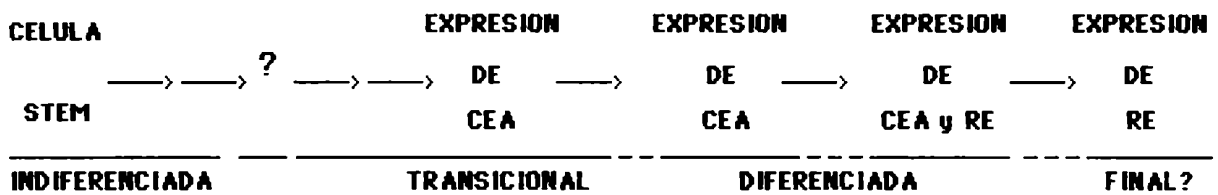
Una serie de artículos aparecidos durante el transcurso de esta tesis coinciden con las conclusiones obtenidas en nuestro trabajo. Kodama y col. demostraron en estudios realizados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 que la expresión clonal de RE aumenta en forma progresiva con el incremento en el número de células de un clon. Las células que expresan RE se originan a partir de progenitoras RE negativas y la expresión de RE se produce durante la diferenciación de los clones. Por otra parte los estudios realizados con el antiestrógeno tamoxifeno sugieren que la terapia hormonal no sería capaz de erradicar las células stem RE negativas (221). En relación con el efecto de los antiestrógenos, en un artículo previo se sugirió que la terapia hormonal estaría dirigida solo sobre el segmento de células diferenciadas y no sobre el segmento de células stem indiferenciadas (219).

Si los RE son realmente expresados por células diferenciadas y finales, la privación hormonal podría inducir una remisión clínica a través de un decrecimiento en este segmento de células tumorales. La reducción de células diferenciadas por medio de la terapia hormonal podría inducir una activación de la población de células stem que entrarían a dividirse y serían más sensibles a la quimioterapia.

---

En este caso, se podría sugerir que la administración secuencial de hormonoterapia y quimioterapia daría los resultados más efectivos. Sin embargo, el hecho de que el momento óptimo para la administración de la quimioterapia sería durante el pico de reclutamiento de las células stem, son necesarios más resultados para establecer dicho punto. Como se verá en la próxima sección, un trabajo publicado durante la realización de esta tesis, demuestra lo factible de este tipo de procedimiento.

Sobre la base de la evidencia obtenida, una secuencia de eventos durante el proceso de diferenciación celular puede ser sugerida. En el origen de dicho proceso de diferenciación estarían las células stem primitivas e indiferenciadas que no expresarían RE y CEA. En una segunda fase del proceso de expansión clonal y diferenciación celular, las células transicionales aún con capacidad de dividirse empezarían a expresar CEA. En una fase subsiguiente, durante la cual se produciría un cambio en la morfología celular, las células dejarían de dividirse produciendo CEA. Posteriormente, ocurriría la expresión simultánea de CEA y RE hasta que en una fase final, más parecida a la del tejido normal, ocurriría una represión en la expresión de CEA, pero no de RE. Esto se ejemplifica en el siguiente esquema:



Además de los resultados obtenidos en esta tesis diversas evidencias apoyarían este esquema de diferenciación. CEA es una glicoproteína de secreción de aproximadamente 200 K de peso molecular relativo. En los tumores más diferenciados la expresión morfológica de CEA ocurre de tres maneras diferentes:

- a- una forma más primitiva, con localización intracitoplasmática posiblemente como resultado de la incapacidad celular de secretarlo.
- b- otra forma más cercana a la normal, constituida por túbulos donde CEA es secretado a la luz tubular, bastante similar a lo observado en la mucosa rectocolónica normal productora de CEA (222).
- c- un paso posterior de diferenciación en cáncer de mama humano que estaría representado por las formaciones tubulares que son negativos para CEA, lo que estaría relacionado con el hecho de que a diferencia de la mucosa rectocolónica normal, el tejido mamario normal no expresa CEA (A. I. Bravo, comunicación personal). Sin embargo el tejido normal posee receptores estrogénicos determinados mediante el uso del ensayo bioquímico (223) así como por el método de autorradiografía ya descrito (191).

#### **V. Efectos estrogénicos sobre la proliferación celular**

Los mecanismos por los cuales los estrógenos pueden llegar a regular el crecimiento tumoral no han sido completamente definidos. Por ejemplo existen grandes controversias acerca de si estos poseen realmente un efecto directo sobre líneas celulares de cáncer de mama en cultivo; paradójicamente todos los grupos coinciden en afirmar que el efecto inhibitorio producido por los antiestrógenos puede ser revertido por estradiol aunque no totalmente (83).

A pesar de los controvertidos resultados in vitro, los estudios coinciden en que el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de mama RE positivas en ratones atímicos, es estrógeno dependiente (83). Diversos autores sugieren que esta aparente controversia entre el efecto de estradiol in vitro e in vivo estaría relacionada con la liberación in vivo de factores de crecimiento, no de origen mamario, por

efecto estrogénico (96). Algunos autores los denominaron estromedinas (224). Sin embargo estudios posteriores de Osborne y col. entre otros, demostraron que el crecimiento de células MCF-7 no ocurre en tumores ovariectomizados, pero puede ser restituido mediante el suplemento de estradiol (225). La línea celular ZR75-1 que contiene RE posee un comportamiento similar, mientras que la línea MDA-231 que no contiene receptores no es influenciada por los tratamientos descritos y crece rápidamente incluso en ratones ovariectomizados (225), sugiriendo que el efecto estrogénico ocurriría a través de la unión del estradiol a sus receptores específicos y no a un efecto indirecto mediado por un factor de crecimiento ya que solo las líneas RE positivas fueron afectadas.

No son muchos los estudios realizados acerca del efecto de hormonas esteroideas sobre la proliferación del cáncer mamario humano primario o metastásico. Dao y col. estudiaron en 10 pacientes el efecto de concentraciones fisiológicas de estradiol y progesterona sobre la proliferación de múltiples metástasis en piel de cáncer primario de mama. Biopsias realizadas 3 días después del inicio del tratamiento demostraron un incremento significativo en el TLI de 7 de los tumores, de los cuáles 4 eran positivos y 3 negativos para RE (226).

Durante la realización de esta tesis, Conte y col. estudiaron el efecto de la administración de estrógenos sobre la proliferación tumoral en 16 pacientes. Tres días después de la administración de un análogo estrogénico, las biopsias permitieron comprobar un incremento significativo en el TLI de 8 pacientes, independientemente del contenido de RE (227).

En coincidencia con los estudios descritos en forma precedente y llevados a cabo in vivo sobre pacientes con cáncer de mama, nuestros resultados demuestran que concentraciones de  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M de  $E_2$  inducen un aumento significativo en la proliferación de los tumores primarios de mama in vitro. Este efecto parece ser independiente de la presencia de receptores estrogénicos ya que más del 50 % de los tumores sin receptores aumentan su TLI luego de una incubación con dichas concen-

traciones de  $E_2$ . Más aún, el incremento promedio en el TLI es más notable en aquellos tumores RE negativos.

Nuestros resultados sugieren que el efecto estrogénico sería directo sobre las células tumorales y no estaría mediado por la liberación in vivo de estromedinas. El hecho de que estradiol a una concentración de  $10^{-7}$  M no induce efectos importantes salvo en dos casos, estaría indicando la importancia de dicho efecto a nivel fisiológico.

Una de las preguntas más relevantes que rugen de estos resultados es si el mecanismo por el cual  $E_2$  incrementa el TLI es similar en los tumores RE positivos y RE negativos. El comportamiento similar detectado bajo las diferentes condiciones experimentales (concentraciones diferentes de  $E_2$ , efecto de agonista y antagonistas de  $E_2$ ) parecería indicar eso. En este caso ¿cuál sería el mecanismo molecular?.

Antes de abordar respuestas hipotéticas a esta pregunta convendría tomar en consideración lo siguiente: el nivel basal para definir un tumor RE positivo (alrededor de 10 fmoles/mg de proteína) se obtuvo a partir de la respuesta clínica al tratamiento endocrino. El mecanismo de esta respuesta está aún lejos de ser claro y se puede deber tanto a la desaparición de la población diferenciada y/o a la inhibición de la proliferación celular. Varias posibilidades que expliquen la respuesta similar de tumores RE positivos y negativos pueden ser postuladas:

- a)** algunos tumores considerados RE negativos podrían contener una cantidad suficiente de células RE positivas que permitiera la inducción estrogénica. En este sentido cabe mencionar que dos tumores respondedores del grupo de RE negativos, contenían cierta cantidad de RE.
- b)**  $E_2$  podría actuar en forma indirecta sobre las células stem (RE negativas) a través de su acción sobre células más diferenciadas (RE positivas) induciéndolas a liberar factores de crecimiento autocrinos. Esta posibilidad no debería ser considerada en los tumores RE negativos, aunque no debe descartarse la presencia de un porcentaje variable de células RE positivas en estos tumores en forma similar a lo mencionado en **a**).



**c)**  $E_2$  actuaría sobre la proliferación del cáncer de mama humano por un mecanismo independiente de RE. Sin embargo resulta prematuro sugerir que el efecto del  $E_2$  no está mediado por los RE ya que tanto el agonista DES como los antagonistas NAF y TAM revirtieron el efecto de  $E_2$  tanto en tumores RE positivos como negativos.

A este respecto cabe señalar que estos tres compuestos llevaron el TLI a su nivel original pero no fueron capaces de anular completamente la replicación del DNA. Por lo tanto es posible postular la existencia de dos poblaciones de células en replicación, una independiente de la influencia de  $E_2$  y por lo tanto insensible a sus agonistas y antagonistas DES, NAF y TAM y otra  $E_2$ -dependiente. Esta última podría corresponder a un estadio diferente de la diferenciación celular (posiblemente células transicionales). En este sentido, cabe mencionar que aquellos tumores con altos porcentajes de células en replicación fueron los menos afectados por el  $E_2$ . En coincidencia y como se mencionó previamente, nuestros resultados (tabla 8) y los modelos matemáticos del crecimiento de tumores por mecanismos de autorrenovación sugieren que altos TLI estarían reflejando un mayor número de divisiones en el segmento de células transicionales y no en el de células stem.

**d)**  $E_2$  podría actuar a través de una población de RE diferente de los RE responsables de la inducción del RPg. Como hemos visto previamente la expresión de RE fue asociada en gran parte a células pequeñas de alta densidad y en menor medida a células grandes de baja densidad. Estas últimas que no expresan CEA en forma simultánea aunque cosedimentan con células CEA positivas eran morfológicamente similares a las que se encuentran ciclando, es decir células de gran tamaño, núcleos claros y gran relación núcleo/citoplasma. Recientemente Markarievich y col. demostraron que la síntesis de DNA en cáncer de mama estaría relacionada con un estímulo estrogénico sobre los receptores nucleares de tipo II, mientras que el tipo I estaría relacionado con la inducción de la síntesis del receptor de progesterona (235). En ese caso se podría especular con que las células de mayor tamaño poseen el tipo II y las pequeñas el tipo I. Resulta obvio señalar que son necesarios estudios más profundos para poder clarificar las diferentes hipótesis.

La utilización de una terapia estrogénica para el tratamiento hormonal aditivo fue muy frecuente hasta fines de la década del 70. Estudios comparativos realizados en pacientes con tumores avanzados demostraron que la remisión total o parcial utilizando DES fue del 41 % de los pacientes contra un 33 % con TAM (228). Sin embargo estudios posteriores decidieron la utilización exclusiva del antiestrógeno no esteroide TAM en lugar de NAF o DES, debido principalmente a su fácil administración, alta tolerabilidad y bajos efectos tóxicos colaterales.

Nuestros estudios indican que el agregado de dietil etilbestrol, tamoxifeno o nafoxidina inhibe el efecto mitogénico inducido por estradiol, tanto en tumores positivos como negativos para receptores estrogénicos. Sin embargo se observaron diferencias importantes según el inhibidor agregado. En general, la inhibición producida por el agregado de DES fue solo parcial en todas las condiciones estudiadas. Las mayores inhibiciones se obtuvieron con el agregado de NAF o TAM.

El efecto de estos compuestos sobre la proliferación celular ha sido ampliamente estudiado. Curiosamente los antagonistas estrogénicos pueden actuar como agonistas dependiendo del tejido blanco (83). En líneas celulares de cáncer de mama se ha observado que los diferentes compuestos difieren sustancialmente en su interacción con el estradiol (229). DES es un competidor muy efectivo de estradiol en todas las características analizadas (229). Sin embargo NAF y TAM inhiben el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama con inducción nula o parcial respectivamente de receptores de progesterona.

Debido a que el agregado de estradiol revierte parcialmente el efecto del tamoxifeno se sugirió que este último podía tener sitios específicos de unión no competitivos con estradiol. Se demostró que concentraciones de tamoxifeno por encima de 10  $\mu\text{M}$  poseen efectos inhibitorios que no pueden ser revertidos por estradiol induciendo una acumulación de células en  $G_0 - G_1$  incluso en líneas celulares que no poseen receptores estrogénicos (94). Estos sitios de unión específicos del tamoxifeno y de otros derivados del trifeniletileno, no solo se han encontrado en líneas de cáncer de mama humano que contienen receptores estrogénicos, sino también en tejidos

no blanco de la rata (231) y humano (232) pero principalmente en líneas de cáncer de mama receptor estrogénico negativas (233). Faye y col. demostraron que una variante subclonada de células MCF-7 cuyo crecimiento no es inhibido por antiestrógenos, no contiene los sitios de unión específicos del tamoxifeno (234).

Estudios en pacientes demostraron que los niveles plasmáticos del tamoxifeno llegan a  $10^{-6}$  M siendo esta concentración mayor a nivel intracelular. Por lo tanto es factible suponer que el tamoxifeno pueda actuar a través de ambos tipos de receptores, los propios y los estrogénicos (94).

Cuando se comparó el nivel de expresión de la proteína ras p-21 con la positividad para RE no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de tumores RE positivos y el de RE negativos, a pesar de que el segundo grupo parece tener una mayor expresión de la proteína oncogénica. Sin embargo cuando la expresión de ras p-21 se determinó en función de la respuesta al efecto estrogénico pudimos observar que en el caso de los tumores RE positivos, los respondedores a  $E_2$  expresaron niveles menores de ras p-21 (estadísticamente significativos) que los no respondedores. El porcentaje de expresión de ras p-21 de este último grupo fue muy similar al de los tumores RE negativos. Con respecto a esto un trabajo muy reciente de Kasid y col. demostró que la línea celular estrógeno dependiente MCF-7 transfectada con el oncogene V-H-ras (MCF-7 ras) pierde su hormono dependencia, produciendo tumores en ratones atímicos en forma independiente de la presencia de estrógenos (245). Debido a que el nivel de RE y la Kd hormona-RE permanecieron invariables en las MCF-7 ras, los autores sugirieron que en las MCF-7ras, el oncogene activado habría reemplazado el efecto estrogénico. En un estudio posterior los mismos autores demostraron una inducción de la síntesis de fosfoinosítidos (F.I.) en MCF-7 en presencia de  $E_2$ ; sin embargo las MCF-7ras mostraron un nivel basal de F.I. similar al obtenido con las MCF-7 inducida por  $E_2$  (246).

El hecho de que en tumores primarios, RE positivos, el nivel de expresión de la proteína oncogénica ras p-21 de los no respondedores a  $E_2$  sea muy superior al de los respondedores y similar al de los tumores RE negativos podría estar sugiriendo

una analogía con lo observado en la línea MCF-7, es decir, que la falta de respuesta de ciertos tumores RE positivos a  $E_2$  se podría deber a los niveles elevados de ras p-21.

## **VI. Expresión de p-21 en tumores primarios de mama**

La activación de protooncogenes celulares parece ser uno de los mecanismos más importantes en los eventos que llevan a la iniciación, promoción y progresión tumoral. Esta activación puede ocurrir a través de mutaciones puntuales, deleciones, amplificación génica u otros mecanismos hasta el momento desconocidos. Una de las familias de oncogenes celulares que ha sido frecuentemente asociada a una gran variedad de tumores malignos es la del gene ras. La familia del oncogene ras ha sido el centro de intensos estudios en los últimos años. Estudios de transfección usando células NIH3T3 detectaron la activación del c-Ki-ras en DNA obtenido de diversos tumores de origen epitelial.

La capacidad de estos genes de inducir transformación de células NIH3T3 es el resultado de un cambio en un nucleótido que altera el amino ácido 12 en el producto proteico de 21000 Dalton, (ras p-21). Recientemente se observó que cambios que afectan el amino ácido 61 de la p-21, también pueden inducir transformación (236).

Sin embargo solo un pequeño porcentaje de los tumores humanos primarios (generalmente entre el 10 y 20 %) demuestran poseer ras activado mediante la técnica de transfección. Es decir que en la mayoría de los tumores estudiados no se han detectado cambios cualitativos en p-21 (mutación). Alternativamente, la expresión aberrante del gene ras podría estar relacionada con cambios cuantitativos en la expresión del protooncogene normal.

Como mencionamos en la introducción, mediante la utilización de técnicas de recombinación genética, se pudo activar el c-Ha-ras normal colocando un LTR de retrovirus en forma adyacente (237). A pesar de que este tipo de alteraciones no

jugarían un rol preponderante en la tumorigénesis humana sugieren sin embargo que, alteraciones en la regulación de la expresión del c-ras que pasarían inadvertidas por el mecanismo de transfección, podrían estar relacionadas con eventos carcinogénicos.

Utilizando un anticuerpo monoclonal producido contra p-21 solubilizada de membrana (109) pudimos demostrar que más del 60% de los carcinomas primarios de mama poseen ras activado. Recientemente Hand y col. demostraron que más del 90% de los carcinomas primarios de mama poseen ras activado (238). Los autores utilizaron un anticuerpo monoclonal producido contra un oligopéptido conteniendo la secuencia de amino ácidos de la posición 10 a 17 del producto del c-ras por lo que es posible que la diferencia en el porcentaje de tumores positivos se deba principalmente a la utilización de diferentes anticuerpos.

Nuestros resultados coinciden con los de Hand y col. en el sentido que la expresión de p-21 en carcinomas primarios de mama es muy heterogénea, tanto en lo que se refiere al porcentaje de células que expresan p-21 así como a la intensidad de la expresión. Pudimos demostrar asimismo que la mayor parte de los tumores diferenciados no expresan ras o poseen muy bajos niveles de expresión (<1% células positivas); una mayor expresión del ras fue asociada con tumores más indiferenciados.

Cuando comparamos la expresión de p-21 con la de otros marcadores de diferenciación como RE, pudimos observar que aquellos tumores con las mayores expresiones de p-21 eran en general negativos para RE. Sin embargo no hubo diferencias en el porcentaje total de tumores positivos para p-21 cuando fueron discriminados según su contenido de RE. En un trabajo publicado durante el transcurso de esta tesis De Bortoli y col. pudieron determinar que el 68 % de los tumores de mama positivos para RE contienen niveles de p-21 10 veces mayores que los del tejido normal, mientras que la mayoría de los tumores negativos para RE (62%) tienen elevado solo 3 veces el nivel de p-21 por sobre lo normal. Fue posible observar sin embargo que los únicos dos tumores con niveles normales de p-21 así como los dos tu-

mores con el mayor nivel de expresión del oncogene eran negativos para RE. Es decir, que a pesar de que los resultados estarían indicando una posible correlación entre la presencia de RE y niveles elevados de p-21 los resultados no son concluyentes. Los autores demuestran asimismo que los niveles elevados de p-21 estuvieron acompañados de una alta actividad de GTPasa, lo que estaría indicando que el aumento de expresión de p-21 en carcinoma de mama correspondería a la proteína normal y no a la mutada.

Con el objeto de poder establecer la posible correlación entre la expresión de p-21 y el estado proliferativo del tumor, comparamos el nivel de p-21 con el TLI tumoral, observando que los mayores índices de proliferación se encuentran asociados a una mayor expresión del oncogene. Un trabajo reciente demuestra que 19 de 20 tumores primarios de cáncer de mama con más de 4 ganglios con metástasis, poseen una moderada a fuerte intensidad de expresión de p-21 contra solo 10 de 21 casos de tumores primarios con ganglios negativos (240).

Diversos estudios han demostrado que el tiempo libre de recurrencia de la enfermedad está correlacionado con el número de ganglios positivos. Mientras el 50 % de los pacientes con 4 o más ganglios positivos recurren antes de los 20 meses, todos los pacientes con tumores de mama sin ganglios metastásicos tuvieron un tiempo libre de recurrencia que superó los 30 meses (241). Por otra parte, tumores con bajos niveles de TLI han sido asociados con un bajo número de ganglios metastásicos (< de 4) (242). Estos resultados estarían sugiriendo que los altos niveles de p-21 encontrados en tumores con más de 4 ganglios metastásicos tendría relación con altos niveles de TLI y posiblemente con un bajo contenido de RE.

Nuestros estudios demuestran que la presencia del antígeno carcinoembrionario se encuentra asociada a dos subpoblaciones con morfología diferente: **a)** una subpoblación de células pequeñas y núcleos oscuros, sin capacidad proliferativa; **b)** una subpoblación de células de mayor tamaño y núcleos más claros que muestran potencial proliferativo. Por otra parte los estudios realizados con suspensiones celulares permite asociar la subpoblación **a** con el segmento de células de alta densi-

dad, mientras que la subpoblación **b** podría estar relacionada con la de células de densidad intermedia o baja, aunque estas últimas no parecen poseer potencial proliferativo cuando se las incubaba 4 horas en presencia de  $^3\text{H}$ -tim. Los estudios realizados con el anticuerpo Y13-259 muestran que la expresión de dicha proteína oncogénica se produce en la subpoblación **b** en forma exclusiva; no observamos expresión de p-21 en el tipo celular **a**. Nuestros resultados estarían sugiriendo además que un segmento de células tumorales del tipo **b** expresan simultáneamente CEA y p-21.

Por otra parte obtuvimos evidencias muy claras de que células en estadios activos de proliferación (ó en  $G_0$ ) pueden expresar p-21 y no CEA. La expresión de p-21 estaría asociada con estadios tempranos en la jerarquía celular relacionados con la célula stem. En un siguiente paso la célula expresaría p-21 y CEA en forma simultánea. Estas células de tipo transicional mantendrían aún su capacidad proliferativa aunque en forma limitada. Luego la célula transicional expresaría solo CEA hasta llegar a la célula final de acuerdo al esquema que se sugirió previamente.

Un reciente trabajo en cáncer de próstata confirma nuestros resultados en el sentido que la expresión de p-21 está inversamente correlacionada con el grado de diferenciación y que se encuentra asociada a las células más anaplásicas que componen los tumores (243).

La regulación de la transcripción del oncogene ras es un tema de intensos estudios. Recientemente se demostró que tumores murinos estrógeno-dependientes inducidos por DMBA muestran expresión aumentada de p-21 (244), mientras que los hormono-independientes poseen bajos niveles de dicho oncogene. Por otra parte una reducción en los niveles de p-21 precede a la regresión del tumor luego de una ooforectomía (246).

Un estudio reciente del grupo de I. Pastan demostró que la región del promotor del protooncogene H-ras1 posee un alto contenido de G+C, con repeticiones CCGCCC y su inversa complementaria GGGCGG, no contiene el box TATA ni el CAAT. Estas características del promotor del ras son muy similares al promotor del receptor de EGF, en lo que respecta al gran contenido en G+C y la ausencia de las se-

cuencias TATA y CAAT. Debido a que las regiones ricas en G+C serían sitios de unión de factores positivos de transcripción como por ejemplo el SP1 en el virus SV40 los autores sugirieron una similar regulación de la expresión de ambos protooncogenes (247).

Un trabajo muy reciente del grupo de P. Chambon que ha clonado el c-DNA del RE de células MCF-7, demuestra que existe una gran homología entre la secuencia nucleotídica del c-DNA del RE con el del oncogene erb-A. Este último tendría como función mantener la expresión del oncogene erb-B que como se sabe posee gran homología con el EGF (248).

Con respecto a la localización intracelular de la p-21 estudios previos realizados por E. Scolnick y col. (109) demostraron la localización de p-21 en la parte interna de la membrana plasmática. Resultados posteriores de Hand y col. le asignaron una localización intracitoplasmática en cáncer de mama y de colon humano (238). Sefton y col. demostraron que la adición post-traducción de lípidos a la p-21 sería el mecanismo por el cuál la proteína oncogénica adquiere afinidad por la membrana (249). Previo a la adquisición del lípido, el producto primario de la traducción (p-21) estaría localizado en el citosol (249). Estudios posteriores sugirieron la importancia de un efectivo proceso post-traducción y agregado de lípidos, para la transformación maligna (250).

En función de estos datos es posible suponer que la localización intracitoplasmática detectada por el grupo de Schlom como por nosotros en células de cáncer de mama estaría indicando que las células tumorales mamarias habrían perdido la capacidad de producir las modificaciones post-traducción en la p-21. En vista de que esta modificación estaría asociada a la capacidad de transformación (250) quedaría por establecer con mayor certeza si los niveles elevados de p-21 intracitoplasmático juegan un rol importante en la iniciación del proceso de transformación maligna.

Otro de los aspectos interesantes de nuestro trabajo resultó la no detección de p-21 en cortes por congelación. Wierenge y col demostraron que toda mutación que lleva a un cambio en el residuo 12 de la p-21 produce una alteración en su capacidad



de unir de GDP ó GTP (252). Debido a que el anticuerpo monoclonal utilizado en nuestro trabajo Y13-259, fue el único de los ocho anticuerpos obtenidos por el grupo de E. Scolnik que inhibió la unión de GDP a la p-21 (109) resulta razonable suponer que el epitope se encuentra en la estructura interna de la proteína, lo que explica la falta de detección de ras-p 21 en cortes por congelación y la necesidad de una desnaturalización previa con p-formaldehído.

## VII. Expresión del c-myc

Los diversos estudios llevados a cabo acerca de la expresión del mRNA de oncogenes en tumores primarios adolecen de una falta de información común a todos y es que no dan respuesta acerca de qué tipo de células son las responsables de la expresión de dicho transcripto. Este dato resulta menos relevante en estudios con líneas celulares ya que la mayor parte de las células poseen características similares y las diferencias tienen en general relación con la fase del ciclo en que se encuentran y no debido a su heterogeneidad.

Sin embargo en el estudio de tumores humanos no puede dejar de considerarse la existencia de una gran heterogeneidad celular. Los tumores están compuestos por células de diversos orígenes y por tejido conectivo, en una relación que difiere en cada tumor. Las células pueden ser de tipo epitelial tumorales o contaminantes normales, fibroblastos, linfocitos, endoteliales, etc. Por otra parte las células epiteliales tumorales que componen un tumor humano no son funcionalmente similares, como fue demostrado en esta tesis y en otros trabajos.

El uso de técnicas de hibridación in situ o hibridación histoquímica (253), descrita en esta tesis puede ser aplicable tanto a líneas de cultivo así como a cortes de tejido. Los resultados presentados aquí demuestran la capacidad de esta técnica de discriminar la localización intratumoral de transcriptos de genes a nivel de una célula. De esta forma es posible determinar cuáles son las células responsables de

la expresión de un gene en un tejido dado. Asimismo esta técnica puede permitir el "barrido" de bancos de clones de c-DNA a través de su hibridación con subpoblaciones celulares específicas.

Puede usarse como alternativa o complemento de las hibridaciones en nitrocelulosa. Es beneficiosa además ya que se necesitan sólo alrededor de  $1-2 \times 10^4$  células por muestra y evita tener que aislar el RNA mensajero, siendo posible obtener los resultados en forma semicuantitativa utilizando los controles apropiados.

La hibridación in situ fue aplicada en un principio para demostrar la localización cromosómica de genes; por ejemplo la del c-myc en el cromosoma 8 (146) o más recientemente la del c-ras en los cromosomas 6 y 12 (254). En forma simultánea diversos trabajos demostraron la expresión del mRNA de genes de *Drosófila* en cortes de tejido (199,200) o de secuencias virales en células infectadas (197).

Recientemente Ohlsson y col. demostraron que la expresión del c-myc en placenta humana es muy elevada durante el primer mes con un pico a las 4-5 semanas luego de la concepción. Los datos obtenidos por "Northern" y "Dot Blot" fueron corroborados por medio de análisis por hibridación in situ. Sin embargo, mediante la técnica de hibridación in situ, los autores pudieron observar además que la expresión del c-myc está confinada específicamente a los citotrofoblastos y en forma particular a aquellos en activa proliferación (196).

En un trabajo posterior demostraron que el c-sis también se localiza en los citotrofoblastos y que estos pueden responder a PDGF exógena, por lo que sugirieron que la placenta humana sería un ejemplo de regulación autocrina normal (159).

Los estudios realizados por medio de esta técnica en tumores son muy escasos. Recientemente J. Gu y col. analizaron la expresión del c-myc por hibridación in situ en diversas líneas de cáncer de pulmón y neuroblastoma observando que la expresión del oncogene se encuentra elevada en casi todas las células (255). Esto coincide con el hecho de que una línea tumoral en cultivo está compuesta por casi un 100% de células stem. Por otra parte confirmaría resultados previos en el sentido de que

en células transformadas la expresión del myc es constitutiva y no depende del ciclo celular (161).

Esta situación sin embargo es muy diferente en tumores primarios donde sólo un porcentaje determinado de las células que lo componen son células stem existiendo además un segmento de células transicionales con capacidad proliferativa limitada.

En este trabajo hemos demostrado que el 63 % (12/19) de los tumores primarios de mama poseen de 2 a 15 veces más células con expresión de c-myc que la placenta humana. Esta expresión es muy heterogénea y el porcentaje de células que expresan el transcripto varía entre los diferentes tumores. El mayor porcentaje de células con expresión positiva de c-myc en un tumor fue 34%. Además observamos que parte de las células expresan c-myc con mayor intensidad que otras, dentro de un mismo tumor.

Nuestros resultados muestran además que la expresión del c-myc tiende a estar correlacionada en forma directa con los niveles de proliferación tumoral, salvo en dos casos que fueron ya comentados en la sección Resultados. En general el porcentaje de células con expresión de c-myc en un tumor dado fue siempre mayor que el de las células en proliferación.

Estudios realizados en células 3T3 demostraron que la expresión del c-myc es similar en células quiescentes y transformadas y su expresión no estaría regulado por el ciclo celular (161). En la línea promielocítica humana HL-60 la reducción observada en la expresión del c-myc está relacionada con una inducción de la diferenciación y no con la entrada en  $G_0/G_1$  de las células indiferenciadas (177). Estos datos fueron confirmados en la línea murina de teratocarcinoma F9 donde se produjo una caída de 15-20 veces en la expresión del c-myc en células diferenciadas con ácido retinoico (161). Estudios similares en una línea de leucemia mieloide murina y en una línea de células T de pollo demostraron que la expresión del c-myc es invariable a lo largo del ciclo y depende del estado proliferativo de la célula (179,256).

Estudios muy recientes en 6 muestras de cáncer de colon sugieren que la expresión del c-myc no estaría regulada durante el ciclo celular ya que el aumento de expresión correlacionó con un incremento en la expresión de genes tanto de G1 como de S (257).

En función de estos resultados es posible afirmar que la expresión del c-myc en células transformadas dependería del estado proliferativo de la célula y no estaría regulada por el ciclo celular. Nuestros estudios no permiten determinar con claridad estos eventos en cáncer de mama humano. Sin embargo el hecho que el porcentaje de células con expresión de c-myc no solo correlacionó en líneas generales con el potencial proliferativo de los tumores sino que estuvo inversamente correlacionado con la diferenciación tumoral y que la mayor expresión del protooncogene se observó en aquellos tumores con baja expresión de CEA sugiere que la diferencia entre el porcentaje de células que expresan c-myc y el de las proliferantes, podrían ser células quiescentes en  $G_0$ .

Los estudios morfológicos desarrollados in situ a través de la determinación simultánea de la expresión del c-myc y de CEA nos permiten afirmar que la expresión del transcripto del protooncogene estaría confinado a células que no expresan CEA.

Como se mencionó en la introducción, la transformación maligna requiere de una serie de eventos secuenciales, en los cuáles fueron involucrados al menos dos tipos de oncogenes; el producto protéico de uno de ellos tendría localización nuclear (p.ej. c-myc) y el otro citoplasmática o membranal (p.ej. c-ras). La función de los genes relacionados con el primer grupo sería inducir por mecanismos aún desconocidos, la inmortalización de la célula stem. Con respecto al segundo grupo, su función debería estar relacionada con la transmisión de señales del exterior de la membrana nuclear, hacia su interior.

Resultados mencionados previamente en MCF-7 sugieren que el oncogene ras podría estar involucrado como intermediario en la transducción de señales de hormo-

nas y posiblemente factores de crecimiento a través del mecanismo del inositol fosfato (258).

Slamon y Cline demostraron que la expresión del c-Ha-ras y la del c-myc se encuentra aumentada en forma considerable durante el desarrollo fetal y embrional del ratón (259). La participación de los protooncogenes c-myc y c-Ha-ras en la proliferación celular fue confirmada por Makino y col. trabajando en regeneración hepática de hígado de rata (260). Los autores demostraron que el aumento en la expresión del c-myc ocurre en forma previa a la del c-Ha-ras (260). Otros estudios del mismo grupo demostraron que la expresión del c-Ha-ras se encontraba aumentada en tumores primarios de hígado de rata, en zonas no tumorales de dicho tumor y en líneas celulares de hepatomas, mientras que solo el tumor primario ó las líneas celulares tenían elevado el c-myc (261).

No abundan en la literatura los estudios acerca de la expresión simultánea de c-ras y c-myc en tumores humanos. En un trabajo realizado en cáncer de cuello uterino se observó una amplificación genómica del c-Ha-ras y del c-myc en 8 de 9 tumores avanzados (estadíos 3 y 4). Esto no fue observado en estadíos primarios del tumor, por lo que se consideró que estos oncogenes estarían relacionados con la progresión tumoral y no con su iniciación (262). Estos resultados difieren en lo que respecta al c-ras cuando se compara con el carcinoma de colon; en este último la expresión de p-21 se encuentra aumentada en tumores en estadíos iniciales B y C de Duke. En estadío D no se observan niveles elevados, mientras que en los metastásicos hubo una reducción en el nivel de expresión de p-21 con respecto al tejido normal adyacente (263).

Estudios muy recientes en diferentes tumores demostraron amplificación genómica del c-myc, acompañado en determinadas circunstancias (en general tumores avanzados) de deleciones alélicas del c-ras. Estas deleciones fueron más evidentes en metástasis que en tumores primarios (264). Esto difiere en alguna medida de lo observado en cáncer de mama donde tumores con ganglios positivos poseen nive-

les más elevados de expresión del c-ras que los tumores con ganglios negativos (240).

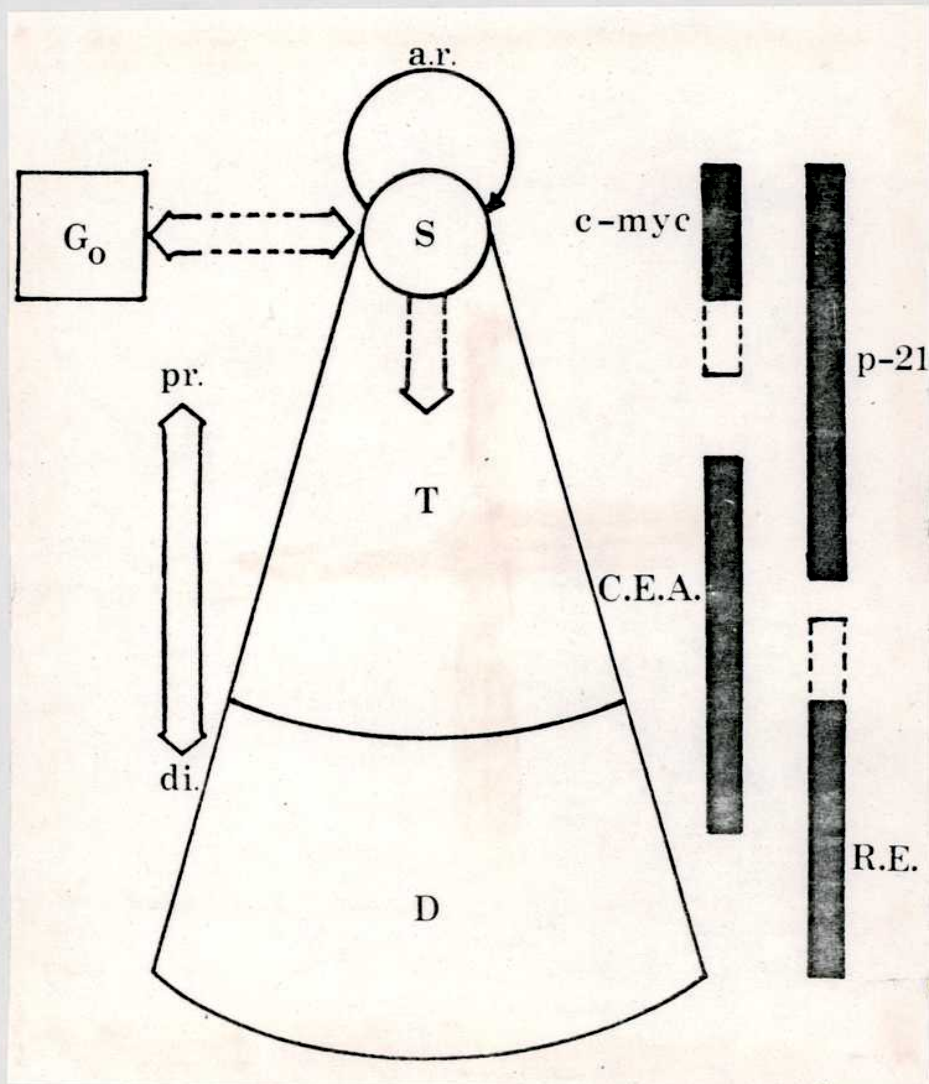
En lo que respecta al cáncer de mama humano, se ha observado expresión aumentada del c-myc como producto de la amplificación génica en 1 de 5 líneas celulares (265). Posteriormente Slamon y col. demostraron expresión aumentada en 4/4 carcinomas de mama (266) y en un trabajo muy reciente Escot y col. observaron expresión aumentada del c-myc en el 71% de los tumores (10/14), porcentaje bastante similar al obtenido en nuestro trabajo; sin embargo sólo en 6 de los 10 tumores se observó amplificación génica del c-myc, razón por la cual la expresión aumentada en el resto de los tumores estaría relacionada con una desregulación de la transcripción (267).

Los resultados obtenidos en nuestros estudios en carcinomas primarios de mama en lo que respecta a la coexpresión del c-myc y el c-ras son muy variables. Se observó la presencia de tumores con alta expresión de ambos protooncogenes, con expresión aumentada de solo uno de ellos o sin expresión de ninguno. De los 5 tumores con la mayor expresión del c-myc, 3 estuvieron asociados a una alta expresión del c-ras. Cabe señalar asimismo que aquellos tumores con alta expresión de ambos protooncogenes tuvieron los índices de proliferación más elevados de todos los tumores estudiados.

Por otra parte, el hecho de que la expresión de ambos protooncogenes se encuentra asociada a altos índices de proliferación e inversamente relacionadas con los diferentes estadios de diferenciación celular, sugiere fuertemente que la expresión aberrante de los mismos ocurre a nivel de las células stem en apoyo de la teoría acerca del crecimiento de tumores sólidos a partir de dichas células.

En la figura 56 presentamos lo que consideramos es la secuencia de eventos que se producen durante el proceso de expansión clonal de las células stem en cáncer de mama. Como podemos ver, las células stem poseen dos alternativas por su condición de tal, que son la de proliferar o permanecer en  $G_0$ .

Este estadio en el cuál se estarían expresando los genes *ras* y *myc* podría estar regulado por factores de crecimiento y posiblemente hormonas mitogénicas o eventualmente por una regulación autocrina. Durante el proceso de expansión clonal que lleva a la diferenciación, las células se dividen sintetizando p-21 y posiblemente el producto del *c-myc*. En un paso siguiente y aún con capacidad de división pero ya en el segmento transicional, las células expresan simultáneamente CEA y p-21, seguido de cambios morfológicos y represión del gene *ras*. Posteriormente y ya en una etapa de diferenciación las células expresan CEA y RE para finalmente reprimir el gene de CEA y expresar solo RE.



**Figura 56.** *Expresión de c-myc, ras p-21, CEA y RE en cáncer de mama de acuerdo al modelo de las jerarquías celulares. Para el detalle de las abreviaturas ver figura 1. ■) indica que la expresión en ese segmento de células estaría demostrada; □) indica que la expresión no ha sido totalmente demostrada.*

## CONCLUSIONES


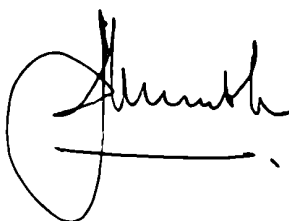
Creo que los datos presentados en esta tesis resultan un aporte tanto en el aspecto básico como en el aplicado, en el estudio acerca de la heterogeneidad celular en el cáncer de mama.

En la primera parte de la introducción sostuve que dentro de la investigación de la biología del cáncer es posible definir una serie de objetivos primordiales relacionados con los posibles mecanismos primarios de la oncogénesis, con la dinámica del crecimiento tumoral y con la búsqueda de marcadores que permitan racionalizar los tratamientos terapéuticos.

Como hemos visto se han efectuado en esta tesis diversos aportes dentro de los objetivos fijados: **a-** demostramos que existe una subpoblación de células stem que sería la única con capacidad de proliferación dentro de la heterogénea masa celular de los tumores la cuál debe ser el blanco de todo tipo de terapia; **b-** se constató además que el segmento de células proliferantes contiene no solo a las células stem sino a una subpoblación de células transicionales en vías de diferenciación; **c-** asimismo se demostró la existencia de células en estado de reposo que serían inducidas a entrar en ciclo por efecto estrogénico, dato relevante no solo en lo que respecta a la dinámica del crecimiento tumoral sino a los efectos del uso de las terapias convencionales con citostáticos que actúan a nivel de la replicación del DNA; **d-** se pudo demostrar casi con total certeza que la expresión de los oncogenes *myc* y *ras* estaría relacionada con los mecanismos de proliferación de las células stem por lo que es posible sugerir que los tumores se originarían a partir de eventos que afectarían a dichas células en forma específica; **e-** a pesar de no haber abordado la búsqueda de marcadores de células stem, el hecho de haber demostrado la existencia de dicha subpoblación celular en cáncer de mama humano implica que la búsqueda debe estar orientada hacia antígenos que sean solo expresados por este tipo de células y no por las demás subpoblaciones; **f-** nuestros resultados permiten sugerir



una serie de eventos que atravesarían las células stem "tumorales" durante el proceso hacia su diferenciación final.

 *for e e f a p .* 

**Anexo**

Durante el período de revisión e impresión de esta tesis, aparecieron en la literatura una serie de trabajos que confirman los datos obtenidos.

- a) El grupo de J. Schlom demostró que los niveles elevados de ras p-21 en cáncer de mama se encuentran asociados a una mayor malignidad, no habiéndose encontrado relación con la presencia de RE (N. Dhuchi y col. *Cancer Research* 46:2511, 1986).
- b) La determinación de N-myc en neuroblastoma por hibridación in situ correlacionó muy bien con la hibridación en filtros (Dot blot). Además, la expresión de este oncogene estuvo asociada a las células más indiferenciadas y al curso de la enfermedad. (E.F. Grady-Leopard y col. *Cancer Research* 46:3196, 1986).
- c) Estudios propios realizados en colaboración con el grupo de E. Medrano demuestran en MCF-7 la presencia de subpoblaciones celulares aisladas a partir de gradientes isopícnicos preformados. La fracción caracterizada como la de células stem sería la de menor contenido de RE. (M. Resnicoff y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987, en prensa).

**Abreviaturas**

- Ac.M: anticuerpo monoclonal  
A.E.: actividad específica  
BSA: albúmina sérica bovina  
c-DNA: DNA complementario  
CEA: antígeno carcinoembrionario  
c-onc: oncogene celular  
DAB: diámino benzidina  
DCC: dextran coated charcoal  
DES: dietil etilbestrol  
DMS: cromosomas dobles diminutos  
E<sub>2</sub>: estradiol  
EGF: factor de crecimiento epidérmico  
EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico  
erbB: oncogene del virus de la eritroblastosis aviaria  
FBS: suero fetal bovino  
FER: fibroblastos de embrión de rata  
GTPasa: guanosina trifosfatasa  
HLA: antígeno mayor de histocompatibilidad  
H.S.R.: zonas de tinción homogénea  
L.T.R.: long terminal repeat (promotor viral)  
MEM: medio esencial mínimo  
myc: oncogene del virus de la mielocitomatosis  
NAF: nafoxidina  
O.D.: densidad óptica  
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PBS: buffer fosfato salino  
PHA: fitohemaglutinina

ras: oncogene del virus de sarcoma murino

RE: receptores estrogénicos

RPg: receptores progestínicos

RSV: virus del sarcoma de Rous

src: oncogene del virus de sarcoma aviaro

SSC: citrato sodio salino

TAM: tamoxifeno

TE: Tris EDTA

TGF: factor de crecimiento transformante

V-onc: oncogene viral

## REFERENCIAS

1. S.K Carter. *Breast Cancer Research and Treatment* 4:43 (1981).
2. L.Foulds. *British Journal of Cancer* 3:345 (1949).
3. J.Forth, V. Kim, K.H.Clifton. *National Cancer Institute, Monography* 2:148 (1960).
4. S.Nowell. *Science* 194:23-28 (1976).
5. G.G.Steel. En:*Growth Kinetics of Tumors*. Oxford:Clarendon Press 5-55 (1977).
6. G.G.Steel. En:*Growth Kinetics of Tumors*. Oxford:Clarendon Press 86-199 (1977).
7. W.A.Robinson, J.E.Kurnick y B.L.Pi Ke. *Blood* 38:500 (1971).
8. F.E.Smith, V.D.Courtenay y M.Y.Gordon. *British Journal of Cancer* 34:476 (1976).
9. C.P.Leblood y H.Cheng. En:A.B.Cairnie, P.K.Lala y D.G.Osmond (Ed. ). *Stem Cells of Renewing Populations*. p7-31, New York Academic Press.
10. C.S.Potten, R.Schofield y L.G.Lajtha. *Biochimica Biophysica Acta* 560:281 (1979).
11. R.Buick. En:*Antineoplastic Agents; The cellular basis of cancer chemo therapy* p1-39 Ed:W.A.Remeis, J.Wiley & Sons.
12. J.E.Till y E.A.McCulloch. *Biochimica Biophysica Acta*. 605:431 (1980).
13. W.J.MacKillop, A.Ciampi, J.E.Till y R.H.Buick. *Journal of the National Cancer Institute* 70:9 (1983).
14. R.N.Buick, M.D.Minden y E.A.McCulloch. *Blood* 54:95 (1979).
15. L.G.Lajtha. *Differentiation* 14:23 (1979).
16. S.K.Lahiri y L.M. Van Putten. *Cell Tissue Kinetics* 5:365 (1972).
17. R.N. Buick y M.N. Pollak. *Cancer Research* 44:4909 (1984).
18. G.G.Steel. En:*Growth Kinetics of Tumors*. Oxford:Clarendon Press, p.217-267 (1977).
19. A.B.Cairnie, L.F.Lamerton y G.G. Steel. *Experimental Cell Research* 39:528 (1965).
20. G.B.Piérce, R.Shikes y L.M.Fink. En:*Foundations of Developmental Biology Series*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.Jersey.
21. J.S.Meyer, B.R.Rao, S.C. Stevens y W.L.White. *Cancer (Phila.)* 40:2290 (1977).
22. J.S.Meyer, V.C.Bauer, S.C. Stevens y col. *Bulletin Cancer* 65:449 (1978).
23. R.M.Sutherland, J.S.Rasey y R.P.Hill. *Cancer Treatment Symposia* 1:49 (1984).
24. S.E.Salmon. En:*Cloning of Human Tumor Stem Cells*. New York, Alan R. Liss (1980).
25. J.Whang, E.Frei, J.H. Tijox y col. *Blood* 22:664 (1963).
26. E.Gandini y S.M. Gartler. *Nature* 224:599 (1969).
27. P.J.Fialkov, R.J.Jacobson y T.Pappayanovpolov. *American Journal of Medicine* 63:125 (1977).
28. R.N.Buick, J.E.Till y E.A.McCulloch. *Lancet* 1:862 (1977).
29. R.N.Buick, M.D.Minden y E.A.McCulloch. *Blood* 54:95 (1979).
30. J.S.Meyer. *Human Pathology* 13:874 (1982).
31. G.G.Steel. En:*Growth Kinetics of Tumors*. Oxford: Clarendon Press 185-216 (1977).
32. J.Dene Kamp. *Cancer Research* 30:393 (1970).
33. Y.Kusawa, J.S.Spratt, W.L.Dunegan y col. *Cancer* 30:594 (1972).
34. R.Silvestrini, O.Sanfilippo y G. Tedesco. *Cancer* 34:1252 (1974).

35. J.S.Meyer, R.W.McDivitt, K.R.Stone y col. *Breast Cancer Research and Treatment*. 4:79 (1984).
36. W.Olszewski, Z.DarzynKiewicz, P.P.Rosen y col. *Cancer (Phil)* 48:985 (1981).
37. A.W.Hamburger y S.E. Salmon. *Science* 197:461 (1977).
38. A.W.Hamburger y S.E. Salmon. *Journal of Clinical Investigation* 60:646 (1977).
39. F.L.Meyskens, B.J. Sohenlen, D.F.Saxe y col. *Stem Cells* 1:61 (1981).
40. R.N.Buick, T.H. Stanisic, S.E.Fry y col.. *Cancer Research* 39:5051 (1979).
41. R.N.Buick, S.E.Fry y S.E.Salmon. *Cancer (Phil)* 45:1238 (1980).
42. J.Berard, J.Da Silva y G. Riou. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 19:65 (1983).
43. J.E.Karp, P.J.Burke, P.L.Saylor y col. *Cancer Research* 44:4197 (1984).
44. E.Silverberg. *American Cancer Society. Cancer Statistics* 28:17 (1978).
45. *Cancer Incidence in five Continents. Volume IV (Waterhouse etal editors). International Agency for Research on Cancer Lyon (1982).*
46. G.T.Beatson. *Lancet* 2:104 (1896).
47. D.Toft y J. Gorski. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 55:1574 (1966).
48. D.P.Edwards, G.C.Chamness y W.L.McGuire. *Biochimica et Biophysica Acta* 560:457 (1979).
49. E.V.Jensen, E.R.De Sombre y P.W. Jungblut. *Endogenous Factors influencing host-tumor balance, Chicago. University of Chicago Press* 68:15 (1967).
50. W.L.McGuire, P.P.Carbone y E.P.Yollmer. *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer. Raven Press, New York (1975).*
51. W.L.McGuire, M.De La Garza y G.C.Chamness. *Cancer Research* 37:637 (1977).
52. E.W.Jensen. *Cancer* 46:2759 (1980).
53. B.R.Rao, W.G.Wiest y V.M.Allen. *Endocrinology* 92:1229 (1973).
54. E.Milgrom, M.Luu Thi, M.Atger y E.E.Bauhen. *Journal of Biological Chemistry* 248:6366 (1973).
55. K.B.Horwitz y W.L.McGuire. *Journal of Biological Chemistry* 253:2223 (1978).
56. S.C.Brooks, D.E.Saunders, A.Singha Kowinta y V.K.Vaitkevicius. *Cancer* 46:2775 (1980).
57. T.L.Dao y T. Nemoto. *Cancer* 46:2779 (1980).
58. G.A.Dagenshein, N. Bloom y E. Tobin. *Cancer* 46:2789 (1980).
59. J.Taylor, I.S.Fentiman y J. Burchell. *En:Cell Biology in Breast Cancer* 347-363 (1980).
60. K.S.McCarty, T.K.Barton, B.F.Fetter y col. *Cancer* 46:2851 (1980).
61. M.E.Stegner, J.Bahnsen y G.Trans. *Journal of Steroid Biochemistry* 19(1A):297 (1983).
62. E.R.Fisher, C.K.Osborne, W.K.McGuire y col. *Breast Cancer Research and Treatment* 1:37 (1981).
63. R.Silvestrini, M.G.Daidone y G.D.Fronzo. *Cancer* 44:665 (1979).
64. R.Silvestrini, M.G.Daidone, A.Bertuzzi y G.D.Fronzo. *En:Clinical Interest of Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer. (Editado por G. Leclerq, S.Toma, R.Paridaens y D.C.Heuson Springer Verlag p 163-168 (1984).*
65. W.L.Donegan y J.L.Skibba. *Cancer Treatment Symposia* 2:107 (1983).
66. E.R.De Sombre y E.V.Jensen. *Cancer* 46:2783 (1980).
67. M.Sluyser. *En:Cell Biology of Breast Cancer (Mc Grath etal Editors) Academic Press* 173-189 (1980).
68. D.T.Kiang, M.King, B.J.Kennedy y col. *Proceedings of A. A. C. R. and A. S. C. O.* 22:43 (1981).
69. J.H.Strathy, C.B.Coulam y T.C.Spelsberg. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 142:372 (1982).

70. S.H.Lee. *American Journal of Clinical Pathology* 70:97 (1978).
71. I.Nenci, M.D.Becatti, A.Pittanelli y G.Lanza. *Journal of Steroid Biochemistry* 7:505 (1976).
72. G.C.Chamness, W.D.Mercer y W.L.McGuire. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 28:792 (1980).
73. W.D.Mercer, D.P.Edwards, G.C.Chamness y W.L.McGuire. *Cancer Research* 41:4644 (1981).
74. S.Raam, E.Memeth, H.Tamura y col. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 18:1 (1982).
75. R.H.Buell y G.Tremblay. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29:1316 (1981).
76. W.J.King, E.R.De Sombre, E.V. Jensen y G.L.Greene. *Cancer Research* 45:293 (1985).
77. R.J.B.King, A.I.Coffer, J.Gilbert y col. *Cancer Research* 45:5728 (1985).
78. M.Lippman, G.Bolan y K.Huff. *Cancer Research* 36:4595 (1976).
79. J.C.Allegria, M.C.Lippman. *Cancer Research* 38:3823 (1978).
80. C.Huggins, Y.Torralba y K.Mainzer. *Journal of Experimental Medicine* 104:525 (1956).
81. A.Haddow, J.M.Warkinson, E.Peterson y P.C.Koller. *British Journal of Medicine* ii:393 (1944)
82. F.Bresciani. *Experimental Cell Research* 38:13 (1965).
83. R.L.Sutherland, R.R.Reddel y M.D.Green. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 19:307 (1983).
84. L.E.Gerschenson, E.A.Conner, J.Yang y M.Andersson. *Life Sciences* 24:1337 (1979).
85. L.Martin. *Nonsteroidal Antiestrogens*. R.L.Sutherland y V.C.Jordan Eds. Sidney Academic Press, (1981).
86. R.R.Weichselbaum, S.Hellman, A.J.Piro y col. *Cancer Research* 38:2339 (1978).
87. K.B.Horwitz, Y.Koseki y W.L.McGuire. *Endocrinology* 103:1742 (1978).
88. M.Lippman, G.Bolan, M.Monaco y col. *Journal of Steroid Biochemistry* 7:1045 (1976).
89. B.Westley y H.Rochefort. *Cell* 20:353 (1980).
90. K.B. Horwitz, W.L.McGuire. *The Journal of Biological Chemistry* 253:8185 (1978).
91. H.Nawer, C.Lalanne y E.E.Baulieu. *Cancer Research* 40:1750 (1982).
92. N.Waseda, Y.Kato, H.Imura y M.Kurata. *Cancer Research* 41:1984 (1981).
93. R.L.Eckest y B.S.Katzenellenbogem. *Cancer Research* 42:139 (1982).
94. C.M.Taylor, B.Blanchard y D.T.Zava. *Cancer Research* 44:1409 (1984).
95. M.A.Miller, M.E.Lippman y B.S.Katzenellenbogem. *Cancer Research* 44:5308 (1984).
96. P.Briand y A.C.Lykkefeldt. *Cancer Research* 44:1114 (1984).
97. G.Klein y E.Klein. *Nature* 315:190 (1985).
98. A.L.Murphree y V.F.Benedict. *Science* 219:973 (1984).
99. A.R.Sandersson y P.C.Beverley. *Immunology Today* 4:2111 (1983).
100. D.Stchelin, H.E.Varmus, J.M.Bishop y P.K.Vogt. *Nature* 260:170 (1976).
101. G.S.Martin. *Nature* 227:1021 (1970).
102. P.K.Vogt. *Virology* 46:939 (1971).
103. J.S.Brugge y R.L.Erikson. *Nature* 269:346 (1977).
104. S.H.Hughes, E.Stubblefield, F.Payvar y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:1348 (1979).
105. D.Sheiness y J.H.Bishop. *Journal of Virology* 31:514 (1979).
106. P.Besmer, H.W.Snyder, J.E.Murphy y col. *Journal of Virology* 46:606 (1983).

107. E. M. Scolnick, E. Rands, D. Williams y W. P. J. Parks. *Journal of Virology* 12:458 (1973).
108. H. D. Opperman, A. Levinson, H. E. Varmus y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:1804 (1979).
109. M. E. Furth, L. E. Davis, B. Fleurdelys y E. M. Scolnick. *Journal of Virology* 43:294 (1982).
110. H. Land, L. F. Parada y R. A. Weinberg. *Science* 222:771 (1983).
111. A. T. Lorincz y S. Reed. *Nature* 307:183 (1984).
112. C. Shih, B. Shilo, M. Goldfarb y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:5714 (1979).
113. C. Shih, L. C. Padhy, M. Murray y R. Weinberg. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 290:261 (1981).
114. T. G. Krontiris y G. M. Cooper. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78:1181 (1981).
115. T. Hunker y J. A. Cooper. *Annual Review of Biochemistry* 54:897 (1985).
116. P. Donner, I. Greiser Wille y K. Moelling. *Nature* 296:262 (1982).
117. T. Y. Shih, A. G. Papageorge, P. E. Stokes y col. *Nature* 287:686 (1980).
118. R. W. Ellis, T. Y. Feo, M. Shih y col. *Nature* 292:506 (1981).
119. J. P. Mcgrath, A. J. Capon, A. V. Goeddel y A. D. Levinson. *Nature* 310:644 (1984).
120. S. Pulciani, E. Santos, A. Lauve y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:2845 (1982).
121. L. F. Shimizu, M. Goldfarb, Y. Suard y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80:2112 (1983).
122. K. Shimizu, M. Goldfarb, M. Perucho, M. Wigler. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80:383 (1983).
123. E. P. Reddy, R. K. Reynold, E. Santos y M. Barbacid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 300:149 (1982).
124. P. H. Seeberg, W. W. Colby, D. J. Capon y col. *Nature* 312:72 (1984).
125. E. Santos, D. Martin Zanca, E. P. Reddy y M. Barbacid. *Nature* 315:382 (1985).
126. S. Pulciani, E. Santos, A. Lauver y col. *Nature* 300:539 (1982).
127. L. A. Feig, R. C. Bast, R. C. Knapp y G. M. Cooper. *Science* 223:698 (1984).
128. J. Fuyita, S. K. Srivastava, M. H. Krauss y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:3849 (1985).
129. A. P. Feinberg, B. Vogelstein, M. J. Droller y col. *Science* 230:1175 (1983).
130. G. S. Payne, J. M. Bishop y H. E. Varmus. *Nature* 295:209 (1982).
131. W. S. Hayward, B. G. Neel y S. M. Astrin. *Nature* 290:475 (1981)
132. K. Alitalo, G. Rasay, J. M. Bishop y col. *Nature* 306:274 (1983).
133. J. Bamern, S. Ruscoi y W. Schaffner. *Cell* 27:299 (1981).
134. I. Hanahan. *Nature* 315:115 (1985).
135. R. Dalla Faverc, F. Wong-Staal y R. C. Gallo. *Nature* 299:61 (1982).
136. M. Schwab K. Alitalo, H. E. Varmus y col. *Nature* 303:497 (1983).
137. M. S. McCoy, J. J. Toole, J. M. Cunningham y col. *Nature* 302:79 (1983).
138. C. D. Little, M. M. Vau, D. N. Carney y col. *Nature* 306:194 (1983).
139. K. Hayashi, T. Kakizoe y T. Sugimura. *Gann* 74:798 (1983).
140. P. G. Pelicci, L. Lanfrancone, M. D. Brathwaite y col. *Science* 224:1117 (1984).
141. D. M. McCarthy, F. V. Rassool, J. M. Goldman y col. *Lancet* 2:1362 (1984).
142. M. Schwab, J. Ellison, M. Busch y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:4040 (1984).
143. W. H. Lee, A. L. Murphree y W. F. Benedict. *Nature* 309:458 (1985).
144. J. E. Filmus y R. N. Buick. *Cancer Research* 45:4468 (1985).
145. R. T. Schimke. *Cancer Research* 44:1735 (1984).
146. R. Dalla Favera, M. Bregni, J. Erikson y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:7824 (1982).



147. R. Dalla Favera, S. Martinotti, R. C. Gallo y col. *Science* 219:963 (1983).
148. R. Watt, K. Mishikawa, J. Sorrentino y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80:6307 (1983).
149. A. Houweling, R. J. Vanden Elsen y A. J. Van der Eb *Journal of Virology* 105:537 (1980).
150. P. Vanden Elsen, S. de Pater, A. Houweling y col. *Gene* 18:175 (1982).
151. H. Land, L. F. Parada y R. A. Weinberg. *Nature* 304:591 (1983).
152. C. Shih y R. A. Weinberg. *Cell* 29:161 (1982).
153. H. E. Ruley. *Nature* 304:602 (1983).
154. L. F. Parada, H. Candi, R. A. Weinberg y col. *Nature* 312:649 (1984).
155. D. Eliyahu, A. Raz, P. Gruss y col. *Nature* 312:646 (1984).
156. M. B. Sporn y A. B. Roberts. *Nature* 313:745 (1985).
157. C. H. Heldin y B. Westermark. *Cell* 37:9 (1984).
158. R. A. Siefert, S. M. Schwartz y D. F. Bowen-Pope. *Nature* 311:669 (1984).
159. A. S. Gpistom, C. Betshaltz, S. Piferfer-Ollsson y col. *Cell* 41:301 (1985).
160. K. Kelly, B. H. Cochran, C. D. Stiles y P. Leder. *Cell* 35:603 (1983).
161. J. Campisi, H. E. Gray, A. B. Pardee y col. *Cell* 36:241 (1984).
162. P. H. Reitsma, P. G. Rotberg, S. M. Astin y col. *Nature*. 306:492 (1983).
163. R. F. Doolittle, M. W. Hunkapiller, L. E. Hood y col. *Science* 221:275 (1983).
164. J. Downward, Y. Yarden, E. Mayea y col. *Nature* 307:521 (1984).
165. J. E. DeLarco y G. J. Todaro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:4001 (1978).
166. M. A. Anzano, A. B. Roberts, J. M. Smith y col. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 80:6264 (1983).
167. A. Gazit, H. Igarashi, I. M. Chiu y col. *Cell* 39:89 (1984).
168. T. A. Liberman, N. Razon, A. D. Bartal y col. *Cancer Research* 44:753 (1984).
169. J. Filmus, M. N. Pollak, J. G. Cairncross y R. N. Buick. *Biochemical and Biophysical Research Comuncations* 131:207 (1985).
170. C. R. King, M. H. Krauss y S. A. Aaronson. *Science* 229:974 (1985).
171. G. T. Merlino, Y. H. Xu, S. Ischii y col. *Science* 224:417 (1984).
172. S. L. Fitzpatrick, J. Brightwell, J. L. Wittliff y col. *Cancer Research* 44: 3448 (1984).
173. M. M. Wrann y C. F. Fox. *Journal of Biological Chemistry* 254:8083 (1979).
174. T. Kawamoto, J. Mendelsohn, A. Le y col. *Journal of Biological Chemistry* 259:7761 (1984).
175. L. B. Nanney, J. A. McKanna, C. M. Stoscheck y col. *Journal of investigative Dermatology* 82:165 (1984).
176. R. W. Crag y A. Bloch. *Cancer Research* 44:442 (1984).
177. J. Filmus y R. N. Buick. *Cancer Research* 45:822 (1984).
178. R. Muller y E. F. Wagner. *Nature* 311:438 (1984).
179. T. J. Gonda y D. Metcalf. *Nature* 310:249 (1984).
180. L. J. VanBogaert y P. Mالدagve. *Human Pathology* 9:175 (1980).
181. H. J. G. Bloom y W. W. Rocjardson. *British Journal of Cancer* 11:359 (1978).
182. L. A. Stornberger. *Immunocytochemistry* Englewood Cliffs. N. J., Prentice Hall, (1974).
183. L. A. Stenberger, P. H. Hardy, J. J. Cuculis y H. G. Meyer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 18:315 (1970).
184. A. I. Bravo, I. Sorin, N. Guman y J. Mordoh. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 4:3 (1985).
185. S. Raam, G. S. Richardson, F. Bradley y col. *Breast Cancer Research and Treatment* 3:179 (1983).
186. R. Silvestrini, M. G. Daidone y G. Di Fronzio. *Cancer* 44:665 (1979).

187. G. Mavligit, P. B. Barcenas, G. U. Gutterman y col. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 150:597 (1975).
188. J. Mordoh, R. Chacon y J. Filmus. *Cancer Research* 41:3621 (1981).
189. W. J. MacKillop y R. N. Buick. *Stem Cells* 1:355 (1982).
190. D. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y E. Randall. *Journal of Biological Chemistry* 193:265 (1951).
191. R. H. Buell y G. Tremblay. *Cancer* 1:1625 (1983).
192. A. G. Fazekas y J. K. McFarlane. *Journal of Steroid Biochemistry* 13:613 (1980).
193. S. Raam, E. Nemeth, H. Tamura, D. S. O'Brien y J. L. Cohen. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 15:1 (1982).
194. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (I. G. Luna Ed.). McGraw-Hill Book Comp (1968).
195. T. Maniatis, E. F. Fritsch y J. Sambrook. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
196. S. Pfeifer Ohlsson, A. S. Goustin, J. Rydnert y col. *Cell* 38:585 (1984).
197. M. Brahic y A. T. Haase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:6125 (1978).
198. A. Rein, M. Rice, S. Simek y col. *Journal of Virology* 43:1055 (1982).
199. E. Hafen, M. Levine, R. L. Garber y W. J. Gehring. *EMBO Journal* 2:617 (1983).
200. M. E. Akam. *EMBO Journal* 2:2075 (1983).
  
201. S. Hayashi, I. C. Gilliam, A. D. Delaney y G. M. Tener. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 26:677 (1978).
202. P. Ward. *Workshop on Non Isotopic Methods for the Analysis of DNA and RNA*. The State University of New Jersey. April (1984).
203. P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes y P. Berg. *Journal of Molecular Biology* 113: 237 (1977).
204. D. Gangli, N. Legros, B. V. Heule y col. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 22:156 (1981).
205. C. De Duve. *The Journal of Cell Biology* 50:200 (1971).
206. R. Hinton y M. Dobrota. *Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular biology; density gradients centrifugation* (T. S. Work y W. Wor Ed) North Holland publishing company (1980).
207. R. L. Sutherland, R. E. Hall y I. W. Taylor. *Cancer Research* 43:3998 (1983).
208. S. Shoshua, T. Lyssiatis, V. M. Godfry y P. J. Schewer. *British Medical Journal* 2 1:777 (1979).
209. R. A. Walker. *Journal of Clinical Pathology* 33:356 (1980).
210. M. Abe y D. N. Kufe. *Breast Cancer Research and Treatment* 4:269 (1984).
211. M. Y. Straus, R. Moran, R. E. Muller y H. H. Wotiz. *Oncology* 39:197 (1982).
212. R. H. Buell y G. Tremblay. *Cancer Research* 45:4278 (1985).
213. W. V. Welshons, M. C. Lieberman y J. Gorski. *Nature* 307:747 (1984).
214. A. G. Fazekas y J. K. Macfarlane. *Journal of Steroid Biochemistry* 13:613 (1980).
215. W. J. MacKillop, J. P. Bizarri y G. K. Ward. *Cancer Research* 45:4360 (1985).
216. M. D. Goldenberg, M. R. Sharkey y F. J. Primus. *Cancer* 42:1546 (1978).
217. M. D. Wahren, E. Lidbruick, D. Wallgren y col. *Cancer* 42:1070 (1978).
218. W. L. McGuire, G. C. Chamnes, M. E. Costlow y R. E. Shepherd. *Metabolism* 23:75 (1974).
219. P. Selby, J. P. Bizzari y R. N. Buick. *Cancer Treatment Reports* 67:659 (1983).
220. B. W. Borjesson y G. A. Sarfaty. *Cancer* 47:1828 (1981).
221. F. Kodama, G. Greene y S. Salmon. *Cancer Research* 45:2720 (1985).
222. E. Huitric, R. Laumonier, P. Burtin y col. *Laboratoy Investigation* 34:97 (1976).

223. J.L. Wittliff, D.G. Gardner, W.L. Battema y P.J. Gilbert. *Biochemical Biophysics Research Communications* 48:119 (1972).
224. D.A. Sirbasku, R.H. Benson, G.H. Sato y R. Ross (Ed). *Hormones and Cell Culture, Book A. Vol. 6 Pag. 477* (1979).
225. C.K. Osborne, K. Hobbs y G.M. Clark. *Cancer Research* 45:584 (1985).
226. T.L. Dao, D.K. Sinha, T. Nemoto y J. Perez. *Cancer Research* 42:359 (1982).
227. P.F. Conte, G. Frascini, A. Alama y col. *Cancer Research* 45:5926 (1985).
228. A.C. Carter, N. Sedransk, R.M. Kelley y col. *Journal of the American Medical Association* 237:2097 (1977).
229. R.L. Eckert y B.S. Katzenellenbogen. *Cancer Research* 42:139 (1982).
230. D.P. Edwards, G.C. Chamness y W.L. McGuire. *Biochimica et Biophysica Acta* 560:457 (1979).
231. K. Sudo, F.J. Monsma y B.S. Katzenellenbogen. *Endocrinology* 112:425 (1983).
232. D.L. Kon. *Journal of Biological Chemistry* 258:3173 (1983).
233. M.A. Miller y B.S. Katzenellenbogen. *Cancer Research* 43:3094 (1983).
234. J.C. Faye, S. Jozan, G. Redevilh y col. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 80:3158 (1983).
235. B.M. Markaverich, R.R. Roberts, M.A. Alejandro y J.H. Clark. *Cancer Research* 44:1575 (1984).
236. C.J. Der, T. Finkel y G.M. Coper. *Cell* 44:167 (1986).
237. D. De Feo, M.A. Gnda, H.A. Young y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78:3328 (1981).
238. P.H. Hand, A. Thor, D. Wunderlich y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:5227 (1984).
239. M.E. De Bortoli, H.A. Bou-Issa, B.E. Haley y Y.S. Cho-Chung *Biochemical and Biophysical Research Communications* 127:699 (1985).
240. J. Iundy, R. Grimson, Y. Mishrisky y M. Viola. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 27:154 (1986).
241. W.L. Donegan y J.L. Skibba. *Cancer Treatment Symposia* 2:107 (1983).
242. L.M. Schiffer, P.G. Braunschweiger, J.J. Stragand y L. Poulakos. *Cancer* 43:1707 (1979).
243. M.V. Viola, F. Fromowitz, S. Oravez u col. *New England Journal of Medicine* 314:133 (1979).
244. F.L. Huang y Y.S. Cho-Chung. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123:141 (1984).
245. A. Kasid, M.E. Lippman, A.G. Papageorge y col. *Science* 228:725 (1985).
246. C.E. Freter, M.E. Lippman, E.P. Gelnaann. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 27: (1986).
247. S. Oshii, G.T. Merlino y E. Pastan. *Science* 236:1378 (1985).
248. S. Green, P. Walter, V. Kumar y col. *Nature* 320:134 (1986).
249. B.M. Sfton, I.S. Trowbridge, J.A. Cooper y E.M. Scolnick. *Cell* 31:465 (1982).
250. B.M. Willumsen, A. Christense, N.L. Hubbert y col. *Nature* 310:583 (1984).
251. B.M. Wilumsen, K. Norris, A.G. Papageorge. *European Molecular Biology Organization Journal* 3:2581 (1984).
252. R.K. Wierenga y W.G. Hol. *Nature* 302:842 (1983).
253. J.P. Coghlan, P. Aldred, J. Haralambidis y col. *Analytical Biochemistry* 149:1 (1985).
254. A.Y. Sakaguchi, B.U. Zabel, K.H. Grzeschik y col. *Molecular and Cellular Biology* 4:989 (1984).
255. J. Gu, I.R. Kirsh, G.F. Hollis y col. *Proceeding of the American Association for Cancer Research* 27:157 (1986).
256. C.B. Thompson, P.B. Challoner, P.E. Neiman y M. Groudine. *Nature* 314:363 (1985).

257. B. Calabretta, L. Kaezmarek, P. M. L. Ming y col. *Cancer Research* 45:6000 (1985).
258. P. Newmark, *Nature* 317:380 (1985).
259. D. J. Slamon y M. J. Cline. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:7141 (1984).
260. R. Makino, K. Hayashi y T. Sugimura. *Nature* 310:664 (1984).
261. R. Makino, K. Hayashi, S. Sato y T. Sugimura. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 119:1092 (1984).
262. G. Riou, M. Barrois, I. Tordjman y col. *C.R. Seances Academy of Sciences* 299:575 (1984).
263. G. E. Gallick, R. Kurzrock, W. S. Kloetzer y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:1795 (1985).
264. S. Yokota, Y. T. Yokota, H. Battifora y col. *Science* 231:261 (1986).
265. D. Kozbor y C. Croce. *Cancer Research* 44:438 (1984).
266. D. J. Slamon, J. B. de Kernion, I. M. Verma y M. J. Cline. *Science* 224:256 (1984).
267. Ch. Escot, Ch. Theillet, R. Lidereav y col. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (en prensa).