

Tesis de Posgrado

Heterogeneidad celular en carcinomas mamarios humanos

Ballaré, Cecilia J.

1997

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ballaré, Cecilia J.. (1997). Heterogeneidad celular en carcinomas mamarios humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2924_Ballare.pdf

Cita tipo Chicago:

Ballaré, Cecilia J.. "Heterogeneidad celular en carcinomas mamarios humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2924_Ballare.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

HETEROGENEIDAD CELULAR EN CARCINOMAS
MAMARIOS HUMANOS

Autora

Cecilia J. Ballaré

Director de Tesis

Dr. José Mordoh

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Orientación: Ciencias Biológicas

- 1997 -

29249

yj2

CELL HETEROGENEITY IN HUMAN BREAST CANCER

The main purposes of this study were: 1) to investigate the cell heterogeneity in human breast cancer and characterize the different cell subpopulations with regard to proliferation and expression of tumor markers; 2) to obtain monoclonal antibodies (MAb) against these tumors which recognize highly undifferentiated (stem) cells, and mediate specific cytotoxicity.

Cell heterogeneity was studied in human tumor samples, proliferation was evaluated by [³H]thymidine incorporation and markers by immunohistochemistry. According to the results, it could be defined a regular sequence of marker expression as cell differentiation proceeds and proliferation decreases. Some markers were identified which are expressed in different stages of the differentiation pathway (NCA90, estrogen receptor, progesterone receptor, TAG72, CaMBr1, CEA). Conversely, the expression of other markers (Ag2.15, PEM) would start in undifferentiated-highly proliferative cells and remain throughout the whole differentiation process.

It was also investigated the properties of MAb FC-2.15 (anti-Ag2.15) generated using an undifferentiated human breast carcinoma as immunogen. Results showed that FC-2.15 exhibits strong human complement-mediated cytotoxicity against Ag2.15⁺ cells. It recognizes a high-density antigen (2.8×10^6 /cell) in the cell membrane and is slowly internalized. The results obtained in this study suggest that FC-2.15 could be a useful agent for passive immunotherapy.

Author: Cecilia J. Ballaré

Doctoral Supervisor: Dr. José Mordoh

HETEROGENEIDAD CELULAR EN CARCINOMAS MAMARIOS HUMANOS

Dos objetivos principales fueron planteados en este trabajo: 1) investigar la heterogeneidad celular en carcinomas mamarios humanos, caracterizando distintas subpoblaciones celulares respecto a proliferación y expresión de diversos marcadores tumorales; 2) obtener anticuerpos monoclonales (AMC) contra estos tumores, con propiedades citotóxicas, que reconozcan células indiferenciadas, de alto potencial proliferativo.

Los estudios de heterogeneidad celular fueron realizados utilizando muestras tumorales humanas, la proliferación evaluada mediante incorporación de [³H]Timidina y marcadores por inmunohistoquímica. Los resultados permitieron establecer una secuencia de expresión de marcadores a medida que progresa la diferenciación celular y disminuye la capacidad proliferativa. Pudieron identificarse marcadores asociados a distintas etapas de la diferenciación (NCA90, receptor estrogénico, receptor de progesterona, TAG72, CaMBr1, CEA) y otros que comienzan a expresarse en células indiferenciadas, altamente proliferativas, y continuarían durante todo el proceso de diferenciación (Ag2.15, PEM)

Se investigaron también las propiedades del AMC FC-2.15 (anti-Ag2.15) desarrollado utilizando como inmunógeno un carcinoma mamario humano indiferenciado. FC-2.15 presentó una potente citotoxicidad contra células Ag2.15⁺ mediando lisis por complemento humano, reconoció un antígeno presente en membrana plasmática en alta densidad ($2,8 \times 10^6$ /célula) y fue lentamente internalizado. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que FC-2.15 podría ser útil en inmunoterapia de pacientes con neoplasias Ag2.15⁺.

Autora: Cecilia J. Ballaré

Director: Dr. José Mordoh

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"

RESUMEN

Varios estudios han demostrado la coexistencia de tipos diversos celulares en los carcinomas mamarios y la diferenciación celular es una de las causas que origina esta heterogeneidad. Distintas subpoblaciones celulares han sido identificadas en estos tumores: a) células "stem", indiferenciadas y con alto potencial proliferativo, con capacidad de auto-renovación y de originar progenie que comienza a diferenciarse; b) células semidiferenciadas y c) células diferenciadas no proliferantes. Existe sin embargo poca información sobre las características de cada subpoblación. Siendo las células stem las responsables del crecimiento y diseminación tumoral, deberían ser el blanco esencial de las terapias antineoplásicas. Resulta entonces de particular importancia la identificación de los distintos tipos celulares y especialmente de las células stem.

En este estudio se investigó la heterogeneidad celular en carcinomas mamarios humanos con el objeto de identificar distintas subpoblaciones celulares y caracterizarlas con respecto a capacidad proliferativa, presencia de receptores hormonales y expresión de diversos marcadores tumorales. Se trabajó también en la selección de anticuerpos monoclonales (AMC) con propiedades antitumorales, que reconozcan antígenos expresados en carcinomas mamarios y especialmente en células indiferenciadas, de alta capacidad proliferativa.

Para los estudios de heterogeneidad celular se utilizaron muestras tumorales de carcinomas mamarios humanos. La capacidad proliferativa se evaluó por incorporación de [³H] timidina seguida de autoradiografía; los receptores hormonales y otros marcadores tumorales asociados a carcinoma mamario humano se determinaron por inmunohistoquímica. Una doble técnica permitió analizar proliferación celular y expresión de marcadores simultáneamente, sobre el mismo corte histológico.

- En primer lugar se analizó la presencia de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RPg) y los resultados obtenidos indicaron que éstos no están presentes en células stem tumorales sino que se expresan durante la diferenciación celular, en células con disminuida capacidad proliferativa. Esto podría explicar el efecto transitorio más que curativo observado frecuentemente con las terapias hormonales antiestrogénicas.

- Para el estudio de los marcadores tumorales se utilizaron AMC previamente descriptos por distintos grupos y otros recientemente desarrollados en nuestro laboratorio. Los resultados permitieron establecer una secuencia de expresión de marcadores a medida que disminuye la capacidad proliferativa y progresa la diferenciación celular. Pudieron identificarse marcadores

de expresión "temprana" (Ag 2.15 y PEM) y otros asociados a etapas avanzadas de la diferenciación (NCA-90 \Rightarrow RE \Rightarrow RPg / TAG-72 / CaMBr1 \Rightarrow CEA).

- Uno de los marcadores, Ag 2.15, presentó características especialmente interesantes. Ag 2.15 (reconocido por el AMC FC-2.15, desarrollado en nuestro laboratorio) se expresó en el 96 % de los tumores y en la gran mayoría de las células independientemente del grado de diferenciación tumoral. Los resultados reportados en este trabajo indicaron que el Ag 2.15 comenzaría a sintetizarse en células indiferenciadas, de alto potencial proliferativo, y su expresión se mantendría a través de todo el proceso de diferenciación. Se decidió entonces trabajar especialmente en la caracterización del AMC FC-2.15, su reactividad y propiedades citotóxicas

FC-2.15 fue desarrollado utilizando como inmunógeno células de un carcinoma mamario humano indiferenciado. En este trabajo se investigó su capacidad de mediar reacciones citotóxicas contra células Ag 2.15⁺ ya sea en forma directa o a través de células efectoras o fijación de complemento. Se utilizaron ensayos de liberación de [⁵¹Cr] y distintos tipos de células blanco. Se estudiaron también sus características de unión al antígeno por técnicas de Scatchard y ensayos de endocitosis. Los resultados demostraron que FC-2.15 presenta una potente actividad citotóxica específica contra células que expresan Ag 2.15 mediando la lisis por complemento humano; reconoce un antígeno expresado en membrana plasmática en alta densidad; presenta una K_a de $6,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y es lentamente internalizado. Los resultados reportados sugieren que FC-2.15 puede ser útil en inmunoterapia pasiva de pacientes con neoplasias Ag 2.15⁺ y podría ser utilizado sin necesidad de conjugarlo con drogas o toxinas.

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

- **Ballaré C**, Bravo A, Laucella S, Sorín I, Cerdeiro R, Loza J, Sousa F, Guman N, Mordoh J.
“DNA synthesis in estrogen receptor-positive human breast cancer takes place preferentially in estrogen receptor negative cells”- *Cancer* 1989; 64: 842 - 848.
- **Ballaré C**, Bravo AI, Sorín I, Guman N, Schiaffi J, Yomha R, Bagnati A, Mordoh J.
“The expression of progesterone receptors coincides with an arrest of DNA synthesis in human breast cancer” - *Cancer* 1991; 67: 1352 - 1358.
- **Ballaré C**, Bravo AI, Turchi V, Nuti M, Yomha R, Schiaffi J, Mordoh J.
“Marker expression and differentiation in human breast cancer” - *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 698: 143 - 148.
- Mordoh J, Leis S, Bravo AI, Podhajcer O, **Ballaré C**, Capurro M, Kairiyama C, Bover L.
“Description of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reactive with human breast cancer and other human neoplasias” - *The International Journal of Biological Markers* 1994; 9: 125 - 134.
- **Ballaré C**, Barrio M, Portela P, Mordoh J.
“Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells” - *Cancer Immunology - Immunotherapy* 1995; 41: 15 - 22.

ÍNDICE

	Página
• INTRODUCCIÓN GENERAL	3
I - Neoplasia: Definición, Clasificaciones	3
I.A.- Clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios	4
I.A.1.- Clasificación según el tipo histológico	4
I.A.2.- Clasificación según el grado tumoral o grado de diferenciación	5
I.B.- Estadificación clínica de los pacientes con carcinoma mamario	6
II - Cáncer: Sistemas Experimentales de Estudio	8
Cultivo de tejidos	8
Biopsias	10
Modelos animales	11
III - Heterogeneidad Celular en los Tumores Malignos	12
La progresión neoplásica como fuente de heterogeneidad	13
La diferenciación celular origina una heterogeneidad adicional	15
Identificación de células stem tumorales	18
IV - Marcadores Tumorales	22
Antígenos oncofetales	23
Marcadores específicos de tejido o de diferenciación	24
Glicoproteínas y glicolípidos de membrana aberrantemente glicosilados	25
Oncogenes	26
Genes supresores de tumor	29
Receptores hormonales	31
V - Receptor Estrogénico y Receptor de Progesterona en Cáncer de Mama	31
VI - Anticuerpos Monoclonales y Cáncer	34
OBJETIVOS	38

• **CAPÍTULO I : Expresión de Receptor Estrogénico y Receptor de Progesterona en Carcinoma de Mama Humano**

INTRODUCCIÓN	41
RESULTADOS	42
1.- Análisis de la expresión de RE y RPg en carcinomas de mama humanos	42
2.- Análisis de las subpoblaciones celulares RE ⁺ y RPg ⁺	44
3.- Estabilidad del RE y el RPg	46
4.- Análisis de la expresión de RE y RPg en células en proliferación	49
DISCUSIÓN	55

• **CAPÍTULO II : Expresión de Marcadores Tumorales y Diferenciación Celular en Carcinoma de Mama Humano**

INTRODUCCIÓN	59
RESULTADOS	65
1.- Expresión de marcadores tumorales en cáncer de mama. Asociación con el grado de diferenciación tumoral	65
2.- Expresión de marcadores y proliferación celular	67
3.- Coexpresión de marcadores tumorales	72
DISCUSIÓN	73

• **CAPÍTULO III : Propiedades Funcionales del AMC FC-2.15**

INTRODUCCIÓN	77
RESULTADOS	78
1.- Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) FC-2.15 dependiente	78
2.- Aislamiento y análisis de células MCF-7 resistentes a CMC FC-2.15-dependiente	83

3.- Citotoxicidad celular anticuerpo - dependiente (ADCC)	83
4.- Análisis de la unión FC-2.15 - Ag 2.15 en células MCF-7	85
5.- Internalización del complejo FC-2.15 - Ag 2.15	86
a) Ensayos de inmunofluorescencia	86
b) Radioinmunoensayo celular	86
DISCUSIÓN	90
• CONCLUSIONES	93
• MATERIALES Y MÉTODOS	96
Parte 1: Determinación de proliferación celular, receptores hormonales y otros marcadores tumorales en carcinomas mamarios humanos	96
1. 1.- Obtención de las muestras tumorales	96
1. 1. a.-- Selección de pacientes	96
1. 1. b.- Procesamiento de las muestras tumorales	96
1. 2.- Estimación de la proliferación celular	97
1. 3.- Evaluación de la expresión de RE y RPg	98
1. 3. a.- Anticuerpos	98
1. 3. b.- Determinación de RE y RPg por inmunohistoquímica	98
1. 4.- Evaluación de la expresión de marcadores tumorales	99
1. 4. a.- Anticuerpos	99
1. 4. b.- Detección de marcadores por inmunohistoquímica	99
1. 5.- Coexpresión de RPg y otros marcadores tumorales	100
1.6.- Evaluación simultánea de proliferación celular y expresión de receptores hormonales u otros marcadores tumorales	101
Parte 2 : AMC FC-2.15: Propiedades Funcionales	102
2. 1.- Células	102
2. 1. a.- Líneas celulares	102

2. 1. b.- Células obtenidas a partir de tumores primarios	102
2. 1. c.- Leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares humanos	103
2. 1. d.- Células de leucemia mieloide crónica (CML)	103
2. 2.- Anticuerpos utilizados	103
2. 3.- Complemento humano	104
2. 4.- Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) anticuerpo-dependiente	104
2. 5.- Aislamiento de células MCF-7 resistentes a CMC FC-2.15-dependiente	104
2. 6.- Ensayos de citometría de flujo	105
2. 7.- Citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (ADCC)	105
2. 8.- Iodinación del AMC FC-2.15	105
2. 9.- Análisis de Scatchard	106
2. 10.- Ensayos de endocitosis del AMC FC-2.15	106
2. 10. a.- Análisis de inmunofluorescencia	106
2. 10. b.- Radioinmunoensayo celular	107
• REFERENCIAS	109
• ABREVIATURAS	126
• AGRADECIMIENTOS	128

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

El carcinoma mamario es el tipo de cáncer más común entre las mujeres y, luego del pulmonar, es el que presenta el mayor índice de mortalidad [Lippman M.E. 1993; Marshall E. 1993]. A pesar de los importantes avances realizados en los últimos años en la detección y tratamiento del carcinoma de mama localizado, poco se ha progresado en el manejo terapéutico de la enfermedad cuando ésta es detectada en estadios avanzados. Los mecanismos básicos involucrados en la iniciación y desarrollo del cáncer de mama humano y su progresión maligna, son hasta el momento pobremente comprendidos.

Diversos factores de riesgo fueron identificados, incluyendo: historia menstrual y reproductiva (menarca a edad temprana, menopausia tardía, edad avanzada al nacimiento del primer hijo), historia familiar de carcinoma mamario, dieta, tratamientos hormonales, exposición a radiación, etc. Mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* han sido asociadas a susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama. Sin embargo, aproximadamente un 70 % de las mujeres que desarrollan esta enfermedad no poseen factores de riesgo identificables [Harris J.R. 1993; Kelsey J.L. 1996].

Por otra parte, existe una gran diversidad en el comportamiento de los carcinomas mamarios, observándose patrones de evolución muy diferentes. Muchos cánceres humanos presentan una evolución más uniforme; en el caso del carcinoma de pulmón de células pequeñas por ejemplo, sin quimioterapia aproximadamente un 70 % de los pacientes con enfermedad en estadio I mueren en un año y menos del 10 % sobreviven luego de dos años [Smith H.S. 1984]. Contrariamente, el carcinoma de mama se comporta en forma más variable; mientras que ciertos tumores alcanzan un gran tamaño en la mama sin invasión vascular ni linfática, en otros casos aparecen metástasis a distancia antes que se produzca un importante crecimiento del tumor primario. Más aún, si bien en algunos pacientes las metástasis aparecen y progresan rápidamente, en otros lo hacen luego de 10 a 30 años. La determinación del estadio clínico de los pacientes según la extensión de la enfermedad, el análisis histopatológico de los tumores, así como la detección de receptores de estrógeno y de progesterona en el tumor, constituyen indicadores pronósticos tradicionales y representan uno de los métodos más confiables disponibles hasta el momento para predecir la evolución de la enfermedad. Sin embargo, es

frecuentemente observado que pacientes correspondientes a un mismo estadio clínico, con igual diagnóstico histopatológico y contenido de receptores hormonales, evolucionan en forma diferente. Es por esto que grandes esfuerzos en la investigación en cáncer mamario están destinados a la búsqueda de nuevos indicadores que permitan predecir con mayor certeza la marcha de la enfermedad y en lo posible provean información a cerca de la capacidad del tumor de responder a determinadas terapias antineoplásicas.

Existe actualmente una gran variedad de drogas para el tratamiento del cáncer mamario, incluyendo agentes citotóxicos, hormonales, modificadores de la respuesta biológica, etc. La clínica oncológica cuenta con una amplia gama de tratamientos disponibles: distintos esquemas quimioterapéuticos, diversas modalidades de hormonoterapia, así como regímenes que contienen combinaciones de agentes que pueden actuar sinérgicamente sobre las células tumorales. No obstante, a pesar de esta creciente complejidad en las terapias del cáncer mamario, la sobrevida de las pacientes con enfermedad metastásica no ha mejorado consistentemente en las últimas décadas [Marshall E. 1993]

En base a este conjunto de evidencias, resulta clara la necesidad de alcanzar un mayor conocimiento de la biología del cáncer de mama y desarrollar nuevos enfoques terapéuticos. Este trabajo de Tesis intenta ser un aporte al respecto, y se ha centrado en dos objetivos principales:

- **En primer lugar, lograr una mejor comprensión de la heterogeneidad celular característica de los carcinomas mamarios y sus implicancias.**
- **Segundo, seleccionar anticuerpos monoclonales con propiedades antitumorales, que reconozcan antígenos expresados en carcinomas de mama humanos y presenten potencial utilidad terapéutica.**

A continuación, y previo al desarrollo del trabajo experimental, se presentan algunos aspectos teóricos relevantes y antecedentes que han servido de base a este trabajo de Tesis.

- En las **secciones I y II** de esta Introducción se definen **conceptos básicos** empleados en este estudio, se presentan los sistemas corrientes de clasificación de neoplasias, especialmente de carcinomas mamarios (sección I) y los distintos modelos experimentales de trabajo utilizados en la investigación en cáncer (sección II).

- La **sección III** resulta de fundamental importancia ya que plantea el problema de la **heterogeneidad celular en los tumores malignos**, tema sobre el que se centra este trabajo de Tesis. Se resume aquí el estado actual de conocimientos al respecto, los orígenes y posibles implicancias de esta diversidad celular.
- A continuación en la **sección IV** se introduce el concepto de **marcadores tumorales**, se describen ejemplos especialmente relevantes en carcinomas mamarios, su importancia biológica y clínica. Varios de estos marcadores serán utilizados en este estudio para caracterizar las distintas subpoblaciones celulares que coexisten en los tumores.
- La **sección V** aborda el tema de la **regulación hormonal** en el crecimiento de los carcinomas mamarios, y el estudio de los receptores de estrógeno y de progesterona.
- Por último, la **sección VI**, señala el enorme impacto que han tenido los **anticuerpos monoclonales** en el estudio del cáncer y sus posibles aplicaciones clínicas.

I - NEOPLASIA: DEFINICIÓN, CLASIFICACIONES

Múltiples evidencias indican que el cáncer es una enfermedad de origen genético que resulta de la acumulación de cambios heredables en una célula somática. Estos cambios originan: 1) la pérdida del control de la división celular, llevando a una proliferación descontrolada y 2) la capacidad de invadir tejidos adyacentes y colonizar otros órganos [Klein G 1985; Vogelstein 1993; Hoskins K. 1994; Fearon E.R. 1990].

Es evidente que el crecimiento y renovación de los tejidos de un organismo está homeostáticamente controlado. Los diversos tipos celulares ya diferenciados deben mantenerse en cantidad y posiciones relativas correctas. Cuando una célula pierde el control de la proliferación se originará un **tumor** o **neoplasia**. Sin embargo, esto no necesariamente constituye un cáncer. De acuerdo a su comportamiento los tumores pueden ser clasificados en “**benignos**” o “**malignos**”:

- Si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una única masa tumoral en su lugar de origen, sin invadir tejidos adyacentes, se dice que el tumor es **benigno**. Estos tumores son generalmente de crecimiento lento, pudiendo alcanzar volúmenes muy grandes. El tejido normal circundante está siempre bien demarcado. Comúnmente puede obtenerse una completa cura por remoción quirúrgica del tumor.

• Un tumor es considerado **maligno** o **canceroso** cuando sus células tienen la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y migrar hacia otros órganos. La invasividad usualmente implica la liberación de células a partir del tumor primario con capacidad de alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos, entrar en el torrente circulatorio, extravasarse en sitios distantes del organismo, implantarse y proliferar en el nuevo ambiente formando un tumor secundario o **metástasis**. Al multiplicarse las células metastásicas destruyen la arquitectura normal de los tejidos que invaden, alterando la fisiología del órgano blanco.

Las neoplasias malignas se clasifican según el tejido y tipo celular del cual se originan:

- cuando surgen a partir del tejido epitelial son llamadas **carcinomas**. Estos representan más del 90 % de los cánceres humanos, siendo los más frecuentes los carcinomas de pulmón, mama y colon
- aquellas neoplasias de origen mesenquimático (hueso, músculo, vasos sanguíneos, fibroblastos) se denominan **sarcomas**
- **leucemias** y **linfomas** corresponden a neoplasias derivadas de células hematopoyéticas
- existen por otra parte **tumores originados en tejido nervioso**

Cada una de estas amplias categorías tiene a su vez múltiples divisiones de acuerdo al tipo celular específico, la localización en el organismo y la estructura del tumor.

I.A.- Clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios :

I.A.1.- Clasificación según el tipo histológico :

Existen distintos sistemas de clasificación en uso, de los cuales el de Bogaert y Maldague es uno de los más ampliamente adoptados [van Bogaert L.J. 1978; Azzopardi J.G. 1979]. De acuerdo a éste los carcinomas mamarios se dividen en dos grandes categorías: **ductales** y **lobulillares**, según se desarrollen en los conductos mamarios o en los lobulillos (estructuras histológica- y citológicamente identificables en la mama) respectivamente. Cada uno de estos grupos puede a su vez subdividirse en carcinoma *in situ* e **infiltrante** según sus propiedades invasivas. Básicamente, existen entonces cuatro categorías:

a) Carcinoma ductal *in situ* o intraductal:

Las células tumorales se encuentran sólo dentro del lumen de los conductos y no invaden

el estroma circundante. El carcinoma *in situ* constituye sólo una etapa temprana en la progresión de la enfermedad a cáncer invasivo, en la que las células malignas aún no han perdido su control posicional.

b) Carcinoma ductal infiltrante:

En este caso las células tumorales de origen ductal invaden el estroma.

- Aquellos carcinomas ductales invasivos en los que no se reconocen rasgos histológicos especiales son designados *NOS (not otherwise specified)* y representan casi el 70 % de los cánceres mamarios. En general este tipo de tumores metastatizan a ganglios linfáticos axilares y son, dentro de los carcinomas ductales, los de peor pronóstico.

- Se han descrito además una gran variedad de tipos histológicos: *medular, mucinoso o coloidal, comedocarcinoma infiltrante, tubular, papilar, escamoso, adenoquístico, secretorio, carcinosarcoma*, etc. Estos difieren en sus características de invasividad, patrón de crecimiento y metástasis, grado de infiltración linfocitaria, formación de túbulos (estructuras semejantes a los conductos), características de la matriz extracelular, pronóstico, etc.

c) Carcinoma lobulillar *in situ* :

Las células tumorales se encuentran confinadas dentro de los lobulillos mamarios y no invaden el estroma. Al igual que el carcinoma intraductal, éste constituye un estadio temprano en la evolución de la enfermedad.

d) Carcinoma lobulillar infiltrante:

Representa entre 5 y 10 % de los carcinomas mamarios. Típicamente está compuesto por células pequeñas que invaden en un arreglo lineal (“fila india”) con una tendencia a crecer alrededor de los conductos y lobulillos.

I.A.2.- Clasificación según el grado tumoral o grado de diferenciación :

La determinación del tipo histológico de un tumor no siempre brinda la información suficiente para predecir el curso clínico de la enfermedad o decidir sobre la terapia adecuada. En general un mismo tipo histológico comprende un rango extremadamente amplio de patologías, desde aquellas con bajo índice proliferativo que raramente dan

metástasis, hasta otras de crecimiento rápido, con alta capacidad metastásica y muy difícilmente curables. La clasificación en “grados” intenta determinar el grado de malignidad independientemente del tipo celular, y está basada en la evaluación de distintos parámetros que varían ligeramente de acuerdo al sistema de clasificación utilizado. Uno de los más ampliamente aceptados es el de Bloom y Richardson [Bloom H.J.G. 1957] y es el que se empleó para la clasificación de los tumores utilizados en este estudio. Numerosos trabajos han demostrado el importante valor pronóstico del grado tumoral [Bloom H.J.G. 1957; Stenkvis B. 1982; Alderson M.R. 1971; Carter C.L. 1989].

Básicamente los parámetros tenidos en cuenta en esta clasificación son:

- 1) grado de diferenciación estructural, determinado por la formación tubular,
- 2) cantidad de mitosis,
- 3) pleomorfismo nuclear (tamaño, forma y tinción de los núcleos).

De acuerdo al análisis de estos items los tumores son clasificados en tres grados:

- grado I : bien diferenciados, bajo grado de malignidad
- grado II : moderadamente diferenciados, grado de malignidad intermedio
- grado III : pobremente diferenciados o indiferenciados, alto grado de malignidad

1.B.- Estadificación clínica de los pacientes con carcinoma mamario :

La determinación del estadio clínico de los pacientes según la extensión de la enfermedad provee las bases para la elección del tratamiento y es útil como indicador pronóstico. El estadio es establecido inicialmente sobre una base clínica, de acuerdo al examen físico del paciente y la evaluación de los análisis radiológicos y de laboratorio.

El sistema de estadificación más ampliamente usado es el adoptado por la *American Joint Commission on Cancer Staging (A.J.C.C.)* y la Unión Internacional contra el Cáncer (U.I.C.C., Ginebra). El mismo está basado en el sistema TNM (*Tumor - Nodes - Metastases classification*), que evalúa: el tamaño del tumor primario (T), la presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M), como se observa en la tabla 1. De acuerdo a estos parámetros se determina el estadio clínico del paciente según se muestra en la tabla 2. En muchos casos es

necesario realizar una reclasificación postquirúrgica, ya que el estudio histopatológico de la muestra permite determinar con mayor certeza los parámetros evaluados.

Tabla 1: Clasificación TNM

T	<p>T₀ = Sin evidencia de tumor primario</p> <p>T₁ = Tumor de hasta 2 cm</p> <p>T₂ = Tumor entre 2 y 5 cm</p> <p>T₃ = Tumor mayor a 5 cm</p> <p>T₄ = Cualquier tamaño tumoral, invade piel o parrilla costal</p>
N	<p>N₀ = Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales</p> <p>N₁ = Metástasis en ganglios axilares</p> <p>N₂ = Conglomerado metastásico en ganglios axilares</p> <p>N₃ = Metástasis en ganglios linfáticos en cadena mamaria interna.</p>
M	<p>M₀ = No hay evidencia de metástasis distales</p> <p>M₁ = Metástasis distales</p>

T: tumor primario; N: ganglios linfáticos regionales; M: metástasis a distancia

Tabla 2: Determinación del Estadío Clínico

Estadío Clínico	TNM
I	T ₁ N ₀ M ₀
II a	T ₁ N ₁ M ₀ ó T ₂ N ₀ M ₀
II b	T ₂ N ₁ M ₀ ó T ₃ N ₀ M ₀
III a	T _{1/2/3} N ₂ M ₀ ó T ₃ N ₁ M ₀
III b	T ₄ N.. M ₀
IV	T.. N.. M ₁

T.. ó N.. = cualquier T o N

II - CÁNCER: SISTEMAS EXPERIMENTALES DE ESTUDIO

Si bien los múltiples proyectos de investigación en cáncer tienen por objetivo final lograr una mayor comprensión de la biología de los tumores humanos y en última instancia su curación, las posibilidades de experimentación directa en pacientes son, por razones éticas, obviamente muy limitadas. Por lo tanto, diversos sistemas experimentales han sido desarrollados como modelo para el estudio del cáncer en el laboratorio. El empleo de **animales portadores de tumores** autólogos o xenotrasplantados con tumores humanos es de gran utilidad como sistema *in vivo* para investigación tanto básica como aplicada en cáncer. Sin embargo, en muchos casos es necesario contar con modelos simplificados para realizar estudios a nivel tisular, celular, subcelular o molecular. Para esto resultan útiles tanto las muestras tumorales provenientes de **biopsias**, como los sistemas de **cultivo de tejidos**, ya sean cultivos primarios de corta duración o líneas celulares obtenidas a partir de células cancerosas.

Cultivo de tejidos :

La mayoría de las células animales y vegetales pueden proliferar y aún diferenciarse en placas de cultivo de tejidos. Para esto es necesario un preciso ajuste de las condiciones de cultivo (agregado de nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, sustrato para la adhesión celular, control del pH y temperatura) adecuado a los requerimientos de las células que se deseen crecer. El comportamiento de las células neoplásicas puede ser estudiado mediante la utilización de cultivos celulares. Se puede así ensayar el efecto del agregado o remoción de moléculas específicas al cultivo (como hormonas o factores de crecimiento), evaluar la acción citotóxica de diversos tratamientos antitumorales (drogas quimioterapéuticas, tratamientos hormonales, anticuerpos), estudiar la expresión de antígenos asociados a tumor mediante técnicas inmunológicas, etc.

Los cultivos celulares pueden prepararse directamente a partir de tejido tumoral obtenido de biopsias (cultivos primarios). En estos casos es necesario degradar la matriz extracelular y disociar las células del tejido, generalmente mediante el empleo de enzimas proteolíticas, para lograr una suspensión de células aisladas. A partir de esta suspensión, varias técnicas pueden utilizarse para separar los distintos tipos celulares presentes en el tejido, ya sea en base a sus propiedades diferenciales (por centrifugación, adherencia a plástico o vidrio, etc.) o mediante el empleo de anticuerpos específicos. Si bien el trabajo

con cultivos primarios es complejo y son cultivos de corta duración, para ciertos estudios resultan interesantes ya que reflejan bastante fielmente las características de las células tal cual fueron obtenidas del tumor.

En muchos casos las células de los cultivos primarios pueden removerse de las placas de cultivo y re-plaquearse formando entonces cultivos secundarios. Este procedimiento puede repetirse por semanas o meses. La mayoría de las células son capaces de proliferar en cultivo un número limitado de generaciones y luego mueren. Ocasionalmente algunas pocas sufren cambios genéticos que les permiten atravesar el período de crisis, adquiriendo la capacidad de multiplicarse indefinidamente. Estas células “inmortalizadas” constituyen una línea celular continua. Si bien el establecimiento de líneas celulares a partir de tejidos normales es posible, resulta bastante más probable partiendo de células provenientes de tumores malignos. La adquisición del fenotipo canceroso permite una más fácil adaptación al crecimiento indefinido en cultivo.

Las líneas celulares son extremadamente útiles como fuente constante de células bien caracterizadas y de un tipo relativamente uniforme. Mas aún, dichas células pueden congelarse en nitrógeno líquido por un período indefinido y conservar su viabilidad. Por otra parte permiten realizar experimentos usando medios de crecimiento bien definidos y así poder medir las respuestas celulares a diversos factores externos. Sin embargo, es importante tener en cuenta cuando se trabaja con líneas celulares que estas células casi siempre difieren en forma importante de sus progenitoras en los tejidos de los cuales derivan. La mayoría de las veces sufren cambios a través de los sucesivos pasajes, mostrando incluso alteraciones en el número de cromosomas (aneuploidía). De manera que, aunque representa una gran ventaja el poder estudiar el comportamiento complejo de las células en las condiciones estrictamente definidas de una placa de cultivo, las observaciones y conclusiones deben en última instancia verificarse a través de experimentos *in vivo*.

Líneas celulares de cáncer de mama: Diversas líneas celulares de carcinoma mamario humano han sido establecidas. La línea celular MCF-7 utilizada en este trabajo de Tesis deriva de un derrame pleural de una paciente con cáncer de mama [Soule H.D. 1973], expresa receptores de estrógeno y progesterona y representa un buen modelo *in vitro* para el estudio de los tumores de mama hormono-dependientes. El análisis de ésta y otras

líneas celulares positivas para receptores hormonales ha aportado información valiosa a cerca de los mecanismos de acción de las hormonas sobre las células tumorales, las proteínas inducidas por las mismas, y los mecanismos de acción de anti-hormonas [Sutherland R.L. 1983, 1988; Thompson E.W. 1988; Savoldi G. 1995; Masiakowski P. 1982; Musgrove E.A. 1991; Watts C.K. 1994; Gudas J.M. 1995]. Existe sin embargo bastante menos información sobre los mecanismos que rigen el crecimiento de las células de carcinoma mamario receptores hormonales negativas. En nuestro laboratorio se ha establecido recientemente una nueva línea celular hormono-independiente, IIB-BR-G, a partir de células obtenidas por disgregación de un carcinoma primario de mama [Bover L. 1991]. Dicha línea celular se utiliza también en este estudio.

Biopsias:

El estudio de biopsias tumorales obtenidas quirúrgicamente tiene la ventaja de reflejar fielmente las características del tumor tal cual se presenta en el paciente. En primer lugar, el análisis de la biopsia permite su clasificación anatomopatológica; esto aporta información sobre el origen de la neoplasia, su grado de agresividad y pronóstico. Ofrece además la posibilidad de investigar, sobre cortes histológicos de las muestras tumorales, la expresión de diversas moléculas (antígenos asociados a tumor, receptores celulares, productos de oncogenes, etc.), habiéndose desarrollado para esto distintas técnicas como la inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, hibridación *in situ* y más recientemente PCR (*polymerase chain reaction*) *in situ*. Las biopsias conservadas en condiciones apropiadas proveen también abundante material para la obtención de proteínas y ácidos nucleicos para estudios a nivel molecular.

Por otra parte, es posible realizar cultivos cortos, de pocas horas, utilizando biopsias tumorales. Para esto, las muestras inmediatamente obtenidas se dividen en fragmentos de tejido muy pequeños y se incuban en medio de cultivo apropiado. Pueden adicionarse distintos agregados al medio y evaluar entonces características y respuestas celulares. El agregado de [³H]-Timidina ([³H] dT) por ejemplo, permite marcar las células proliferantes. Posteriormente éstas pueden detectarse por autoradiografía sobre cortes histológicos realizados a partir de los fragmentos incubados y cuantificarse bajo microscopio [Ver sección III de esta Introducción: Identificación de células stem]. Pueden incluso agregarse

diversos compuestos al cultivo (hormonas, anti-hormonas, drogas) y evaluar el índice de proliferación celular en presencia de los distintos agregados.

Modelos animales :

Los **animales portadores de tumores** son ampliamente utilizados en el estudio del cáncer; ya sean con tumores autólogos (espontáneos o inducidos artificialmente) o tumores humanos transplantados (xenotransplantes). El uso de xenotransplantes con tumores humanos es especialmente útil en evaluaciones pre-clínicas de nuevos tratamientos, como la aplicación de drogas quimioterapéuticas, empleo de anticuerpos monoclonales sólo o conjugados con radioisótopos, drogas o toxinas, etc.

Para la realización de estos transplantes se requiere que el sistema inmune del animal esté deprimido o sea de alguna manera anulado. Se usa entonces corrientemente una cepa mutante de ratones carentes de timo, inmunodeficientes, denominados ratones atímicos o "nude mice". Debido a esta deficiencia inmunológica estos animales pueden aceptar xenotransplantes de distintos tejidos, incluyendo tumores humanos [Shin S.I. 1979]. Para la obtención del tumor en el ratón pueden realizarse injertos subcutáneos de pequeños fragmentos tumorales provenientes de biopsias, o bien inocularse células tumorales de cultivos. Una vez desarrollado el tumor, éste puede re-transplantarse de ratón en ratón por tiempo indefinido. Sin embargo es importante tener en cuenta que cuando el tumor es pasado de animal en animal por muchas generaciones sucesivas, sus propiedades pueden modificarse. Generalmente a través de los pasajes ocurre una selección de células con mayor capacidad proliferativa.

Otra técnica en uso es el ensayo de la cápsula subrenal, en la cual se transplantan pequeños fragmentos tumorales heterólogos en ratones que pueden ser o no inmunodeficientes. Esta técnica permite solamente ensayos a corto plazo pues deben realizarse dentro de los primeros 5 a 7 días de transplantado el tumor, antes que se produzca el rechazo del mismo. Se utiliza especialmente para la determinación de la respuesta a quimioterapia de tumores humanos [Griffin T.W. 1983].

Por otra parte, gracias a los importantes avances tecnológicos de los últimos años, es posible introducir genes en forma permanente en ratones, inyectando el ADN en óvulos fertilizados. Estos a menudo desarrollarán en un ratón conteniendo el fragmento de ADN

con el gen de interés integrado en alguno de sus cromosomas. Si el cromosoma modificado está presente en las células de la línea germinal, este animal pasará el gen extraño a la progenie. Animales que han incorporado de esta forma permanentemente el ADN son denominados **transgénicos** y el gen extraño, **transgen** [Palmiter R.D. 1986; Boyd A.L. 1993]. Estos ratones transgénicos han resultado de enorme utilidad para el estudio de la función y regulación de diversos genes.

Varias cepas de ratones transgénicos han sido generadas llevando genes implicados en el desarrollo y/o evolución del cáncer, llamados en general oncogenes [ver sección III]. Los transgenes pueden expresarse en todos los tejidos o diferencialmente en ciertos tejidos de interés, según la especificidad del promotor bajo el cual hayan sido colocados. Esta metodología permite estudiar la participación de distintos oncogenes en el proceso de carcinogénesis. Más aún, por cruzamientos entre cepas transgénicas para distintos oncogenes ha podido obtenerse progenie llevando ambos simultáneamente, lo que permite analizar la acción sinérgica de distintos oncogenes para el desarrollo de una neoplasia [Adams J.M. 1991; Fanidi A. 1992; Hunter T. 1991].

III - HETEROGENEIDAD CELULAR EN LOS TUMORES MALIGNOS

Varias líneas de evidencias sugieren que las células que componen un tumor maligno constituyen un clon, descendiente de una única célula que ha sufrido algún cambio heredable tal que ha perdido el control de la proliferación [Fialkow P.J. 1976; Fearon E.R. 1987; Groffen J. 1984]. Sin embargo, pese al origen monoclonal de la mayoría de los cánceres, existe abundante bibliografía demostrando una gran heterogeneidad entre las células que constituyen los tumores sólidos al momento del diagnóstico clínico.

En los carcinomas mamarios por ejemplo, numerosos trabajos reportaron la coexistencia de subpoblaciones celulares que difieren en sus propiedades. Esta diversidad celular ha podido observarse cuando se analizaron muestras obtenidas a partir de tumores humanos con respecto a distintos parámetros, tales como: expresión de antígenos tumorales, capacidad proliferativa, presencia de receptores hormonales, sensibilidad a distintos tratamientos, ploidía, rearrreglos cromosómicos, mutaciones que activan o inactivan genes específicos (ver más adelante oncogenes y genes supresores de tumor), etc. [Meyer J.S. 1991; Podhajcer O.L. 1986; Szollosi J. 1995; Teixeira M.R. 1995; Pavelic Z.P. 1992; Fujii

H. 1996 (1); Chen L.C. 1992; Ro J. 1990]. Esta heterogeneidad celular intratumoral es en gran medida responsable de los fracasos en las terapias antineoplásicas.

En la presente sección se discutirán las distintas causas que pueden dar origen a la diversidad celular en los tumores y sus implicancias.

La progresión neoplásica como fuente de heterogeneidad

Distintas observaciones han demostrado que una única mutación no es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno, sino que la transformación neoplásica es un proceso con múltiples etapas e involucra una acumulación de diversos cambios secuenciales [Nowell P.C. 1976; Vogelstein B. 1993; Fearon E.R. 1990; Hoskins K. 1994]. Si bien una primera célula sufriría alguna mutación somática que le confiera una ventaja en el crecimiento iniciándose así la transformación, la progenie de ésta debe experimentar posteriores cambios –probablemente varias mutaciones adicionales– para que se desarrolle un cáncer. Este proceso de **progresión tumoral** suele tomar varios años.

Experimentalmente ha podido identificarse una primera etapa en la progresión (etapa de iniciación), irreversible, en la que las células adquieren la capacidad de crecer indefinidamente en cultivo pero aún no son tumorigénicas, es decir no producen tumores al ser inyectadas en ratones atímicos [Giovanella B. 1985]. La capacidad tumorigénica es adquirida posteriormente, en etapas más avanzadas de la progresión neoplásica.

Durante la progresión tumoral, diversas mutaciones, anormalidades cromosómicas y aún cambios epigenéticos ocurren, evidenciándose una tendencia de la población neoplásica a incrementar su capacidad proliferativa y lograr una mayor independencia de los mecanismos que regulan la proliferación celular [Vogelstein B. 1993; Solomon E. 1991; Fujii H. 1996 (2)]. Estos cambios permiten a su vez que las células malignas puedan adquirir la capacidad de invadir el tejido adyacente y metastatizar. [Fidler I.J. 1982; Frixen U.H. 1991; Takeichi M. 1993]. Se ha reportado muchas veces que las células cancerosas se caracterizan por una elevada inestabilidad genómica, es decir que presentan tasas de mutación varios órdenes de magnitud superiores a las células normales. Esto es especialmente evidente en cuanto a la frecuencia de grandes rearrreglos cromosómicos como amplificaciones y translocaciones [Tlsty T.D. 1989; Wright J.A. 1990]. Los mecanismos subyacentes a esta inestabilidad genética están recién comenzando a comprenderse. Distintos trabajos han demostrado que mutaciones en el gen p53 tendrían

un rol central en este proceso [Hartwell L. 1992; Livingstone L.R. 1992; Yin Y. 1992]. Sin embargo, existen evidencias de que éste no sería el único mecanismo involucrado [Fishel R. 1996; Kahlenberg M.S. 1996].

Los múltiples avances en la comprensión de la biología del cáncer han demostrado claramente que el desarrollo y progresión de un tumor están estrechamente ligados a alteraciones en los mecanismos moleculares que controlan el ciclo de división celular. Por lo tanto, numerosas investigaciones en los últimos años se han dirigido al estudio de los genes regulatorios involucrados en el control de la proliferación. Dichos genes han sido clasificados en términos generales en dos grandes grupos: aquellos cuya expresión ayuda a estimular un incremento en el número de células y aquellos cuyo producto contribuye a disminuirlo. Correspondientemente, hay dos caminos mutacionales posibles hacia la pérdida del control de la proliferación celular e invasividad característicos del cáncer:

- Transformar un gen estimulador en hiperactivo. Este tipo de mutación tiene en general un efecto dominante y el gen alterado es llamado **oncogen** (siendo el alelo normal un proto-oncogen).
- Inactivar un gen inhibitorio. Estas mutaciones usualmente tienen un efecto recesivo, es decir que ambas copias génicas en la célula deben ser inactivadas o delecionadas para liberar a la célula de la inhibición. Este tipo de genes son llamados –aunque el término no resulte ideal– **genes supresores de tumor**.

Durante las distintas etapas de la progresión tumoral ocurren diversas mutaciones que activan oncogenes específicos e inactivan genes supresores de tumor. En los últimos años se han realizado enormes progresos en la identificación de estos genes y su rol en la carcinogénesis [Bishop J.M. 1991; Hunter T. 1993; Hinds P.W. 1994; Weinberg R.A. 1994; Cox L.A. 1994; Fearon E.R. 1990].

Debido a que estos cambios sucesivos ocurren en forma paulatina y no en todas las células simultáneamente, es evidente que la progresión neoplásica traerá como consecuencia una gran heterogeneidad celular en el tumor. De esta forma, aún cuando el origen de la neoplasia sea monoclonal, diversos clones celulares nuevos pueden surgir durante este proceso [Teixeira M.R. 1996]. Sin embargo, como se verá a continuación, ésta no es la única fuente de heterogeneidad tumoral.

La diferenciación celular origina una heterogeneidad adicional

La mayoría de los tumores surgen en tejidos en los que la renovación celular es permanente. En estos tejidos las células funcionales, diferenciadas, normalmente se van perdiendo y son reemplazadas por la proliferación de células más primitivas. Algunos ejemplos de tejidos basados en la renovación celular han sido muy bien descritos, como médula ósea, epidermis, mucosa intestinal o epitelio seminífero. Sin embargo, aunque en ciertos casos la renovación no resulte tan evidente, todos los epitelios mantienen su estado estacionario en esta forma, si bien sus tasas proliferativas difieren ampliamente entre ellos dependiendo de las pérdidas celulares [Potten C.J. 1979].

Estos tejidos contienen células primitivas, indiferenciadas, denominadas células “stem”¹ o troncales, que se dividen dando origen a células similares a sí mismas y células que comienzan un proceso de diferenciación. Es decir que las células stem tienen capacidad de auto-renovación, manteniendo así constante su propia población, y capacidad de originar una progenie de células que alcanzarán la diferenciación funcional, compensando las pérdidas fisiológicas [Buick R.N. 1984 (1), (2)]. La producción de una gran familia de células descendientes, diferenciadas, es un proceso denominado “expansión clonal” que decrece con la edad, siendo muy baja en los adultos.

De esta forma se establece en la población celular total una jerarquía donde las células presentan propiedades que van cambiando gradualmente en forma unidireccional (Figura 1). Así, a medida que las células avanzan en esta jerarquía irán perdiendo progresivamente la capacidad proliferativa y adquiriendo características de diferenciación asociadas con la función específica del tejido [Buick R.N. 1984 (1), (2)]. Por lo tanto, en tejidos normales en renovación pueden distinguirse tres categorías celulares principales:

- 1- células stem, con el máximo potencial proliferativo, indiferenciadas, con capacidad de auto-renovarse y de dar origen a toda la descendencia celular;
- 2- células transicionales en vías de diferenciación, con capacidad proliferativa limitada dependiendo de su posición relativa en la jerarquía;
- 3- células diferenciadas o terminales no proliferantes.

¹ el término célula “stem” (progenitora, madre), si bien es de origen inglés, está tan incorporado a la terminología científica actual que será utilizado sin traducción en este trabajo.

Estas dos últimas subpoblaciones predominan en número ampliamente respecto de las células stem. En estos tejidos el estado estacionario es mantenido por un balance estrictamente controlado entre proliferación, diferenciación, muerte y renovación celular a partir de células stem.

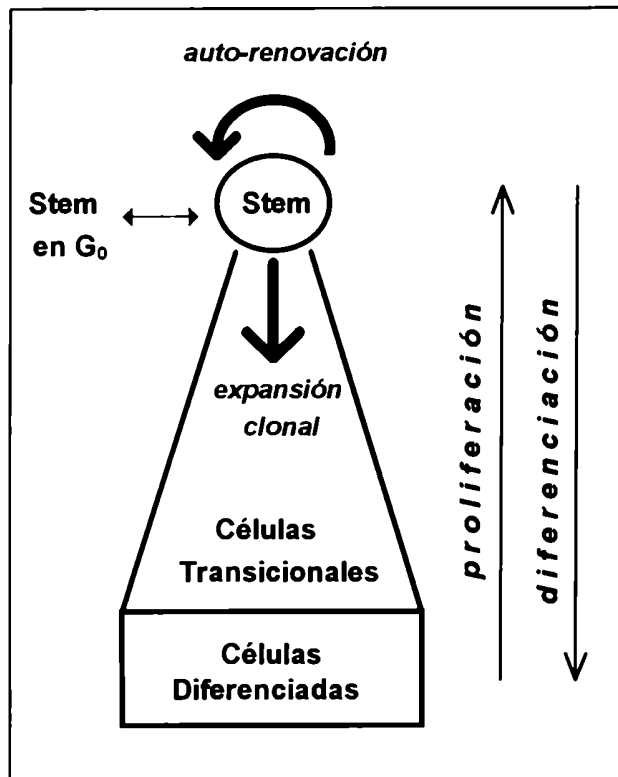


Fig. 1: Representación esquemática de la jerarquía celular en tejidos en renovación.

Las células stem pueden encontrarse en activa división o en reposo (G_0). En estado proliferativo pueden originar células semejantes a sí mismas (auto-renovación) o células que comienzan un proceso de diferenciación (expansión clonal). La diferenciación celular está acompañada por una disminución de la capacidad proliferativa [Gráfico tomado de Buick R.N. 1984 (2)]

Distintas evidencias señalan que en los tumores malignos esta jerarquía celular continúa funcionando y que las neoplasias se originarían a partir de un evento carcinogénico a nivel de las células stem del tejido [Mackillop W.J. 1983; Buick R.N. 1984(1), (2)]. Este evento alteraría los controles naturales que rigen los mecanismos por los cuales una célula stem opta por auto-renovarse o entrar en proceso de diferenciación. El incremento de la población celular podría ocurrir por exceso de proliferación, bloqueo de la diferenciación celular, inadecuada remoción de células por el proceso normal de pérdida celular, o un desbalance entre los eventos de auto-renovación y expansión clonal en la población de células stem. La capacidad de la neoplasia de organizar una estructura diferenciada que remede el tejido del cual se originó dependerá entonces del tipo y grado de alteración producido en las células stem.

Numerosas evidencias, que tomadas en conjunto apoyan este modelo, fueron recopiladas y discutidas en los trabajos de Buick, Mackillop y Selby [Buick R.N. 1984 (2); Mackillop W.J. 1983; Selby P. 1983]. Fundamentalmente, estas se basan en que:

- Existe en los tumores humanos diferenciación celular específica de tejido y en muchos casos es la base para el diagnóstico histopatológico. Es decir que un tumor de mama por ejemplo, o una metástasis de éste, puede ser identificado como tal ya que remeda al tejido mamario normal e incluso expresa marcadores específicos del tejido de origen.
 - Diversos trabajos han demostrado que dentro de cada tipo histológico tumoral, existe una relación inversa entre el grado de diferenciación tumoral y el índice proliferativo. Tumores indiferenciados poseen el mayor potencial proliferativo y más alto grado de malignidad.
 - Con el desarrollo de técnicas como la incorporación de [³H] dT seguida de autoradiografía o el ensayo clonogénico², pudo demostrarse que solamente una pequeña fracción de las células de un tumor posee capacidad proliferativa. En los ensayos clonogénicos por ejemplo, el número de colonias obtenidas a partir de suspensiones unicelulares de tumores humanos, tanto epiteliales como hematopoyéticos, se encuentra generalmente en el rango de 0.001 % y 1 % del total de las células plaqueadas.
 - La experiencia clínica con radioterapia es también consistente con la hipótesis que sólo unas pocas células tumorales se encuentran en proliferación y por lo tanto basta la destrucción de una pequeña proporción de células para evitar la regeneración del tumor.
 - Suspensiones celulares obtenidas a partir de tumores humanos fueron separadas de acuerdo a su tamaño y densidad, demostrándose que la actividad proliferativa, capacidad clonogénica, capacidad de auto-renovación y ciertas características de diferenciación, no son homogéneas en la población de células totales de un tumor, sino que existen diversas subpoblaciones celulares con diferentes propiedades.
- Al respecto, trabajos previos de nuestro laboratorio realizados sobre muestras de carcinomas primarios de mama humanos y células MCF-7 permitieron el aislamiento de distintos tipos celulares que difieren en su índice de proliferación y expresión de marcadores tumorales [Podhajcer O.L. 1986; Resnicoff M. 1987]. En dichos trabajos

². Ver más adelante en esta misma sección: Identificación de células stem tumorales

fue posible identificar células con características correspondientes a las tres subpoblaciones: stem, transicionales y diferenciadas.

Podemos concluir entonces que las células de un tumor serán heterogéneas en cuanto a potencial proliferativo y características de diferenciación celular, con propiedades que irán variando gradualmente a medida que la célula se mueve en la jerarquía. Es decir que este mecanismo de renovación celular y diferenciación representa una importante fuente de heterogeneidad celular en los tumores, que se suma al previamente descrito fenómeno de progresión tumoral.

El concepto que las células tumorales son heterogéneas con respecto a su potencial proliferativo y que existe una subpoblación de células stem con capacidad de proliferación ilimitada que puede originar todas las restantes subpoblaciones, tiene importantes implicancias en el tratamiento del cáncer. Siendo las células stem las responsables del crecimiento tumoral, deberían ser el blanco esencial de las terapias antineoplásicas para lograr la erradicación del tumor. Resulta entonces de particular relevancia la identificación y caracterización de las distintas subpoblaciones celulares y especialmente de la población stem. Es importante investigar por ejemplo, si los antígenos utilizados corrientemente para la producción de anticuerpos monoclonales y su subsecuente aplicación terapéutica, son expresados en las células stem. En el caso del cáncer mamario es también relevante determinar si los receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RPg) están presentes en estas células, ya que, como se verá más adelante, la hormonoterapia acuaría primariamente sobre células que expresan estos receptores. **En este sentido, el principal objetivo de esta Tesis ha sido investigar la expresión de diversos antígenos tumorales y receptores hormonales en carcinomas mamarios humanos, con la idea de identificar distintas subpoblaciones celulares y caracterizar los diferentes estadios en el proceso de diferenciación celular.**

Identificación de células stem tumorales

La identificación de células stem puede hacerse por distintos métodos, cada uno de los cuales tiene sus ventajas y limitaciones. Estos se basan fundamentalmente en determinar proliferación celular. Las técnicas tradicionalmente empleadas han sido: el índice de marcación con [^3H] dT y el ensayo clonogénico.

- **Índice de marcación con [³H] dT :**

Esta técnica detecta células que sintetizan ADN, es decir que se encuentran en fase S del ciclo celular. Para esto se utiliza [³H] dT, ya sea administrada *in vivo* en animales portadores de tumor, o *in vitro* en cultivos cortos de pequeños fragmentos de tejido tumoral o suspensiones celulares. Debido a que la timidina se incorpora en el ADN de las células en replicación, el número de células marcadas corresponderá a aquellas que sintetizan ADN en el tiempo de exposición. Las partículas β emitidas por decaimiento del tritio pueden ser usadas para impresionar una emulsión fotográfica, realizándose entonces una autoradiografía sobre cortes histológicos de la muestra o extendidos celulares. De esta manera puede calcularse el índice de marcación con [³H] dT o TLI (thymidine labeling index) como el porcentaje de células marcadas sobre el total de células.

Se ha demostrado que el TLI representa un dato biológicamente significativo en pacientes con cáncer puesto que correlaciona con el curso de la enfermedad, siendo elevado en tumores de rápido crecimiento y alta agresividad. Su valor como marcador pronóstico es reconocido en diferentes tipos de tumores humanos. [Durie B.G.M. 1980; Costa A. 1981; Silvestrini R. 1987; Amadori D. 1993; Pietra N. 1996]. En carcinomas mamarios, la importancia del TLI como indicador pronóstico independiente ha sido especialmente bien documentada [Meyer J.S. 1988, Saez R.A. 1989; Silvestrini 1990, 1993(1), 1995].

Cabe mencionar sin embargo que, si bien esta técnica permite la identificación de células stem, la población de células proliferantes detectada no superpone exactamente con la población stem, puesto que: 1) algunas células que han iniciado el proceso de diferenciación pueden todavía ser capaces de proliferar y entonces incorporar [³H] dT y 2) una porción de células stem probablemente esté en reposo (estadio G₀) y por lo tanto no sea detectada

- **Ensayo clonogénico :**

En este ensayo las células stem son identificadas por su capacidad de formar colonias en cultivo. Básicamente, el método consiste en crecer una suspensión de células obtenidas por disgregación de un tumor o a partir de derrames pleurales o líquido ascítico, en una doble capa de agar semi-sólido. Puede entonces cuantificarse el porcentaje de células formadoras de colonias, es decir la “eficiencia clonogénica”.

La técnica fue reportada originalmente en un trabajo de Hamburger y Salmon, donde se observó que sólo una fracción reducida de la población celular de un tumor posee capacidad clonogénica. Así por ejemplo, la eficiencia clonogénica de células de líquido ascítico de carcinoma de ovario osciló entre 0,02 y 0,16 %. Valores igualmente bajos fueron obtenidos para células provenientes de melanoma, neuroblastoma, carcinoma de pulmón, mieloma, etc. [Hamburger A.W. 1977]. En estudios posteriores fueron testeados tumores de diversos orígenes y, si bien la cinética de crecimiento y eficacia de plaqueo varió entre ellos, los resultados confirmaron que solamente un porcentaje muy pequeño de células de un tumor puede originar su propia descendencia produciendo una colonia.

El ensayo clonogénico ha sido utilizado con la idea de poder predecir la respuesta de tumores humanos a agentes quimioterapéuticos. Asumiendo que las células stem son responsables del crecimiento tumoral, y que existe una equivalencia entre células clonogénicas y stem, Salmon y col. adaptaron este método para testear la sensibilidad a drogas de células tumorales humanas [Salmon S.E. 1978]. Distintos estudios mostraron una concordancia entre la respuesta a drogas de las células clonogénicas en el cultivo y del tumor *in vivo* en el paciente [Alonso K. 1984; Von Hoff D.D. 1981, 1983]. Actualmente este tipo de ensayo es ampliamente utilizado para estudiar el efecto de nuevas drogas, o nuevas combinaciones, sobre el crecimiento de las células tumorales. Para esto se utilizan células obtenidas a partir de biopsias o, muy comunmente, líneas celulares [Fritzer M. 1996; Liebmann J.E. 1994; Lidor Y.J. 1993].

Sin embargo, al igual que el TLI, también el ensayo clonogénico tiene sus limitaciones. Este último selecciona células en base a su potencial proliferativo en cultivo, por lo tanto el procedimiento tampoco garantiza la identificación de la totalidad de las células stem. En la jerarquía es altamente probable que existan células con elevado potencial proliferativo, que puedan originar una progenie en cultivo, pero que ya no tengan capacidad de auto-renovación [Buick R.N. 1981]. Al mismo tiempo células stem arrestadas en G_0 podrían no entrar en ciclo y no formar colonias.

Distintos trabajos demostraron la existencia de una buena correlación entre ambos métodos, **incorporación de [^3H] dT y capacidad clonogénica** [Mackillop W.J. 1983 (2)]. En un trabajo de Mackillop y col., células obtenidas de ascitis de pacientes con

carcinomas de ovario fueron fraccionadas mediante un gradiente de densidad, obteniéndose subpoblaciones con distintas propiedades. El análisis de estas fracciones reveló que la misma subpoblación contenía, tanto la totalidad de las células con capacidad clonogénica, como las que incorporaban [³H] dT [Mackillop W.J. 1982].

En forma semejante en nuestro laboratorio se aislaron seis subpoblaciones celulares de distinta densidad a partir de células de carcinoma mamario MCF-7. Éstas resultaron diferentes en diversos aspectos: TLI, velocidad de crecimiento, capacidad de generar en cultivo las otras subpoblaciones celulares, eficiencia clonogénica y expresión de distintos marcadores tumorales. Una de estas subpoblaciones (fracción E), conteniendo menos del 5 % de las células totales, presentó el más alto TLI, la mayor capacidad clonogénica y la más alta velocidad de crecimiento, sugiriendo así que podría contener a las células stem. Cuando las distintas subpoblaciones celulares fueron crecidas en cultivo, esta fracción E (y ninguna de las demás) pudo generar todas las otras subpoblaciones; mientras que ninguna de las restantes fracciones pudo generar a la subpoblación E. [Resnicoff M. 1987; Podhajcer O.L. 1988]. Estos resultados demuestran que: 1) existe una buena correlación entre TLI y capacidad clonogénica, y 2) si bien ambos métodos tienen limitaciones, permiten una buena identificación de las células stem.

- En los últimos años nuevas técnicas de mayor simplicidad fueron desarrolladas para identificar células en proliferación, como por ejemplo:

Marcación con 5-Bromodeoxiuridina (BrdU):

BrdU es un análogo de la timidina que, al igual que ésta, se incorpora al ADN de las células en proliferación durante la fase S del ciclo celular. Tiene la ventaja de poder ser detectado por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-BrdU, resultando entonces más sencillo para determinaciones de rutina [Meyer J.S. 1993].

Anticuerpo Monoclonal (AMC) Ki-67:

Este AMC reacciona con una proteína nuclear expresada por células proliferantes en las distintas fases del ciclo celular: G₁, G₂, S, y M. Células quiescentes (G₀) no son detectadas. Al igual que la marcación con BrdU puede revelarse por inmunohistoquímica, con la ventaja adicional de no requerir una incubación previa del tejido fresco antes del ensayo [Crispino S. 1989; Burguer P.C.1986].

AMC anti-PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”):

PCNA es una proteína asociada con la ADN polimerasa que es expresada en el núcleo de células que sintetizan ADN activamente. Por lo tanto, mediante AMC anti-PCNA es posible detectar por inmunohistoquímica células en fase G₁ tardía y fase S del ciclo celular [Galand P. 1995; Cher M.L. 1995; Connolly K.M. 1993].

Determinación de células en fase S por citometría de flujo:

Mediante técnicas de citometría de flujo puede evaluarse la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, y cuantificarse así la fracción de células en fase S. Pueden analizarse tanto muestras tumorales frescas, congeladas, o embebidas en parafina, lo que permite la realización de estudios retrospectivos [Herman C.J. 1992; Dressler L.G. 1988; Saez R.A. 1989].

En general, una buena correlación ha sido demostrada entre estos métodos, y a cada uno de ellos se le ha atribuido significado pronóstico [Kamel O.W. 1989; He W. 1994; Dressler L.G. 1993; Einspahr J. 1995; Cher M.L. 1995; Iatropoulos M.J. 1996]. Esto no resulta sorprendente, dado que todos ellos reflejan esencialmente el mismo proceso biológico.

IV - MARCADORES TUMORALES

Como hemos discutido la sección anterior, numerosas alteraciones ocurren en las células tumorales durante la progresión neoplásica, originando la expresión anormal de diversos genes. Esto se manifiesta tanto por la aparición de productos mutados, como por la desregulación de la expresión de genes normales, expresión de genes en etapas del desarrollo inadecuadas, etc. Las células cancerosas presentarán entonces moléculas normalmente ausentes, o existentes en bajas concentraciones, en células normales. La identificación de estos productos puede resultar de gran valor en la clínica oncológica ya que representan “marcadores tumorales”.

Los “marcadores tumorales” son moléculas de muy diversas clases, presentes en el tejido tumoral o en fluidos corporales de pacientes con cáncer, cuya detección resulta de utilidad para establecer o precisar el diagnóstico, como indicador pronóstico de la evolución de la enfermedad, o para orientar o monitorear terapias.

Esta definición incluye entonces una gran cantidad de moléculas “asociadas al tumor”, ya sean propias de un tipo de tumor o de un estadio particular, o indicadoras de ciertas características como agresividad, potencial metastásico, sensibilidad o resistencia a determinados tratamientos, etc. Estas moléculas pueden estar presentes en la membrana de células tumorales, intracelularmente, en matriz extracelular, o ser liberadas a sangre u otros fluidos corporales. Debido a la distinta naturaleza química y localización de los marcadores tumorales, las técnicas de detección serán también muy diversas, incluyendo métodos bioquímicos, inmunológicos, histoquímicos, moleculares, etc.

Una gran proporción de estas moléculas han sido identificadas mediante el uso de técnicas inmunológicas. En muchos casos fueron detectadas a través de anticuerpos xenogéneos, es decir producidos en otras especies animales, luego de la inmunización con células de un tumor. De ahí que estos marcadores sean frecuentemente llamados “**antígenos tumorales**”, a pesar de que en la gran mayoría de los casos no despiertan una respuesta inmune específica en el paciente.

Siendo los marcadores tumorales moléculas de naturaleza tan heterogénea, resulta difícil establecer una clasificación estricta de los mismos. Sin embargo, no es el objetivo presentar aquí una revisión de los múltiples marcadores tumorales, sino más bien describir ciertos grupos de particular relevancia, especialmente en carcinomas mamarios, y ejemplificar como estos pueden contribuir en el diagnóstico, pronóstico y/o terapia del cáncer.

• **Antígenos oncofetales** :

Se han denominado así a moléculas que normalmente se expresan en determinados tejidos durante el desarrollo fetal, dejan de expresarse -o lo hacen en cantidades mínimas- en tejidos del adulto, y son re-expresadas en células cancerosas. Dado que estos marcadores son moléculas normales en estadios fetales, no resultan inmunogénicas cuando reaparecen en el tumor.

El “**antígeno carcinoembrionario**” (CEA) fue de los primeros en describirse [Gold P. 1965 (1), (2)]. Se expresa normalmente durante los dos primeros trimestres de gestación en mucosa del tracto gastrointestinal y es re-expresado en diversos carcinomas (gastrointestinales, mama, pulmón, etc.) [Thompson J.A. 1991; Robbins P.F. 1993]. CEA es una glicoproteína presente en membrana plasmática, que también se libera al fluido

extracelular, siendo habitualmente detectada en suero de pacientes con carcinomas. Actualmente representa uno de los marcadores tumorales de mayor importancia clínica:

- Dado que la concentración de CEA en suero correlaciona con el estadio de la enfermedad y particularmente con la masa tumoral, es ampliamente utilizado como marcador para diagnóstico y seguimiento de los pacientes con cáncer [Wagener C. 1981; Go V.L.W. 1982; Seregni E. 1992; Bravo A.I. 1985].

- AMC anti-CEA son utilizados exitosamente para radioinmunolocalización de tumores que expresan CEA (CEA⁺) [Hertel A. 1990; Goldenberg D.M. 1990].

- Recientemente se han comenzado a desarrollar métodos de detección de micrometástasis en médula ósea y nódulos linfáticos de pacientes con carcinoma gastrointestinal o mamario, basados en la identificación de células CEA⁺ mediante la amplificación del ARNm-CEA por RT-PCR (“reverse transcriptase-polymerase chain reaction”) [Gerhard M. 1994; Mori M. 1995].

Una descripción más detallada de la estructura molecular y función del CEA se presenta en la Introducción del Capítulo II de esta Tesis.

• **Marcadores específicos de tejido o de diferenciación:**

Son moléculas que se expresan comúnmente en un determinado tejido, en cierto estadio de la diferenciación celular normal. Las células tumorales suelen presentar marcadores de diferenciación propios del tejido del cual se originan. Siendo estas moléculas normales para el organismo, evidentemente no inducirán respuesta inmunológica al ser expresadas en los tumores.

Estos marcadores, si bien no son específicos de tumor, resultan de suma importancia para establecer o precisar diagnósticos. Corrientemente, el examen de una muestra tumoral por el patólogo se basa en el análisis macro- y microscópico de rasgos arquitecturales, histológicos y citológicos. Esto en muchos casos permite concluir un diagnóstico certero. Sin embargo, con frecuencia la escasés o complejidad de la muestra hacen que este análisis no sea suficiente para permitir una precisa determinación del origen de la neoplasia. En estos casos resulta particularmente útil el estudio de marcadores específicos de tejido. Numerosos AMC han sido desarrollados contra distintos marcadores, y estos en general son evaluados por técnicas de inmunohistoquímica o citometría de flujo.

Estos estudios son especialmente útiles en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas, para establecer el linaje celular y estadio específico. También se utilizan habitualmente para determinar el origen de una metástasis en casos donde el tumor primario no ha sido identificado, o para detectar micrometástasis en ganglios linfáticos o médula ósea. En algunos tumores indiferenciados de origen incierto, es necesario utilizar una batería de AMC contra marcadores específicos de tejido [Batifora H. 1988]. Un ejemplo de este tipo de marcadores, ampliamente utilizado en la detección de metástasis ocultas en médula ósea, son las citoqueratinas, características de células de origen epitelial [Ellis G. 1989; Schlimok G. 1990; Azumi N. 1987].

• **Glicoproteínas y glicolípidos de membrana aberrantemente glicosilados:**

Diversas alteraciones en la glicosilación de glicoproteínas y glicolípidos ocurren frecuentemente en las células cancerosas, causando la aparición de moléculas anormales en la superficie celular [Hakomori S. 1985; Kim Y.S. 1992, 1990; Ho S.B. 1991]. Puesto que los glicoconjugados presentes en la membrana plasmática están involucrados en múltiples fenómenos de reconocimiento celular, adhesión célula-célula, etc., estos cambios estructurales en los carbohidratos pueden afectar importantes propiedades de la superficie celular, y estarían estrechamente relacionados con el proceso de invasión de tejidos y comportamiento metastásico [Hakomori S. 1985; Taki T. 1996; Imai K. 1996]. Como consecuencia de esta glicosilación aberrante pueden producirse cambios conformacionales en las moléculas y exponerse nuevos epitopes, normalmente ocultos o ausentes en la estructura normal. Por lo tanto estos glicoconjugados modificados pueden servir como marcadores tumorales.

Un grupo particularmente importante dentro de este tipo de marcadores son las **mucinas**. Las mucinas son proteínas de elevado PM (> 200.000) altamente glicosiladas, presentes en membrana o secretadas, sintetizadas por una variedad de tejidos epiteliales. En los epitelios normales su localización está restringida a la superficie apical de células secretoras. Varias mucinas se encuentran también expresadas abundantemente en cánceres de origen epitelial. En las células tumorales las mucinas suelen presentar alteraciones en el patrón de glicosilación, lo que provoca la exposición de regiones crípticas de la porción proteica de la molécula [Ho J.J. 1994; Verma M. 1994; Kim Y.S. 1992; Ho S.B. 1991].

Un ejemplo muy estudiado es la mucina codificada por el gen *MUC1*, expresada y secretada en diversos epitelios normales. Esta mucina, denominada MUC1 o muy frecuentemente “mucina epitelial polimórfica” (PEM), es una glicoproteína integral de membrana cuya porción extra-citoplasmática contiene un número variable de repeticiones “*en tandem*” de una secuencia de 20 aminoácidos. En algunos carcinomas, como el carcinoma mamario, PEM se encuentra sobre-expresada y glicosilada en forma anormal (incompletamente glicosilada), lo que determina que ciertas secuencias de la unidad repetitiva, normalmente enmascaradas, queden expuestas y resulten particularmente antigénicas [Gendler S.J. 1990; Brockhausen I. 1995; Patton S. 1995; Girling A. 1989].

Varios AMC producidos contra carcinomas mamarios humanos reconocen determinantes antigénicos de PEM y en especial un epítopo de 3 a 5 aminoácidos dentro de la secuencia hidrofílica “P D T R P A P” contenida en la unidad repetitiva [Briggs S. 1993; Burchell J. 1989; Nuti M. 1992]. Puesto que estos AMC no reconocen células de epitelios normales donde PEM es expresada correctamente, resultan de utilidad clínica para establecer diagnósticos, radiolocalizar tumores y focos metastásicos, y potencialmente para inmunoterapias [Sivolapenko G.B. 1995; Verma M. 1994; Peterson J.A. 1995].

Por otra parte, anticuerpos específicos anti-PEM han sido detectados en el suero de pacientes con carcinoma mamario, pancreático y de colon [Rughetti A. 1993]. Esto sugiere que PEM puede ser reconocida como antigénica por el propio sistema inmune humano y abre la posibilidad de inducir la inmunidad contra células tumorales que expresan PEM (PEM⁺) mediante vacunas con PEM o péptidos derivados. En un trabajo reciente se ensayaron en ratones vacunas preparadas con péptidos sintéticos derivados de la región repetitiva de PEM, de distinta longitud y secuencia. Los resultados mostraron que: 1) fue posible inducir alto título de anticuerpos específicos hacia ciertos péptidos, 2) estos anticuerpos reconocieron células tumorales PEM⁺, y 3) lo más interesante, los ratones inmunizados adquirieron protección a un posterior desafío con células tumorales PEM⁺ [Zhang S. 1996]. Investigaciones posteriores deberán determinar si es posible aumentar la inmunidad contra PEM en pacientes por tratamientos con vacunas tumorales. Algunos ensayos clínicos ya han sido iniciados [Zhang S. 1996, Finn O. 1995].

Puesto que PEM es uno de los marcadores analizados en este trabajo de Tesis, en la Introducción del Capítulo II se presentan algunos detalles de su estructura molecular y su posible función biológica.

• **Oncogenes :**

Los proto-oncogenes codifican para proteínas que actúan normalmente como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales, reguladores transcripcionales y reguladores de funciones nucleares. Este sistema integrado juega un rol fundamental en el control de la proliferación celular. Distintas alteraciones en estos genes pueden conducir a su activación, transformándolos en oncogenes. Los oncogenes pueden codificar para proteínas cuya expresión en las células tumorales sea sólo cuantitativamente diferente a las células normales (por amplificación genética o sobre-expresión), o para productos cualitativamente diferentes (por mutaciones en la secuencia codificante). En ambos casos la identificación de estos oncogenes o sus productos resulta importante, ya que pueden servir como marcadores tumorales de valor pronóstico, diagnóstico, y aún terapéutico.

Uno de los oncogenes más frecuentemente alterados en cáncer y por lo tanto más investigados como marcador tumoral es *erbB-2*, también llamado *HER-2/neu*. Este gen codifica para un receptor transmembrana de 185 kDa con actividad de tirosina kinasa, altamente homólogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [Bargmann C.I. 1986; Yamamoto T. 1986]. *erbB-2* es un miembro de una familia de genes relacionados que incluye además a *erbB-1* (gen del EGFR), *erbB-3* y *erbB-4*; los cuatro genes son generalmente co-expresados en distintas combinaciones, en diversos tejidos humanos. Una variedad de péptidos ligandos con capacidad de estimular al receptor *erbB-2* han sido descritos, llamados en conjunto neuregulinas (NRGs); todos ellos surgirían a partir de un único gen, por *splicing* alternativo. Distintos estudios mostraron que estos no se unen directamente a *erbB-2*, sino que *erbB-3* y *erbB-4* actúan como coreceptores: las NRGs se unen a *erbB-3* y *erbB-4* y la heterodimerización de los receptores permite la activación de *erbB-2* [Hynes N.E 1994 (revisión)]. Se ha demostrado que las NRGs pueden inducir crecimiento y diferenciación en células epiteliales, gliales y musculares, y cumplen roles esenciales durante el desarrollo embrionario [Meyer D. 1995].

Distintos mecanismos pueden llevar a la activación de *erbB-2* transformándolo en oncogénico, básicamente: 1) sobre-expresión de la proteína normal, ya sea por amplificación genética y/o alteraciones en la transcripción y 2) mutaciones puntuales en el dominio transmembrana [Hynes N.E 1994]. *erbB-2* se encuentra amplificado y/o sobre-

expresado en diversos cánceres humanos, principalmente carcinomas de mama, ovario, gástrico y de pulmón [Hung M-C. 1995; Hynes N.E 1994]. Esta observación ha impulsado importantes áreas de investigación, tratando de determinar su rol en la progresión neoplásica, utilidad como marcador pronóstico y/o predictivo de respuestas a terapias y su potencial uso como un blanco terapéutico.

Numerosos estudios clínicos han reportado que *erbB-2* está amplificado/sobre-expresado en aproximadamente un 30 % de los carcinomas mamarios, y que los elevados niveles de expresión de *erbB-2* correlacionan con pobre pronóstico (medido como supervivencia total e intervalo libre de enfermedad). Entre los pacientes con metástasis en ganglios linfáticos regionales esta correlación positiva ha sido demostrada [Slamon D.J. 1987, 1989; Wright C. 1989; Gusterson B. 1992; Toikkanen S. 1992; Hung M-C 1995; Hynes N.E 1994]. En pacientes sin metástasis en ganglios regionales el valor pronóstico de *erbB-2* es aún conflictivo. Entre estos enfermos un 70 % evoluciona favorablemente luego de la cirugía; sin embargo, no existe al momento forma de identificar con certeza el 30 % restante que presenta alto riesgo y que por lo tanto debería recibir una terapia más agresiva. Con respecto a *erbB-2*, mientras que algunos grupos reportan una correlación significativa entre su elevada expresión y una evolución desfavorable en estos pacientes, otros tantos fallan en detectar esta asociación [Slamon D.L 1989; Clark G.M. 1991; Wright C. 1989; Gusterson B. 1992; Toikkanen S. 1992; Hynes N.E 1994].

Por otra parte, distintos estudios clínicos demostraron una correlación positiva entre la sobre-expresión de *erbB-2* y la resistencia a determinadas drogas quimioterapéuticas [Gusterson B. 1992; Tsai C-M. 1993; Hynes N.E 1994]. Sin embargo también sobre este punto existen discrepancias entre diversos grupos [Hynes N.E 1994], posiblemente debido al empleo de diferentes esquemas terapéuticos y grupos reducidos de pacientes.

Posteriores estudios actualmente en curso, con gran número de pacientes y un seguimiento más prolongado, deberán evaluar la significación de *erbB-2* como marcador pronóstico independiente y como factor predictivo para la terapia.

La presencia aumentada de *erbB-2* en células tumorales y su localización en la superficie celular, hacen de esta proteína un blanco ideal para dirigir terapias antineoplásicas. Distintas estrategias han sido descritas, y su posible aplicación clínica es aún objeto de estudio. Diversos AMC generados contra el dominio extracelular de la proteína *erbB-2*

inhiben el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo* al ser utilizados solos [Hartwerth I.M. 1992; Hudziak R.M. 1987; Kasprzyk P.G. 1992] o acoplados a drogas quimioterapéuticas o radioisótopos [Hancock M.C. 1991; De Santes K. 1992]. En modelos animales la sobre-expresión de *erbB-2* en células tumorales aumentó la malignidad y potencial metastásico; mientras que la inhibición de la expresión de este gen suprimió el fenotipo maligno [Hung M.C. 1995]. Ciertos inhibidores de la transcripción del promotor *erbB-2* fueron administrados a ratones portadores de tumor (mediante liposomas o vectores adecuados), lográndose suprimir el crecimiento tumoral y aumentar la sobrevida [Hung M.C. 1995]. Estos resultados son alentadores en cuanto al posible desarrollo de terapias dirigidas a *erbB-2* en humanos.

• **Genes supresores de tumor :**

Otro grupo de genes que juegan un rol esencial en la regulación de la proliferación celular son los “supresores de tumor” [ver sección II]. Estos genes codifican para proteínas que actúan normalmente limitando la proliferación; por lo tanto su inactivación puede provocar la pérdida del control de la división celular, resultando en una proliferación descontrolada. Deleciones o mutaciones que inactiven a estos genes pueden ser críticas en la iniciación y progresión neoplásica. La identificación de estas alteraciones –tanto a nivel de ADN, ARN o proteína– puede resultar de gran valor para el diagnóstico, pronóstico, monitoreo y tratamiento del cáncer.

Un ejemplo interesante es el gen *p53*. La inactivación de este gen es el evento genético más frecuentemente detectado en cánceres humanos. *p53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica para una proteína nuclear de 53 kDa que funciona como un regulador negativo de la proliferación y se expresa en la mayoría de las células del organismo [Revisiones: Hinds P.W. 1994; Malkin D. 1994; Donehower L.A. 1993]. La proteína *p53* actúa como factor transcripcional, regulando la expresión de otros genes. Entre ellos induce la transcripción del gen *WAF1* (= *CIP1* = *p21*) cuyo producto se une al complejo de ciclina G₁- Cdk2 (Cdk2: proteína kinasa dependiente de ciclina) que normalmente permite a la célula atravesar la transición G₁/S del ciclo celular. La unión del producto de *WAF1* inhibe la actividad de este complejo, bloqueando así el pasaje a fase S.

En células normales los niveles de p53 son bajos y están regulados durante el ciclo celular: p53 aumenta en fase G₁ tardía y es degradada rápidamente (vida media: 30 a 60 minutos). Estos niveles se incrementan en respuesta a la presencia de daños en el ADN, determinando la detención del ciclo celular antes de la transición G₁/S. Esto permite a la célula reparar su ADN, de lo contrario entra en proceso de apoptosis [Hinds P.W. 1994; Malkin D. 1994]. En aquellas células donde p53 está inactivada la detención en G₁ no ocurre y el ADN alterado se replica, fijándose la mutación. Esto puede representar uno de los pasos importantes en la iniciación del cáncer: al no estar p53 o estar inactiva, se pierde un sistema que podría bloquea la proliferación de células que han sufrido una mutación carcinogénica. A su vez, esto permite la generación y fijación de posteriores mutaciones importantes en la progresión neoplásica [Lane D.P. 1992; Malkin D. 1994].

Distintos tipos de mutaciones en *p53* han sido detectadas en múltiples cánceres humanos (mama, colon, gástrico, tumores de sistema nervioso, etc.). Cuando estas alteraciones fueron analizadas, el patrón más frecuente observado resultó ser: una mutación puntual (generalmente sustitución de un aminoácido por otro) en uno de los alelos de *p53*, acompañada por pérdida del otro alelo. Sin embargo en algunos casos pudo identificarse un tipo particular de mutantes que presentaba: un alelo salvaje y el otro con una mutación dominante que codifica para una proteína inactiva, cuya conformación se encuentra alterada. En estos mutantes la oligomerización entre proteínas salvajes y mutantes (*p53* normalmente se agrega formando oligómeros) determina que el complejo adopte una conformación alterada y sea inactivo [Donehower L.A. 1993; Malkin D. 1994].

Un análisis detallado de las mutaciones de *p53* detectadas en tumores mostró que la gran mayoría ocurren en determinados “puntos calientes” localizados en regiones muy conservadas en la evolución. En carcinomas de colon y mama más del 90 % de las mutaciones observadas mapean en cuatro “puntos calientes”. En contraste con la proteína *p53* salvaje, estas formas mutantes resultan ser más estables y acumularse intracelularmente; por lo tanto pueden ser fácilmente detectadas por inmunohistoquímica [Donehower L.A. 1993; Finlay C.A. 1988].

Diversos trabajos han demostrado que la determinación de estas alteraciones de *p53* en el tejido tumoral pueden ser un buen indicador pronóstico de la sobrevida y evolución del paciente [Donehower L.A. 1993]. En general la presencia de altos niveles de *p53*

determinados por inmunohistoquímica, o la detección directa de mutaciones por técnicas moleculares, han sido asociadas con mal pronóstico. Esto fue especialmente demostrado en carcinomas mamarios, en los que se ha propuesto que p53 puede servir como marcador, contribuyendo a identificar aquellos pacientes sin metástasis en ganglios linfáticos regionales pero cuyos tumores son de crecimiento agresivo, y en los cuales es necesario una quimio- u hormono-terapia adyuvante [Allred D.C. 1993; Silvestrini R. 1993 (2); Patel D.D 1996; Bergh J. 1995]. Si bien hay aún algunos resultados controversiales respecto del uso de p53 como marcador, la discusión está básicamente centrada en la técnica utilizada para detectar las mutaciones y no en el valor pronóstico de éstas [Sjogren S. 1996; Kovach J.S. 1996; Chen Y.H. 1995; Lohmann D. 1993].

• **Receptores hormonales :**

Algunos tumores, como el carcinoma mamario, son especialmente influenciados en su comportamiento por la acción de distintas hormonas. En estos casos la determinación de la presencia de receptores hormonales en el tumor representa un marcador de gran valor. En carcinomas mamarios por ejemplo, la evaluación de receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RPg) resulta doblemente importante. En primer lugar permite predecir la respuesta clínica a tratamientos endócrinos, ya que se ha demostrado que la capacidad de responder a hormonoterapia está asociada con la presencia en el tumor de RE y RPg. La segunda razón es que, pacientes cuyos tumores presentan RE y RPg evolucionan más favorable que aquellos que carecen de estos receptores.

Dada la relevancia de estos receptores en cáncer de mama, serán descritos en mayor detalle en la sección siguiente.

V - **RECEPTOR ESTROGÉNICO Y RECEPTOR DE PROGESTERONA EN CÁNCER DE MAMA HUMANO:**

El epitelio mamario normal está regulado por diversas hormonas, entre ellas estrógenos y progesterona (Pg). El crecimiento, regulación y progresión de un alto porcentaje de los carcinomas mamarios es también fuertemente influenciado por estas hormonas. Aproximadamente un 65 % de los carcinomas de mama humanos expresan RE y RPg.

- El RE, junto con otros receptores de diversas hormonas esteroideas, pertenece a una familia de receptores nucleares con alta homología entre sí, cuyos miembros regulan numerosos procesos fisiológicos y morfológicos en respuesta a la unión con sus ligandos. Estos receptores actúan como factores transcripcionales dependientes de ligando: cuando las hormonas se unen al receptor correspondiente inducen un cambio conformacional, lo que permite que el complejo hormona-receptor interactúe con secuencias del ADN específicas en los promotores de diversos genes blanco. De esta forma estos complejos regulan (induciendo o inhibiendo) la expresión de otros genes.

El análisis de la estructura molecular del RE permitió distinguir distintos dominios funcionales. El dominio llamado C, corresponde a la región de unión al promotor de genes regulados por estrógenos, en especial a una secuencia en el ADN denominada “elemento respondedor a estrógenos” (ERE). Este dominio posee dos regiones de unión al ADN con estructuras de tipo “dedos de zinc”. El RE posee además la región de unión a estrógenos que mapea en el dominio E, un dominio D que actúa como bisagra uniendo las dos regiones anteriores (C y E) y el dominio A/B que interviene en la regulación de la actividad de RE como factor transcripcional. Existen además otras regiones importantes en la función de RE como: una señal de localización nuclear y una región de dimerización [Sluysen M. 1990; Horwitz K.B. 1994; Klinge C.M. 1992].

Se ha descrito que los estrógenos inducen la expresión de diversas proteínas en las células tumorales, entre ellas: RPg, catepsina D, pS2, Hsp27, c-Myc, TGF- α y diversos factores de crecimiento [Chalbos D. 1982; Brown A.M.C. 1984; Horwitz K.B. 1978; Chamness G.C. 1989; DeFriend D.J. 1994; Osborne C.K. 1990; Cavailles V. 1991; Rochefort H. 1995]. Numerosos estudios realizados tanto en tumores primarios como en líneas celulares de carcinoma mamario humano han demostrado que los estrógenos actúan como agentes mitogénicos, induciendo la proliferación celular. De ahí que la terapia hormonal más ampliamente aceptada en pacientes con cáncer de mama se basa en el uso de antagonistas de estrógenos, como el tamoxifeno [Chalbos D. 1982; Kung W.M 1986; Lykkesfeldt A.E. 1986; Osborne C.K. 1990; Jeng M.H. 1993; Harris J.R. 1993]

- El RPg pertenece a la misma familia de receptores nucleares y posee dominios funcionales homólogos al RE. Dos isoformas del RPg han sido descritas denominadas A

y B. En células de carcinoma mamario humano los PM de estas proteínas son 95.000 y 120.000 Da respectivamente. RPg A corresponde a una forma truncada de RPg B que carece de 164 aminoácidos en el extremo amino terminal. Ambas derivan de un mismo gen por iniciación alternativa de la traducción a partir de dos codones AUG ubicados en el mismo marco de lectura. Más recientemente se demostró que estas formas se originan de distintos ARNm transcritos a partir de dos promotores diferentes. El dominio A/B, localizado en el extremo amino terminal, difiere entre ambas isoformas del RPg y jugaría un rol importante en la activación diferencial de los diversos genes blanco [Sluysers M. 1990; Chamness G.C. 1989; Kastner P. 1990; Chalbos D. 1994].

Al igual que el RE, el complejo RPg - Pg actúa como factor transcripcional regulando positiva o negativamente la expresión de diversos genes [Savoldi G. 1995; Chalbos D. 1990, 1994]. Así por ejemplo, en carcinomas mamaros humanos inhibe la expresión de RE y de varios genes inducidos por estrógenos.

Diversos autores demostraron que la Pg ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular en cáncer de mama humano [Sutherland R.L. 1988; Musgrove E.A. 1991; Gill P.G. 1991]. Contrariamente algunas investigaciones señalan que, tanto la Pg como ciertas progestinas utilizadas en los anticonceptivos, pueden estimular la proliferación celular. Sin embargo varios autores mostraron que estos efectos proliferativos ocurren a dosis farmacológicas, y que pueden deberse a una reactividad cruzada con el RE y no a un efecto mediado por RPg [Shi Y.E. 1994; van der Burg B. 1991, 1992; Jeng M.H. 1992]. Mientras que el efecto de las progestinas solas sobre la proliferación celular en carcinomas mamaros todavía es debatido, es generalmente aceptado que inhiben el efecto mitogénico del estradiol sobre estas células. Más aún, las progestinas son utilizadas a menudo con éxito en el tratamiento del cáncer mamario, siendo la segunda opción en terapias endócrinas [Hissom J.R. 1987; Chamness G.C. 1989; Chalbos D. 1994; Harris J.R. 1993].

Como se mencionó en la sección anterior (sección IV: Marcadores Tumorales), la presencia de RE y RPg en carcinomas mamaros resulta un marcador muy importante para predecir la respuesta a terapias hormonales; por lo tanto su determinación en las biopsias tumorales es hoy una práctica clínica de rutina. Cabe señalar sin embargo, que la respuesta a las terapias hormonales suele ser transitoria, observándose frecuentemente

una evolución hacia la hormono-resistencia. Los mecanismos por los cuales tumores originalmente respondedores se vuelven hormono-resistentes no están aún aclarados, pero es probable que estén ligados a la heterogeneidad celular característica de los carcinomas mamarios, ya que la expresión de estos receptores no es uniforme en todas las células de un tumor. Como se verá más adelante, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis ha sido investigar el origen de esta heterogeneidad celular en la expresión de receptores hormonales en los carcinoma mamarios humanos.

VI - ANTICUERPOS MONOCLONALES Y CÁNCER

Múltiples investigaciones han sido realizadas para desarrollar anticuerpos que reconozcan moléculas diferencialmente expresadas en tumores, con el fin de utilizarlos en diagnóstico y terapias antitumorales. Los primeros trabajos se llevaron a cabo inmunizando animales con células tumorales o extractos de las mismas. Esto permitió obtener anticuerpos con cierto grado de especificidad hacia el tejido tumoral, pero simultáneamente con otros dirigidos contra diversas moléculas comunes a tejidos normales. Posteriormente, y con la idea de disminuir la producción de anticuerpos inespecíficos, en algunos trabajos se usaron como inmunógenos antígenos purificados en lugar de extractos celulares.

Utilizando estos anticuerpos policlonales se desarrollaron técnicas inmunológicas que posibilitaron la identificación de células tumorales o moléculas secretadas por éstas, sobre muestras de tejido o suero de los pacientes. Estas técnicas -como la inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, el uso de anticuerpos unidos a isótopos radioactivos, etc.- contribuyeron significativamente en el diagnóstico y tipificación de tumores. Sin embargo, frecuentemente estos anticuerpos reaccionan en forma cruzada con moléculas propias de tejidos normales, afectando la interpretación de los resultados.

A los fines terapéuticos su utilización ha sido muy limitada por diversos factores, incluyendo: la necesidad de inyectar altos niveles de proteína (con el consecuente riesgo de anafilaxis al no ser el suero de origen humano), la reactividad cruzada con tejidos normales y la dificultad de normalizar los distintos lotes de un anticuerpo.

El desarrollo de los AMC representó un extraordinario avance que permitió superar en gran medida estos problemas. En 1975 Köhler y Milstein reportaron la producción de anticuerpos homogéneos, con una especificidad única, a partir de células híbridas resultantes de la fusión de una célula productora de anticuerpos (linfocito B) sensibilizada contra un determinado antígeno y una célula proveniente de un mieloma. Esta célula híbrida o **hibridoma** secretaba anticuerpos cuya especificidad estaba determinada por el linfocito B y era a su vez virtualmente inmortal debido a la naturaleza maligna del mieloma [Köhler G. 1975]. La técnica evolucionó rápidamente eliminándose la contaminación con anticuerpos derivados del mieloma (utilizando una línea celular de mieloma no secretora) [Galfré G. 1981]

Desde entonces una inmensa variedad de AMC han sido desarrollados contra diversos tipos de marcadores tumorales. La posibilidad de producir en gran escala AMC contra marcadores tumorales ha generado grandes expectativas en cuanto a su uso para lograr diagnósticos y tratamientos antitumorales más efectivos y selectivos

- A los fines **diagnósticos** los AMC han resultado de suma utilidad tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*:

In vitro se utilizan de rutina en una gran variedad de determinaciones sobre muestras tumorales o fluidos corporales, ya sea para establecer diagnósticos más precisos, determinar el origen de un tumor o metástasis, evaluar el grado de avance de la enfermedad y pronóstico, predecir respuestas a terapias, etc. En la actualidad es posible evaluar la gran mayoría de los marcadores descriptos previamente (antígenos oncofetales, marcadores de diferenciación, oncogenes, genes supresores de tumor, índice proliferativo, presencia de receptores hormonales, etc.) mediante el empleo de AMC.

Las primeras aplicaciones de anticuerpos *in vivo* en el diagnóstico de pacientes con cáncer se realizaron con el fin de detectar la presencia y localización de tumores primarios o focos metastásicos, utilizándose para ello anticuerpos conjugados con radioisótopos. Por medio del monitoreo visual externo es posible detectar el radioinmunoconjugado que, dada su especificidad por algún marcador tumoral, deberá localizarse mayoritariamente en la zona del tumor. Este método de diagnóstico por imágenes, denominado radioinmuno-detección, se ha perfeccionado mucho y su uso se ha extendido ampliamente en los últimos años. Inicialmente varios estudios fueron realizados utilizando anticuerpos

policlonales antitumorales en modelos animales y luego en pacientes [Goldenberg D.M. 1974, 1978; Mach J.P. 1974, 1980; Ford C.H.J. 1986]. Con el desarrollo de los AMC los radioinmunoconjugados resultaron herramientas ideales para detectar metástasis ocultas, realizar monitoreos post-quirúrgicos y detectar tempranamente recurrencias [Colcher D. 1987; Esteban J.M. 1987; Goldenberg D.M. 1990; Hertel A. 1990; Gallinger S. 1993; Doerr R.J. 1991]. Para esto se requieren AMC que reconozcan con alta especificidad antígenos expresados en las células tumorales, ya que la reactividad del AMC con células normales podría conducir –por mecanismos inmunológicos– a daños en el tejido.

- Por otra parte el **uso terapéutico** en pacientes con cáncer de AMC dirigidos contra marcadores tumorales es actualmente un área de intensa investigación. Distintas estrategias de aplicación han sido desarrolladas, dependiendo de las propiedades del AMC y de la naturaleza y localización celular del antígeno que éste reconoce. Estos AMC pueden utilizarse solos (no modificados) o conjugados con agentes citotóxicos.

La aplicación del AMC no conjugado requiere que su unión al antígeno específico pueda desencadenar alguna reacción de citotoxicidad directa hacia la célula blanco, o bien interferir con la proliferación y diferenciación celular. Aquellos AMC con capacidad de mediar reacciones inmunológicas de citotoxicidad celular (ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), o bien lisis a través del sistema de complemento humano, pueden en principio ser utilizados sin modificar. Además, es necesario que el antígeno correspondiente sea expresado en la superficie celular, y que el complejo antígeno-AMC no sea rápidamente internalizado, sino que permanezca en la membrana celular el tiempo suficiente para permitir que ocurra la reacción de citotoxicidad. Es también importante que el antígeno esté presente en la gran mayoría de las células tumorales, o al menos en la subpoblación de células stem, responsables de la proliferación celular en el tumor.

Por otra parte, diversos agentes citotóxicos como toxinas, drogas o radioisótopos, han sido conjugados a AMC con propósitos terapéuticos. El uso de AMC como vehículos para dirigir drogas citotóxicas o toxinas requiere el reconocimiento de un antígeno en la superficie de las células cancerosas, seguido de la endocitosis del conjugado AMC-droga o toxina. También en este caso es importante tener en cuenta qué población celular dentro del tumor expresa el antígeno, y será por lo tanto blanco de la terapia. Con respecto al empleo de radioinmunoconjugados, la heterogeneidad antigénica es en principio menos

problemática, puesto que se requieren algunas células que expresen el antígeno para dirigir los radioisótopos al tumor, donde el efecto tóxico sería ejercido sobre las células vecinas independientemente de la expresión antigénica.

En los últimos años se han desarrollado múltiples estrategias terapéuticas, incluyendo:

- el acoplamiento de AMC a diferentes drogas, toxinas o radioisótopos, y la utilización de distintas técnicas de conjugación.
- el uso de diversos protocolos de tratamiento, terapias combinadas de AMC con citoquinas o con agentes quimioterapéuticos.
- la construcción de AMC quiméricos recombinantes humano/murinos para disminuir la formación de anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón (HAMA).
- la utilización de fragmentos de AMC [Fab o F(ab')₂] para aumentar la difusión y penetración del AMC en el tumor.

Varias de estas estrategias han sido probadas en modelos animales con resultados alentadores y actualmente se están ensayando en humanos [George A. 1994; Riethmuller G. 1994; Bajorin D. 1990; Mordoh J. 1995; Orlandi R. 1992; Wawrzynczac E.J. 1992; Trail P.A. 1993; Carrasquillo J.A. 1986; Bast R.C. 1985; Nadler L.M. 1984; Myklebust A.T. 1993]. Tratamientos con AMC, ya sea en conjunción con complemento o conjugados con agentes citotóxicos, se utilizan exitosamente para eliminar *in vitro* células tumorales a partir de médula ósea, en pacientes sometidos a trasplantes autólogos.

OBJETIVOS :

Como hemos visto en esta Introducción existe una gran diversidad en el comportamiento de los carcinomas mamarios humanos, siendo en muchos casos difícil predecir la evolución de la enfermedad y la respuesta a terapias antineoplásicas. Por otra parte, y a pesar de la alta complejidad alcanzada en el tratamiento del cáncer mamario, éste continúa siendo una de las principales causas de muerte entre las mujeres. Resulta necesario entonces lograr una mayor comprensión de la biología del cáncer de mama e investigar nuevas modalidades terapéuticas.

Se ha planteado también aquí que los carcinomas mamarios son tumores heterogéneos caracterizados por la coexistencia de diversos tipos celulares. La identificación de las distintas subpoblaciones celulares que componen los tumores, así como el estudio de la interrelación entre las mismas, podría ayudar a la comprensión del comportamiento tumoral y al diseño de nuevas terapias sobre bases más racionales. De particular relevancia resulta la caracterización de células stem tumorales, con capacidad ilimitada de proliferación y responsables del crecimiento y diseminación del tumor.

En base a estas observaciones dos **objetivos** principales han sido planteados en este trabajo de Tesis:

I.- La caracterización de las distintas subpoblaciones celulares presentes en carcinomas mamarios humanos, con respecto a capacidad proliferativa, presencia de receptor estrogénico y receptor de progesterona y expresión de diversos marcadores tumorales asociados a carcinoma de mama.

- **Para ésto se evaluó en primer lugar la presencia de RE y RPg con el fin de identificar en qué subpoblación celular se expresan dichos receptores. Particularmente se buscó determinar si las células stem tumorales presentan RE y/o RPg o si por el contrario estos receptores se expresan durante la diferenciación celular, asociados a una pérdida en la capacidad proliferativa. Los resultados obtenidos se presentan y discuten en el Capítulo I de esta Tesis.**

• Se estudió también la expresión de diversos marcadores tumorales asociados a carcinoma mamario humano con el objeto de identificar distintas etapas en el proceso de diferenciación celular. Se buscó establecer una secuencia de expresión de marcadores tumorales a medida que disminuye la capacidad proliferativa y progresa la diferenciación celular.

Para el estudio de los distintos marcadores se utilizaron AMC previamente descritos, y se incluyeron también AMC recientemente desarrollados en nuestro laboratorio contra carcinoma mamario humano. En el Capítulo II se presentan y discuten los resultados.

II.- Selección de AMC contra carcinomas mamaros humanos, con capacidad de mediar efectos citotóxicos contra sus células blanco y que reconozcan antígenos expresados en células indiferenciadas, de alta capacidad proliferativa, idealmente en células stem.

En el Capítulo III de esta Tesis se describen los resultados correspondientes a un AMC desarrollado en nuestro laboratorio, FC-2.15, su reactividad y propiedades funcionales.

CAPÍTULO I

Expresión de Receptor Estrogénico y Receptor de Progesterona en Carcinoma de Mama Humano

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que aproximadamente un tercio de pacientes con carcinoma de mama responden a terapias hormonales y que la capacidad de responder a estos tratamientos está asociada con la presencia en el tumor de RE y especialmente RPg. Esta afirmación está basada en el hecho que los índices de respuesta son aproximadamente del 10 % para pacientes con tumores RE^-/RPg^- ; 30 % para RE^+/RPg^- ; 80 % para RE^+/RPg^+ , siendo el subgrupo RE^-/RPg^+ demasiado pequeño para permitir conclusiones significativas [McGuire W.L. 1986; Thorpe S.M. 1987]. Sin embargo, como se mencionó previamente, aún pacientes inicialmente respondedores presentan con frecuencia recurrencias de la enfermedad a distintos intervalos de tiempo. Este cambio en la respuesta estaría relacionado con la heterogeneidad celular existente dentro de la masa tumoral, y distintas posibilidades han sido propuestas para explicar el origen de dicha heterogeneidad:

- Una de ellas se basa en la coexistencia en el tumor de clones celulares independientes RE^+/RPg^+ y RE^-/RPg^- . Así, la hormonoterapia actuaría sobre los clones positivos, mientras que los clones negativos podrían sobrevivir y repoblar el tumor [Poulsen H.S. 1981]. Sin embargo, esta hipótesis no puede explicar el hecho que la mayoría de los tumores recurrentes son aún RE^+ [Taylor R.E. 1982].

- Se ha propuesto también una hipótesis alternativa basada en la presencia de una jerarquía celular en el tumor [Selby P. 1983; Buick R.N. 1984 (2)]. Como se describió en la Introducción General (sección III) las células tumorales pueden clasificarse funcionalmente en tres categorías principales: a) células stem, indiferenciadas, con capacidad de auto-renovarse y de originar progenie que comienza un proceso de diferenciación; b) células semidiferenciadas, todavía capaces de dividirse pero ya comprometidas en el proceso de diferenciación, y c) células diferenciadas que han perdido su capacidad de proliferar. De acuerdo a este modelo, el RE y el RPg estarían ausentes en las células stem tumorales, y serían recién expresados en el curso de la diferenciación celular. Esta hipótesis es apoyada por trabajos que muestran una relación inversa entre la expresión de RE/RPg y el grado de diferenciación tumoral [Spyratos F. 1992]. En base a este modelo la hormonoterapia actuaría sobre progenie de células diferenciadas conduciendo a un enriquecimiento en células stem.

Existen pocos datos experimentales que permitan distinguir entre estas alternativas, lo que podría ayudar en la comprensión de la biología del cáncer de mama y el mecanismo de acción in vivo de los antiestrógenos sobre el tumor. Trabajos previos de nuestro laboratorio realizados sobre tumores primarios y líneas celulares han apoyado el modelo de células stem identificando y aún aislando subpoblaciones celulares con distinta capacidad proliferativa y diferente expresión de marcadores tumorales [Podhajcer O.L. 1986; Resnicoff M. 1987; Sorín I. 1988].

En esta primera etapa del trabajo el objetivo fue investigar si las células en proliferación presentan RE y/o RPg o si, por el contrario, la expresión de estos receptores ocurre en el curso de la diferenciación celular y asociada a una pérdida de capacidad proliferativa.

RESULTADOS

1.- Análisis de la expresión de RE y RPg en carcinomas de mama humanos.

Muestras tumorales obtenidas de 34 pacientes con carcinoma primario de mama fueron inicialmente analizadas para expresión de RE y RPg. Para esto se obtuvieron cortes histológicos de dichos tumores en crióstato, y sobre secciones consecutivas de cada tumor se realizaron inmunohistoquímicas con AMC anti-RE y AMC anti-RPg respectivamente, tal cual se describe en Materiales y Métodos (sección 1. 3). Los preparados se observaron al microscopio evaluándose independientemente los porcentajes de células que expresan RE (células RE⁺) y RPg (células RPg⁺). Fueron considerados positivos para la expresión de un determinado receptor, aquellos tumores donde un número mayor o igual al 5 % de las células tumorales expresaban dicho receptor. Las células RE⁺ o RPg⁺ presentaron coloración marrón en su núcleo, tal como se muestra en la **figura 2**.

Pudo observarse que 20 de los 34 tumores fueron RE⁺, de los cuales 18 también expresaron RPg, mientras que 2 fueron RPg⁻. Los restantes 14 tumores resultaron RE⁻ RPg⁻. Dado que se buscaba investigar la capacidad proliferativa de aquellas células que expresaban receptores hormonales, solamente los 18 tumores RE⁺ RPg⁺ fueron incluidos en este estudio. La **tabla 3** resume datos clínicos de los pacientes cuyos tumores fueron analizados y las características histopatológicas de dichos tumores.

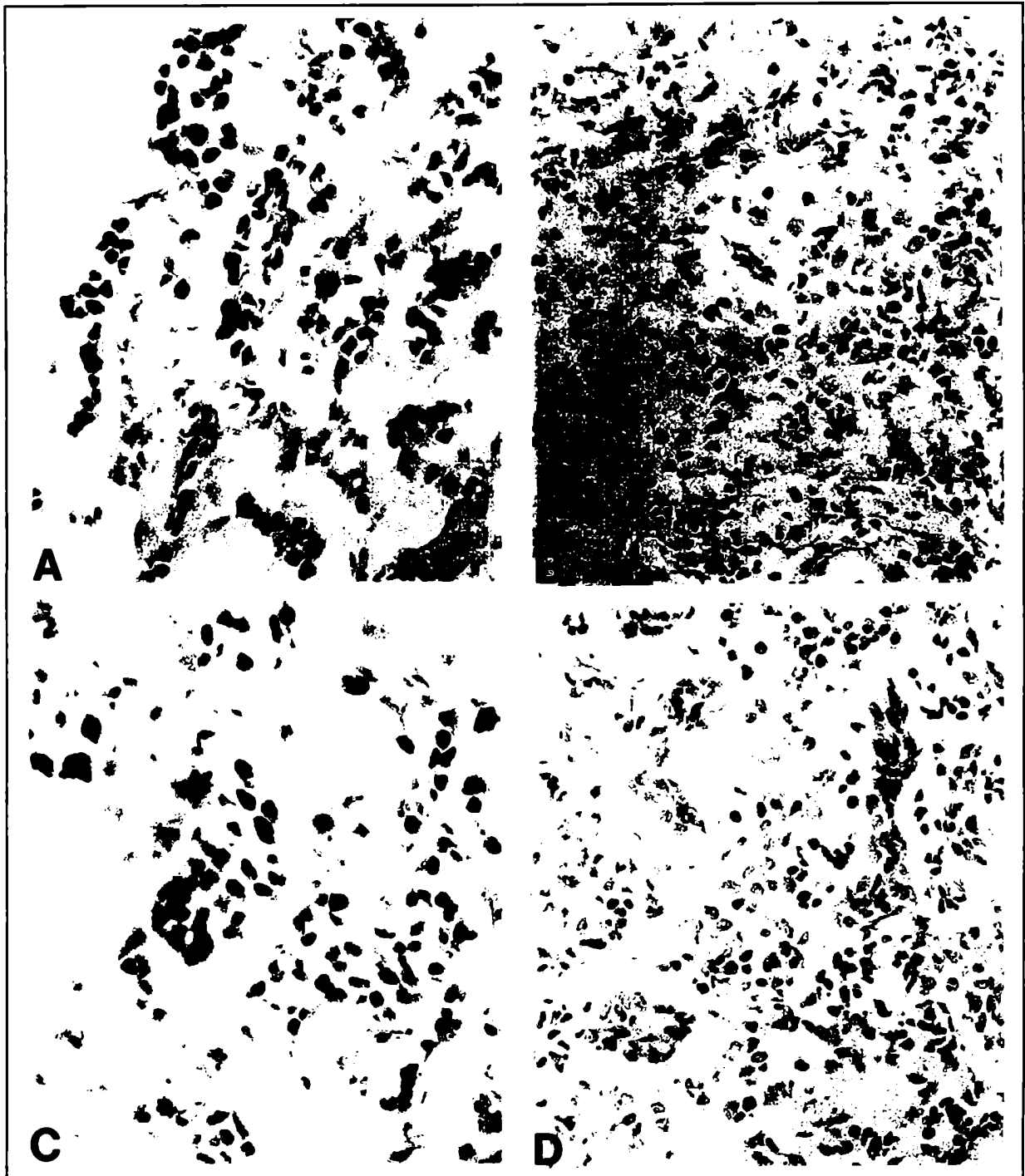


Figura 2. Detección de RE y RPg en carcinomas mamarios humanos.

La expresión de RE y RPg se determinó por inmunohistoquímica con AMC anti-RE (A y B) y AMC anti-RPg (C y D) según se describe en Materiales y Métodos. A: carcinoma RE⁺; B: RE⁻; C: RPg⁺; D: RPg⁻. Aumento: 400 x.

Tabla 3: Datos clínicos y análisis histopatológico

Paciente	Estadio clínico	Status menopáusico	Tipo histológico	Grado de diferenciación
1. DC	II	Post	Ductal infiltrante	I
2. CA	II	Post	Ductal infiltrante	I
3. IM	IV	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
4. GZ	IV	Pre	Ductal infiltrante, NOS	II
5. AA	I	- (Hombre)	Ductal infiltrante, NOS	II
6. UJ	III	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
7. CD	II	Pre	Ductal infiltrante	I
8. GE	I	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
9. GG	II	Post	Ductal infiltrante	I
10. BA	II	Post	Lobulillar infiltrante	-
11. CE	IV	Pre	Ductal infiltrante, NOS	II
12. VA	II	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
13. BG	I	Post	Lobulillar infiltrante	-
14. MM	I	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
15. GD	II	Post	Ductal infiltrante	III
16. GA	III	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
17. AV	I	Post	Lobulillar in situ e infiltrante	-
18. AM	IV	Post	Lobulillar infiltrante	-

El análisis histopatológico fue realizado por las Dras. A.I. Bravo e I. Sorín del Servicio de Patología del Hospital Castex. Los sistemas de clasificación utilizados figuran en Materiales y Métodos

2.- Análisis de las subpoblaciones celulares RE⁺ y RPg⁺.

Con la idea de estudiar si ambos receptores hormonales se expresaban simultáneamente en las mismas células tumorales, se compararon las subpoblaciones celulares RE⁺ y RPg⁺ con respecto a su tamaño y superposición. Trabajos previos han demostrado que la síntesis de RPg es inducida por estrógenos en líneas celulares de carcinoma mamario humano [Horwitz K.B. 1978; Chamness G.C. 1989]. Si se asume que cuando las células tumorales expresan RE rápidamente se induce la expresión de RPg y que RPg no regula negativamente la expresión de RE, ambos receptores deberían coexistir en las mismas células. Sin embargo, ambas subpoblaciones celulares podrían no superponerse si la inducción de RPg mediada por RE es un proceso lento, o si –como se describió en líneas celulares– RPg tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de RE.

Se comparó entonces en primer lugar, el tamaño de ambas subpoblaciones celulares. Para esto se determinaron en cada tumor los porcentajes de células RE⁺ y RPg⁺ por inmunohistoquímica en cortes histológicos independientes, como se describió en la sección anterior. En la **figura 3** se presentan los resultados obtenidos para los 18 tumores evaluados. Como se observa, en todos los tumores existe heterogeneidad celular con respecto a la expresión de receptores hormonales. Aún en tumores con alta expresión de RE o RPg, coexisten células positivas y negativas. Por otra parte, como muestra la figura, si bien ambas subpoblaciones celulares no coinciden en tamaño para un dado tumor, los porcentajes promedio de células RE⁺ y RPg⁺ de los 18 tumores resultaron equivalentes (media \pm SEM : RE⁺ 36,8 \pm 2.5 % ; RPg⁺ 39,3 \pm 4.1 %).

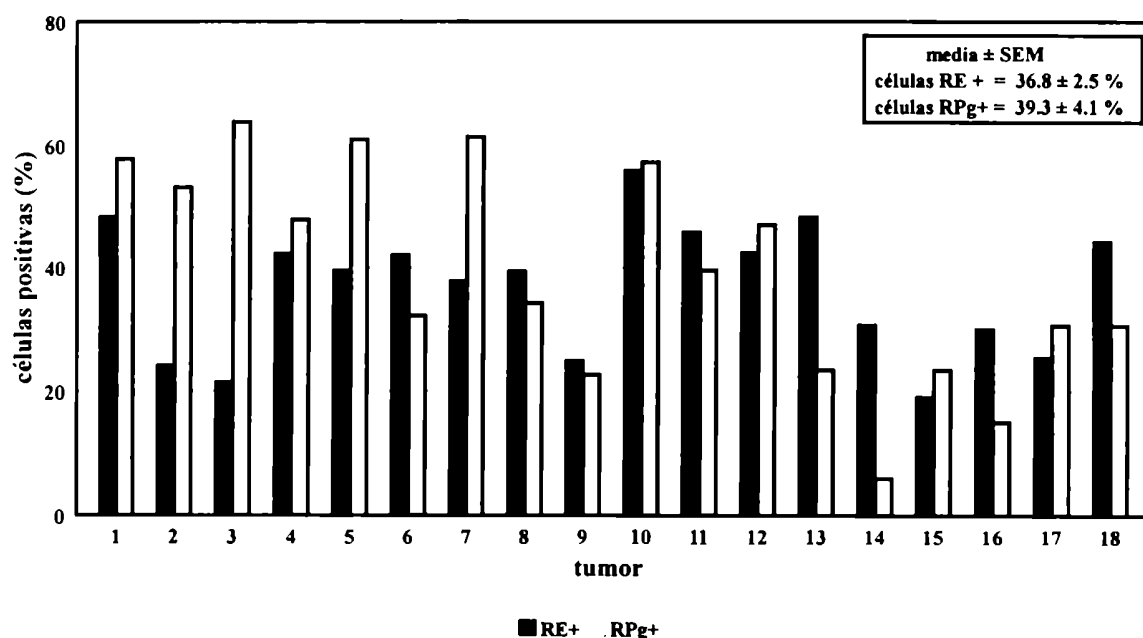


Figura 3: Expresión de RE y RPg en carcinomas mamarios.

Los porcentajes de células RE⁺ y RPg⁺ fueron determinados sobre cortes histológicos por inmunohistoquímica como se describió en Materiales y Métodos. Todas determinaciones se realizaron por duplicado y se evaluaron entre 3000 y 5000 células por corte de tejido. En el recuadro se muestran los valores promedio (media \pm SEM) de los 18 tumores analizados.

Para investigar si RE y RPg eran co-expresados en las mismas células tumorales, se realizaron inmunohistoquímicas sobre cortes histológicos de cinco de estos tumores, donde ambos AMC (anti-RE y anti-RPg) fueron agregados simultáneamente, como se describe en Materiales y Métodos (sección 1. 3). Dado que RE y RPg tienen localización nuclear, los núcleos positivos en este experimento podían contener uno o ambos receptores. En todos los tumores analizados con esta doble reacción se observó que el número de células positivas detectadas con ambos anticuerpos utilizados simultáneamente, fue mayor que el detectado utilizando cualquiera de ellos por separado, pero menor que el obtenido sumando las 2 determinaciones individuales. La **figura 4** muestra, para cada tumor, el porcentaje de células positivas detectadas por cada uno de los AMC por separado (% células RE⁺ y % células RPg⁺) y el detectado cuando ambos AMC fueron utilizados al mismo tiempo (% células RE⁺ y/o RPg⁺). Se estimó entonces la cantidad de células que estarían co-expresando ambos receptores, como se muestra en la figura, siendo éstas entre 22,6 y 28.7 % de las células totales. Estos resultados indican que en cáncer de mama RE⁺ RPg⁺, existen 4 categorías celulares: RE⁻ RPg⁻; RE⁺ RPg⁻; RE⁺ RPg⁺ y RE⁻ RPg⁺.

3.- Estabilidad del RE y el RPg

Con el objeto de estudiar la capacidad proliferativa de las células que expresan receptores hormonales, las muestras tumorales debían ser incubadas a 37°C en medio mínimo esencial Eagle's (MEM) más 10 % suero fetal bovino (FBS) en presencia de [³H] dT para marcar las células en proliferación, y a continuación realizar la detección de RE y RPg (Materiales y Métodos, sección 1. 6). Por lo tanto fue necesario verificar primero que dichos receptores no se alteraran bajo estas condiciones experimentales. Se analizó entonces la estabilidad del RE y el RPg cuando los fragmentos tumorales eran incubados por distintos tiempos a 37°C en MEM más 10 % FBS.

Inicialmente fragmentos derivados de 4 tumores se incubaron durante 4 hs, siendo éste el tiempo reportado en la técnica descripta por Sorín y col. [1988] para la determinación del índice proliferativo. Sobre estas muestras se analizó la expresión de RE por inmunohistoquímica y pudo observarse que en estas condiciones el RE no se conservó (dato no mostrado). Se realizaron entonces incubaciones por tiempos más cortos (0, 30, 60 y 120 min.) y se analizó la estabilidad del RE en tumores obtenidos de 15 pacientes.

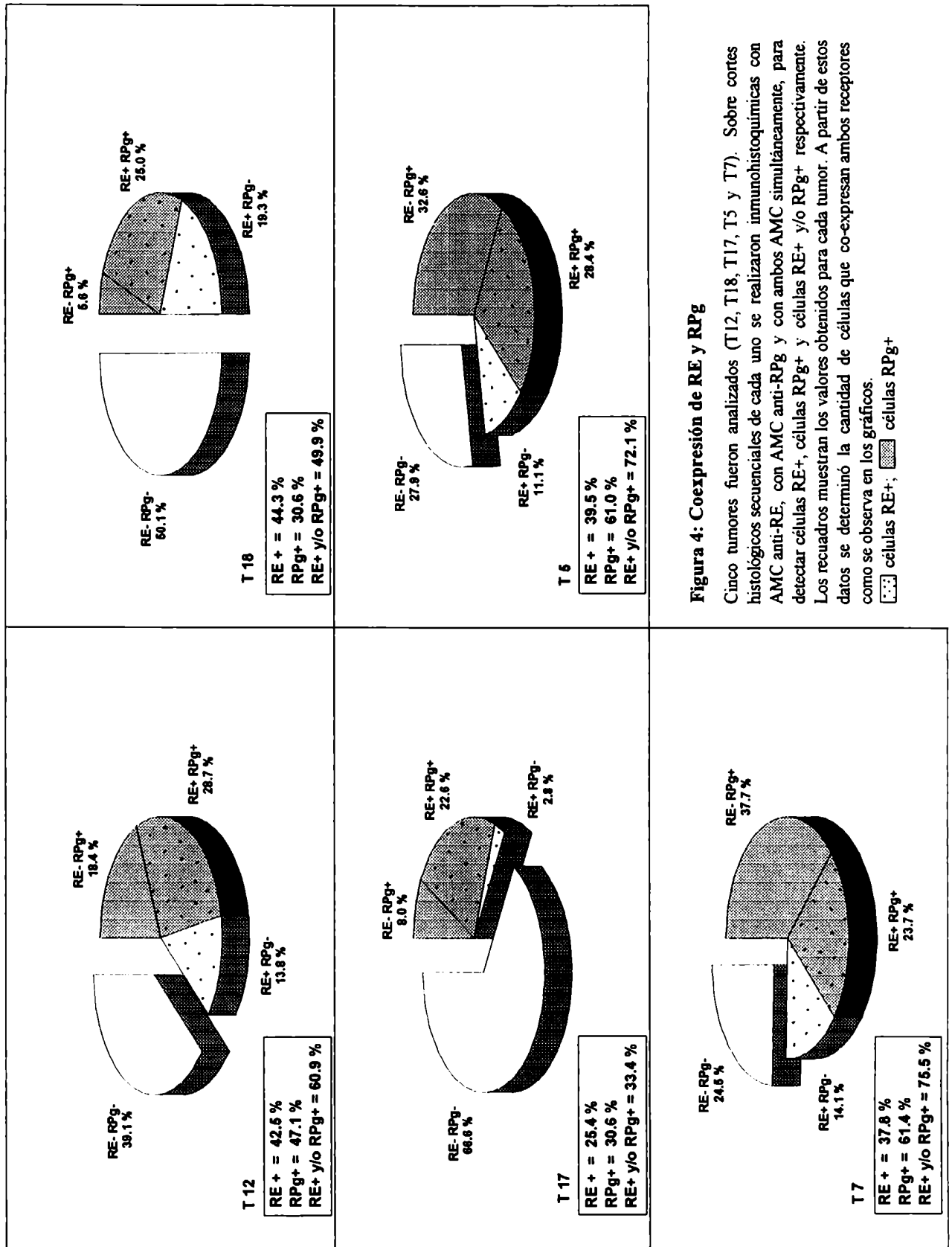


Figura 4: Coexpresión de RE y RPg

Cinco tumores fueron analizados (T12, T18, T17, T5 y T7). Sobre cortes histológicos secuenciales de cada uno se realizaron inmunohistoquímicas con AMC anti-RE, con AMC anti-RPg y con ambos AMC simultáneamente, para detectar células RE+, células RPg+ y células RE+ y/o RPg+ respectivamente. Los recuadros muestran los valores obtenidos para cada tumor. A partir de estos datos se determinó la cantidad de células que co-expresan ambos receptores como se observa en los gráficos.

células RE-
 células RE+
 células RPg-
 células RPg+

Los resultados se presentan en la **figura 5.A** y muestran que, mientras en algunos tumores (7/15) el porcentaje de células RE⁺ permaneció estable por al menos 2 hs a 37°C, en otros (8/15) las células perdieron rápidamente el RE. Cuando el mismo tipo de ensayo se repitió analizándose la expresión de RPg, el porcentaje de células RPg⁺ permaneció constante por al menos 2 hs a 37°C en todos los tumores estudiados (n = 9) (**figura 5.B**).

Se eligió entonces para los experimentos de detección simultánea de expresión de receptores hormonales y síntesis de DNA, realizar incubaciones con [³H] dT de 30 minutos, siendo éste el tiempo máximo de incubación tal que los porcentajes de células RE⁺ y RPg⁺ permanecían constantes.

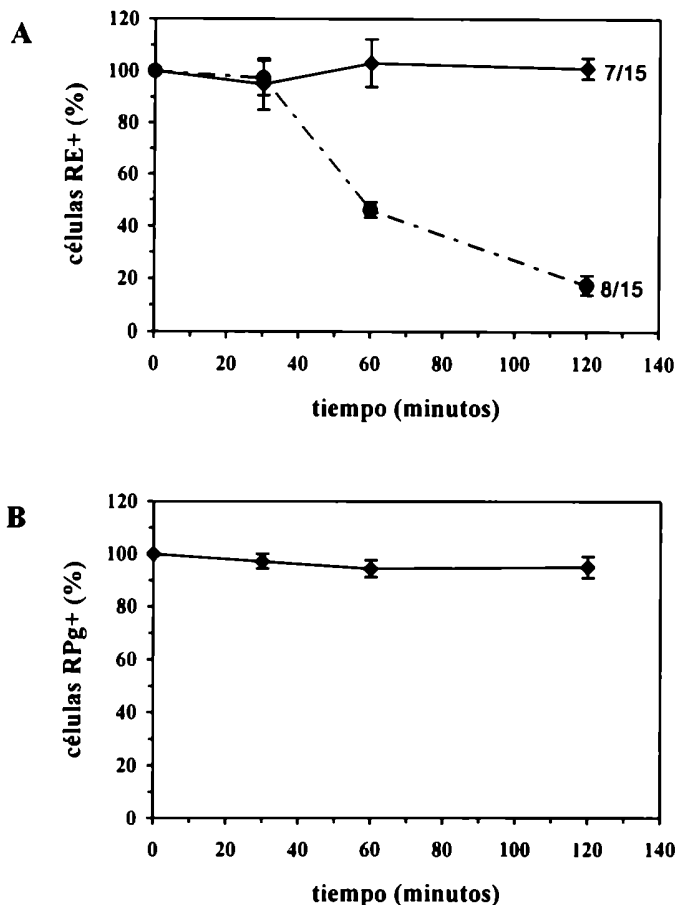


Figura 5. Estabilidad de RE y RPg.

Los fragmentos tumorales fueron incubados a 37°C en MEM más 10 % FBS durante distintos intervalos de tiempo. A continuación se realizaron cortes histológicos y se determinó la expresión de RE (**A**) y RPg (**B**) por inmunohistoquímica como se describe en Materiales y Métodos. Se evaluó el porcentaje de células positivas tomando como 100 % el número de células positivas en las muestras congeladas inmediatamente después de la cirugía. Los datos presentados corresponden a la media \pm SEM . (**A**: n = 15; **B**: n = 9).

4.- Análisis de la expresión de RE y RPg en células en proliferación

El propósito de este experimento fue investigar la capacidad proliferativa de las células que expresan RE o RPg en carcinomas de mama humanos. Particularmente se buscó determinar si las células en proliferación presentan dichos receptores hormonales, ó si éstos se encuentran en células ya diferenciadas incapaces de dividirse.

Un trabajo previo de nuestro laboratorio fue realizado tratando de definir si las células ciclantes en carcinoma mamario expresan RE [Podhajcer O.L. 1986]. Este estudio se basó en el fraccionamiento celular de tumores primarios y una posterior caracterización de las subpoblaciones celulares obtenidas, y sugirió que las células en proliferación en su mayoría carecían de RE. Sin embargo, las condiciones usadas para la disociación celular involucraban la disrupción de la arquitectura tisular normal, pudiendo ocasionar pérdidas de RE y/o introducir alteraciones no fisiológicas. En el presente trabajo se abordó nuevamente el problema utilizándose una técnica que permite la detección simultánea de proliferación y expresión de proteínas celulares, preservando la estructura del tejido tumoral (Materiales y Métodos, sección 1. 6). Para esto, se incubaron fragmentos tumorales durante 30 minutos a 37°C en presencia de [³H] dT, luego se realizaron cortes histológicos, se determinó la presencia de RE / RPg por inmunohistoquímica y sobre el mismo preparado se detectaron células en proliferación (que replican su ADN) por autoradiografía. En la **figura 6** se muestra un tumor en el que se analizó la síntesis de ADN y la expresión de RPg y, como puede apreciarse, se distingue claramente la incorporación de [³H] dT en las subpoblaciones celulares RPg⁺ y RPg⁻.

Se determinó entonces el índice de marcación con [³H] dT (TLI) de las subpoblaciones celulares RE⁺, RE⁻, RPg⁺ y RPg⁻, calculándose para cada una de ellas el porcentaje de células que incorporaron [³H] dT como se describe en Materiales y Métodos (sección 1.6). La **figura 7** muestra los resultados obtenidos para los 18 tumores analizados.



Figura 6. Expresión de RE y RPg en células en proceso de síntesis de ADN.

Las muestras tumorales fueron incubadas en presencia de ^3H dT y sobre cortes histológicos se determinó presencia de RPg por inmunohistoquímica y replicación del ADN por autoradiografía, como se describe en Materiales y Métodos. La figura muestra células sintetizando ADN RPg⁺ (A) y RPg⁻ (B). Aumento: 1000 x.

- Con respecto a la expresión de RPg (Fig. 7. A) puede verse que en cada tumor la capacidad proliferativa de la subpoblación celular RPg⁻ fue mayor que la de las células RPg⁺, resultando esta diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) de acuerdo al test de Wilcoxon para muestras apareadas (Wilcoxon signed rank test, GraphPad Software Inc.). Este consistente resultado determinó que el TLI promedio de la subpoblación de células RPg⁻ sea 4,48 veces mayor que el TLI de la población RPg⁺ (media \pm SEM = $0,94 \pm 0,13$ % y $0,21 \pm 0,05$ % respectivamente).

Como surge al comparar las figuras 3 y 7.A, no existe correlación entre el tamaño de cada subpoblación (% de células RPg⁺ y RPg⁻) y su respectivo TLI. Así por ejemplo, en los tumores # 1, 2, 3, 5, 7 y 10, donde más del 50 % de las células fueron RPg⁺ (ver Fig. 3), el TLI de la subpoblación RPg⁺ fue muy bajo, inferior al de las células RPg⁻ (ver Fig. 7. A), y en algunos casos directamente cero (# 1, 2, 3).

- El comportamiento replicativo de las subpoblaciones celulares RE⁻ y RE⁺ fue más variable (Fig. 7. B). Aunque en la mayoría de los tumores las células RE⁻ presentaron mayor capacidad proliferativa que las RE⁺, en cuatro de ellos se verificó una relación opuesta; siendo entonces la diferencia entre ambos TLIs estadísticamente no significativa. El TLI promedio de la subpoblación RE⁻ resultó entonces sólo levemente mayor que el TLI de las células RE⁺: media \pm SEM= $0,74 \pm 0,11$ % y $0,53 \pm 0,16$ % respectivamente. Tampoco acá se observó concordancia entre el tamaño de cada subpoblación (Fig. 3) y sus índices de proliferación (Fig. 7. B). Como ejemplo pueden verse los tumores # 1, 2 y 3 donde la población de células RE⁺ varió entre 20 y 50 % (ver Fig.3), y el TLI de la misma fue cero (ver Fig 7. B). O los tumores # 15, 16, 17 y 18 donde la población RE⁺ presentó mayor capacidad proliferativa que la RE⁻ y sin embargo las células RE⁺ no superaron el 30 % de las células totales del tumor.

Esta falta de correlación entre el porcentaje de células en una dada subpoblación y su respectiva capacidad proliferativa, sugeriría que las células receptor hormonal-positivo y las receptor hormonal-negativo pertenecen a subpoblaciones interrelacionadas, más que a clones independientes.

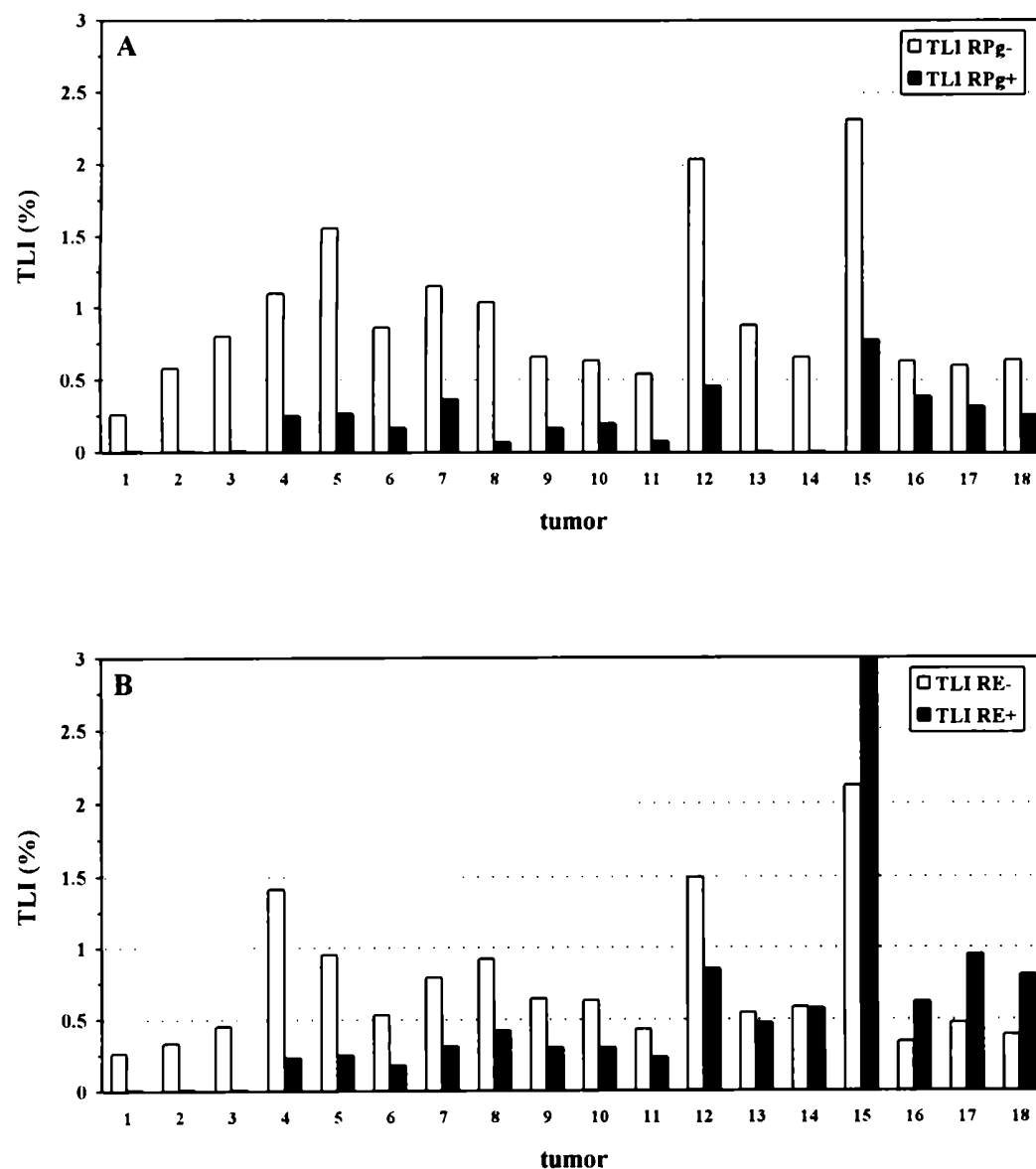


Figura 7. TLI de las subpoblaciones celulares RPg^+ , RPg^- , RE^+ y RE^- .

Sobre muestras tumorales incubadas 30 minutos en presencia de $[^3H]$ dT se determinó expresión de RPg (A) o RE (B) y replicación del DNA. El índice de marcación con $[^3H]$ dT (TLI) de las distintas subpoblaciones fue calculado evaluándose las zonas perisféricas de los fragmentos tumorales como se describió en Materiales y Métodos. Cada determinación fue realizada por duplicado y se analizaron más de 3500 células por corte histológico. El TLI promedio de los 18 tumores analizados para cada subpoblación fue: $TLI RPg^- = 0,94 \pm 0,13$ %; $TLI RPg^+ = 0,21 \pm 0,05$ %; $TLI RE^- = 0,74 \pm 0,11$ %; $TLI RE^+ = 0,53 \pm 0,16$ % (media \pm SEM).

A partir de los datos correspondientes al tamaño de cada subpoblación celular y su TLI (figuras 3 y 7), las células proliferantes fueron clasificadas de acuerdo a su positividad para RE y RPg. Los resultados mostrados en la **tabla 4** indican que la mayoría de las células en replicación carecen de dichos receptores hormonales: un $24,8 \pm 4,1$ % de éstas expresan RE, mientras que sólo un $11,2 \pm 2,4$ % son RPg⁺. El análisis estadístico de los datos reveló diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre ambos receptores al comparar su expresión en células proliferantes (test de Wilcoxon para muestras apareadas).

Tumor	Células marcadas con [³ H] dT (%)	
	RE ⁺	RPg ⁺
# 1	0	0
# 2	0	0
# 3	0	0
# 4	11	17
# 5	14	21
# 6	19	9
# 7	19	34
# 8	23	4
# 9	13	7
# 10	38	30
# 11	31	9
# 12	30	17
# 13	45	0
# 14	30	0
# 15	25	9
# 16	44	10
# 17	41	19
# 18	63	15
Media ± SEM	24,8 ± 4,1	11,2 ± 2,4

Tabla 4 : Relación entre replicación celular y expresión de receptores hormonales.

La proporción de células en replicación que expresan RE y RPg fue calculada a partir de los datos reportados en las figuras 3 y 7. El número total de células evaluadas que incorporan [³H] dT fue definido como 100%.

Finalmente, y para verificar que el corto tiempo de incubación usado en este estudio no afectara la distribución de las células marcadas con [^3H] dT entre los compartimientos $\text{RE}^+ / \text{RE}^-$ y $\text{RPg}^+ / \text{RPg}^-$, cinco muestras tumorales (# 1, 7, 10, 15 y 18) se incubaron en presencia de [^3H] dT por 30 y 60 minutos, y en ambas condiciones se midió: **a)** el TLI total del tumor; **b)** la proporción de células marcadas con [^3H] dT, RPg^+ , y **c)** la proporción de células marcadas con [^3H] dT, RE^+ .

Se utilizaron para este ensayo tumores cuyo RE haya probado ser estable (figura 5. A). Los resultados mostraron que, a 60 minutos el TLI promedio de estos 5 tumores aumentó en un 55.8 % con respecto al TLI de los 30 minutos. Sin embargo el porcentaje promedio de células marcadas con [^3H] dT que expresan receptores hormonales no cambió significativamente. En el caso de **RPg**, éste varió de $17,6 \pm 6,4$ % (30 min.) a $20,2 \pm 4,9$ % (60 min.), y para **RE** de $29,0 \pm 10,5$ % (30 min.) a $25,9 \pm 8,5$ (60 min.), indicando que la presencia de receptores hormonales en células en proliferación no se alteraba con un mayor tiempo de incubación. (Los resultados se presentan como media \pm SEM).

DISCUSIÓN

En esta primera etapa del trabajo se han analizado el tamaño y la capacidad proliferativa de las subpoblaciones celulares RE^+ , RE^- , RPg^+ y RPg^- . Los resultados obtenidos indican que aunque los tamaños promedio de las subpoblaciones RE^+ y RPg^+ son similares, éstas no son idénticas. Esta conclusión está basada en que ambas poblaciones celulares superponen sólo parcialmente (Fig. 4) y que el TLI promedio de las células RE^+ es 2,5 veces mayor al de las RPg^+ (Fig. 7).

Cuando los índices de proliferación de las células RE^+ y RE^- fueron comparados (Fig. 7.B), se observó que en la mayoría de los tumores la subpoblación que expresa RE tiene menor capacidad proliferativa, siendo su TLI en promedio 1,4 veces menor al de las células RE^- . Los resultados mostraron que la expresión de RPg está acompañada por una mayor restricción en la proliferación celular. Esto se refleja en la Fig. 7.A donde se observa que, en cada tumor analizado, el TLI de la subpoblación celular RPg^+ fue menor al de la RPg^- .

Los datos reportados aquí señalaron también una considerable heterogeneidad celular en la expresión de RE y RPg. En todos los tumores coexistieron células positivas y negativas. Una corriente explicación del origen de esta heterogeneidad es la existencia en el tumor de clones celulares independientes receptores hormonales-positivos y negativos. Para aceptar esta hipótesis, una condición necesaria es que ambos tipos celulares (positivos y negativos) deben ser capaces de proliferar, y en este trabajo se demostró que ésto es verdadero. Por otra parte, de ser éstos clones independientes, sería esperable una correlación directa entre el índice proliferativo de cada tipo celular y su proporción en la población celular total del tumor, suponiendo similar cinética de crecimiento para ambos clones. (Este supuesto es apoyado por datos de líneas celulares de carcinoma mamario humano, que indican que no existe correlación entre el tiempo de duplicación de una línea celular y su expresión de receptores hormonales [Calvo F. 1984; Chu M.Y. 1985; Bover L. 1991]). Los resultados obtenidos sin embargo, mostraron que dicha concordancia entre proliferación y tamaño poblacional no se verificó. Los datos presentados sugieren que células positivas y negativas para receptores hormonales pertenecen a compartimientos interrelacionados, y parecen ajustar mejor con la hipótesis que la presencia o no de RE y RPg refleja distintos estadios de diferenciación celular (modelo de células stem).

De acuerdo a los resultados presentados puede proponerse el siguiente modelo para la expresión de receptores hormonales en carcinomas mamarios RE⁺/RPg⁺ (Figura 8):

- Las células stem no expresarían RE ni RPg. Esta conclusión es fuertemente apoyada por el hecho que sólo 24,8 % y 11,2 % de las células proliferantes son RE⁺ y RPg⁺ respectivamente (Tabla 4), y que los TLI de las células que expresan RE o RPg son inferiores a los de las células negativas (Fig. 7).
- El RE comenzaría a expresarse después de algunos ciclos de división celular y mientras todavía se retiene la capacidad proliferativa.
- Posteriormente, el complejo RE - estradiol induciría la expresión de RPg. Está descrito que la síntesis de RPg es inducida por estrógenos en tejidos normales y también ha sido reportado en carcinoma mamario humano [Horwitz K.B. 1978; DeFriend D.J. 1994]. El estudio del gen de RPg, clonado y secuenciado a partir de células de cáncer de mama, reveló la existencia de dos promotores, ambos inducibles por estrógenos [Kastner P. 1990].
- La expresión de RPg estaría asociada a una pérdida de la capacidad proliferativa. Esto se evidencia en el índice de proliferación marcadamente bajo de la subpoblación celular RPg⁺. Una vez que el RPg es sintetizado y se une a progesterona (Pg), ésta podría actuar inhibiendo la proliferación celular. La posibilidad que la expresión de RPg coincida pero no determine la inhibición de la proliferación, también debe ser considerada. Sin embargo, un efecto inhibitorio directo de progestinas sobre la proliferación fue reportado en células de epitelio mamario normal humano [Gompel A. 1986] y en distintas líneas celulares de cáncer mamario humano RE⁺ RPg⁺ [Sutherland R.L. 1988; Gill P.G. 1991; Musgrove E.A. 1991]. En estas últimas ha sido demostrado un arresto de las células en fase G1 del ciclo celular.
- Una regulación negativa del RE por acción de la Pg fue reportada en líneas celulares de carcinoma mamario humano [Berkenstam A. 1989; Alexander I.E. 1990; Savoldi G. 1995] y ajusta con los datos presentados en este trabajo que señalan que las subpoblaciones celulares RE⁺ y RPg⁺, semejantes en porcentaje de células, superponen sólo parcialmente.

Este modelo permitiría explicar las características de crecimiento observadas en los distintos tipos de carcinoma mamario. En los tumores bien diferenciados $RE^+ RPg^+$, la expresión de RPg podría provocar una inhibición de la proliferación celular, determinando el lento crecimiento propio de este tipo de carcinomas. En segundo lugar, en los tumores $RE^+ RPg^-$, de diferenciación intermedia, las células stem podrían solamente avanzar un primer paso en la diferenciación, pero la ausencia de expresión de RPg determinaría una mayor tasa proliferativa. Tercero, en los tumores $RE^- RPg^-$ las células stem no estarían restringidas por la diferenciación y la proliferación celular no sería inhibida por acción de la progesterona, siendo entonces estos tumores los de crecimiento más agresivo.

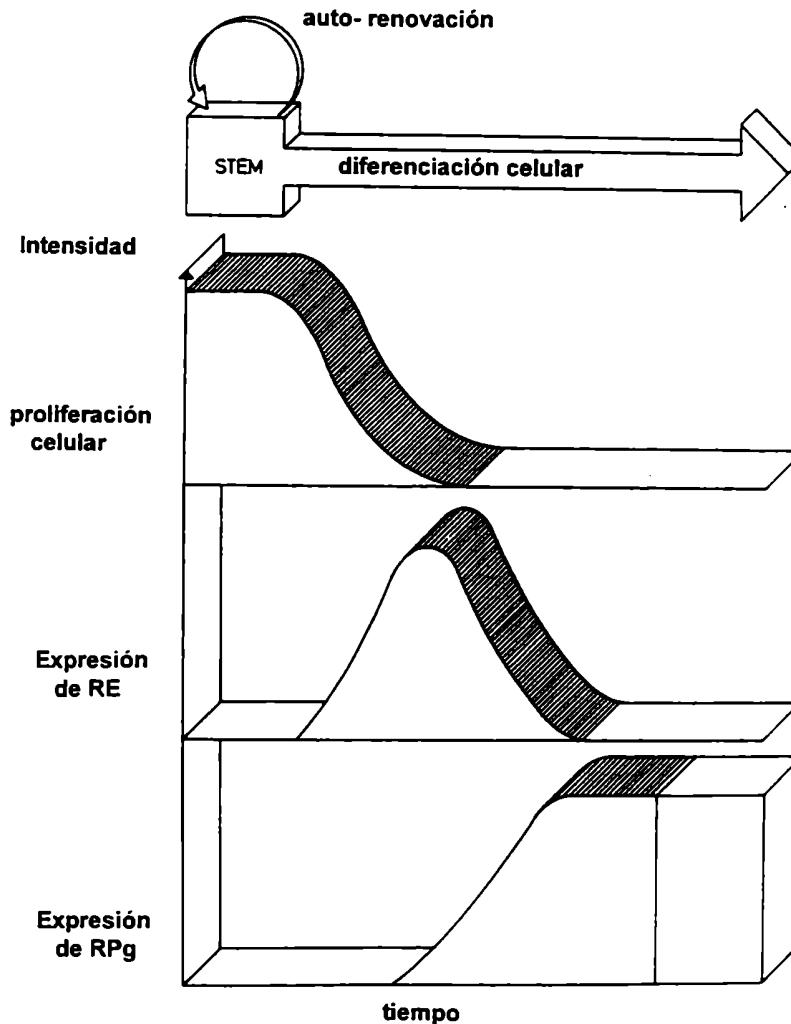


Figura 8: Representación esquemática de la expresión de RE y RPg durante la diferenciación celular en carcinomas mamarios humanos

Algunas consideraciones finales merecen ser discutidas.

- La escasa incorporación de [^3H] dT en las subpoblaciones celulares RE^+ y RPg^+ podría también atribuirse a que estos receptores estén ausentes en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, distintos estudios realizados en líneas celulares de carcinoma mamario humano han evaluado la expresión de RE y RPg a través del ciclo celular, y reportaron la presencia de ambos receptores durante las distintas fases del ciclo, y particularmente en fase S [Jakesz R. 1984; Cassanelli S. 1991, 1995].

- Los bajos TLIs obtenidos en este estudio son probablemente debidos a los tiempos cortos de incubación con [^3H] dT necesarios para evitar la desnaturalización del RE. Por otra parte, está descrito que el subgrupo de carcinomas mamarios $\text{RE}^+ \text{RPg}^+$ presenta la menor tasa de crecimiento [Vollmer G. 1989]. Sin embargo, esto no ha sido relevante en las conclusiones discutidas, dado que el interés de este trabajo estaba enfocado en la expresión de receptores hormonales por las células proliferantes más que en el TLI de los carcinomas mamarios. Además, como se demostró aquí, la expresión de receptores hormonales por las células proliferantes no se modificó con mayores tiempos de incubación.

- Los resultados presentados en este trabajo mostraron la existencia de variantes de RE con distinta estabilidad. En este punto sería necesario realizar mayores investigaciones para determinar el origen y posibles implicancias de estas variantes. Cabe mencionar que distintos autores reportaron una heterogeneidad molecular en el RE en células de tumores mamarios, caracterizada por la presencia de formas mutantes del receptor, y han analizado las consecuencias de dicha heterogeneidad en la respuesta a las terapias hormonales [Horwitz K.B. 1994; Fuqua S.A. 1991, 1992].

CAPÍTULO II

Expresión de Marcadores Tumoraes y Diferenciación Celular en Carcinoma de Mama Humano

INTRODUCCIÓN

Como se describió previamente en la Introducción General, los tumores sólidos son sistemas complejos en los cuales coexisten una variedad de tipos celulares, y la diferenciación constituye una de las fuentes de esta diversidad. Existen entonces en los carcinomas mamarios subpoblaciones celulares que difieren en cuanto a capacidad proliferativa y estadio de diferenciación. La caracterización fenotípica de estas subpoblaciones, aunque difícil de obtener en tumores sólidos, podría contribuir significativamente a la comprensión del comportamiento tumoral. La identificación de las células stem resulta de particular interés, ya que al ser éstas las responsables del crecimiento tumoral deberían ser el blanco esencial de las terapias antineoplásicas para lograr la erradicación del tumor. En los últimos años una variedad de marcadores tumorales fueron descritos en cáncer de mama humano y diversos AMC contra estos han sido desarrollados (Introducción General, secciones IV y VI); sin embargo, poco se conoce acerca de qué subpoblación celular expresa estos marcadores.

En la primera parte de este trabajo de Tesis (Capítulo I) se analizó la expresión de RE y RPg en carcinomas mamarios, pudiéndose determinar que estos receptores no están presentes en células stem, sino que se expresan durante la diferenciación celular. En dicho estudio se utilizó una técnica que permite la determinación simultánea de células en proliferación y la expresión de alguna molécula de interés. Se decidió entonces extender este análisis e **investigar la expresión de diversos marcadores tumorales con el objeto de identificar distintos estadios en el proceso de diferenciación celular. Se analizó para cada marcador, si su expresión estaba asociada a la diferenciación tumoral y de ser así, en que subpoblación celular estaba presente. A través de este estudio se buscó determinar si existe una secuencia regular de expresión de marcadores a lo largo del proceso de diferenciación celular.**

Se eligieron para esto una serie de marcadores asociados a carcinomas mamarios humanos cuya expresión no fluctuara durante el ciclo celular y para los cuales se hayan desarrollado AMC altamente específicos. Los marcadores analizados y los AMC utilizados para su reconocimiento fueron los siguientes:

a) PEM: Mucina Epitelial Polimórfica, reconocida por el AMC 436.

Las células del epitelio mamario humano presentan en su superficie apical una mucina de alto peso molecular, denominada PEM o episialina, codificada por el gen *MUC-1*, cuya expresión está regulada durante el desarrollo [ver Introducción General, sección IV]. La porción proteica central o “core” de PEM está constituida por un dominio extracitoplasmático formado por una secuencia de 20 aminoácidos repetida en *tandem* en número variable entre los distintos alelos (entre 21 y 125). Estas secuencias son ricas en serina y treonina que constituyen sitios potenciales de O-glicosilación. Además de esta región, la proteína “core” contiene un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático.

En los carcinomas mamaros esta glicoproteína se encuentra sobre-expresada y glicosilada en forma aberrante, exponiéndose epitopes normalmente crípticos en la región “core”, que resultan altamente inmunogénicos [Burchell J. 1987; Girling A. 1989; Brockhausen I. 1995]. La función de PEM y su posible rol en la progresión tumoral no han sido aún establecidos, pero distintos resultados señalan que la sobre-expresión de PEM tendría efectos antiadhesivos, disminuyendo la adhesión célula - célula y célula - matriz extracelular [Hilkens J. 1995].

El AMC 436 (IgM) fue desarrollado utilizando como inmunógeno un extracto celular (fracción enriquecida en membranas) preparado a partir de un conjunto de tumores metastásicos de carcinomas mamaros humanos (en ganglios linfáticos axilares). El epitope reconocido por este AMC fue identificado como una pequeña secuencia de aminoácidos en la unidad repetitiva del “core”: arg-pro-ala-pro. El AMC 436 reconoce carcinomas mamaros primarios y metastásicos, así como distintas líneas celulares de cáncer de mama, mientras que no reacciona con tejido mamario normal [Nuti M. 1992].

b) TAG-72: Glicoproteína Asociada a Tumor, reconocida por el AMC B72.3.

El AMC B72.3 (IgG1) ha sido desarrollado utilizando como inmunógeno la fracción de membranas celulares de un tumor metastásico de carcinoma mamario humano [Colcher D. 1981]. El antígeno reconocido por B72.3 fue caracterizado como una glicoproteína de alto peso molecular (> 200 000 daltons) con características de mucina [Johnson V.G. 1986] denominado TAG-72 (*tumor-associated glycoprotein*). El epitope reconocido por B72.3 corresponde a un carbohidrato localizado sobre este antígeno. TAG-72 se expresa

en carcinomas mamarios y en general en la mayoría de los carcinomas humanos incluyendo colon, pulmón, ovario, páncreas, gástrico y esófago; mientras que muy bajos o nulos niveles de expresión han sido detectados en tejidos normales. TAG-72 está presente también en tejidos fetales como colon, estómago y esófago, siendo entonces considerado un antígeno oncofetal [Thor A. 1986].

El AMC B72.3 ha sido administrado a pacientes, demostrando ser altamente eficiente en radiolocalizar carcinomas primarios y focos metastásicos [Colcher D. 1987; Esteban J.M. 1987; Doerr R.J. 1991; Gallinger S. 1993]. En vista de la reactividad selectiva de B72.3 hacia carcinomas, una serie de AMC de segunda generación contra TAG-72, como CC49, fueron desarrollados [Muraro R. 1988; Gallinger S. 1993].

c) CEA: Antígeno Carcinoembrionario, reconocido por el AMC COL-12.

CEA es una glicoproteína de membrana plasmática de 180 kDa y, como se mencionó en la Introducción General (sección IV), es uno de los marcadores tumorales humanos de mayor importancia clínica. Originalmente fue descrito como un antígeno tumoral presente en carcinomas de colon [Gold P. 1965 (1)]. Elevados niveles de CEA han sido detectados también durante el desarrollo embrionario en mucosa del tracto gastrointestinal [Gold P. 1965 (2)] siendo entonces considerado un antígeno oncofetal. Posteriormente se observó que su expresión estaba aumentada en la mayoría de los cánceres gastrointestinales, así como en carcinomas de mama y pulmón [Thompson J.A., 1991; Robbins P.F. 1993].

El CEA se encuentra anclado a la membrana plasmática a través de glicosil fosfatidilinositol. Distintos estudios han revelado que pertenece a un grupo de glicoproteínas estrechamente relacionadas que constituyen una familia génica, que a su vez pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas [Khan W.N. 1992; Thompson J.A. 1995]. Aproximadamente 30 genes han sido descritos en la familia de CEA, todos ellos codificados en el cromosoma 19 humano. Al igual que otros miembros de esta familia, CEA está involucrado en fenómenos de reconocimiento celular, particularmente media adhesión intercelular homofílica y heterofílica [Benchimol S. 1989; Oikawa S, 1989].

Un gran número de AMCs anti-CEA han sido generados, muchos de los cuales poseen alta reacción cruzada con antígenos de la misma familia. Diversos anticuerpos fueron estudiados simultáneamente y agrupados según su reactividad, pudiéndose así definir

distintos epitopes en la molécula de CEA [Nap M. 1992]. En este estudio se utilizó el AMC COL-12 (IgG1) [Muraro R. 1985]. Este AMC fue generado utilizando como inmunógeno la fracción enriquecida en membranas celulares de carcinoma humano de colon y su reactividad probó ser altamente específica hacia CEA. COL-12 reconoce un epítipo de naturaleza peptídica presente en la molécula de CEA y no compartido con otros miembros de la familia.

d) NCA-90: Antígeno no específico de reacción cruzada - 90 kDa, reconocido por el AMC B6.2 .

Numerosas glicoproteínas han sido descritas en la familia de CEA con alta homología entre sí. La primera en ser identificada fue un antígeno de alta reacción cruzada con CEA presente en diversos tejidos normales y en carcinomas de distinto origen, al que se denominó NCA (*nonspecific cross-reacting antigen*) [von Kleist S. 1972]. Posteriormente se comprobó que existían múltiples formas de NCA con distintos pesos moleculares y que se expresaban diferencialmente en distintos tejidos. El clonado molecular de diversos genes de la familia del CEA [Thompson J.A. 1991] ha permitido la identificación de al menos dos genes codificantes para NCAs: NCA 50/90 y NCA 95. NCA 50/90 codifica para varias formas previamente descritas como NCA, NCA-50, NCA-90, NCA-55 y TEX [Barnett T. 1988; Hefta S.A. 1990]. Éstas comparten idéntica secuencia peptídica, pero difieren marcadamente en su contenido de carbohidratos y por lo tanto en su peso molecular. NCA-95 en cambio, es producto de un gen diferente y se expresaría sólo en granulocitos [Arakawa F. 1990].

En este estudio se analizó la expresión de NCA-90. Esta glicoproteína se encuentra presente en carcinomas de mama, colon y pulmón (tanto en tumor como en plasma), y en granulocitos normales [Robins P.F. 1993; Allard W.J. 1994; Audette M. 1987]. Al igual que CEA, NCA participa en procesos de reconocimiento celular, mediando adhesión intercelular homofílica y heterofílica [Oikawa S. 1989].

Existen actualmente numerosos AMC que reconocen NCA-90. Muchos de ellos fueron originalmente seleccionados como AMC anti-CEA y reaccionan en forma cruzada con el NCA, dada la alta homología entre estas moléculas. En este estudio se utilizó el AMC B6.2 (IgG1). Este AMC fue generado utilizando como inmunógeno la fracción de membranas de células de un tumor metastásico de carcinoma mamario humano y

demonstró reconocer específicamente un epítope proteico en el NCA-90 y no tener reacción cruzada con CEA [Colcher D. 1981; Kufe D.W. 1983; Robbins P.F. 1993].

e) **CaMBr1**, reconocido por el **AMC MBr1**.

EL AMC MBr1 (IgM) fue desarrollado inmunizando ratones BALB/c con membranas celulares provenientes de una línea celular de carcinoma mamario humano: MCF-7.

Este AMC reconoce un antígeno (CaMBr1) expresado en membrana plasmática de células de carcinoma de mama y epitelio mamario normal [Ménard S. 1983]. El epítope específico contra el cual está dirigido corresponde a un carbohidrato y se encuentra formando parte de distintos glicoconjugados. Si bien MBr1 reconoce este epítope tanto en glicoproteínas como en glicolípidos, tiene preferencial reactividad con glicolípidos [Canevari S. 1983; Bremer E.G. 1984; Viale G. 1989]. Como se mencionó en la Introducción General, en las células cancerosas ocurren frecuentemente alteraciones en la glicosilación de diversos glicoconjugados, determinando la aparición de moléculas anormales que pueden servir como marcadores tumorales. En el caso del MBr1, si bien el epítope sacarídico reconocido por este AMC está presente tanto en tejidos normales como en carcinomas, el patrón de glicosilación no es el mismo. En tejido mamario normal en reposo, al igual que en tumores benignos, este epítope sólo se presenta unido a proteínas; mientras que en carcinomas se encuentra formando parte de glicoproteínas y glicolípidos [Miotti S. 1989].

El AMC MBr1 ha sido acoplado a toxinas, obteniéndose distintos inmunocombinados con propósitos terapéuticos [Orlandi R. 1988]. Por otra parte un anticuerpo quimérico (murino/humano) ha sido generado, con capacidad de mediar reacciones de citotoxicidad celular (ADCC) y lisis por complemento [Orlandi R. 1992].

f) **RE y RPg**.

Se evaluó también la presencia de RE y RPg tal cual fue descripto en el **Capítulo I**, con la idea de correlacionar la expresión de estos receptores con la presencia de los restantes marcadores estudiados.

g) Fueron incluidos también AMC desarrollados en nuestro laboratorio contra carcinoma mamario humano. En un trabajo paralelo llevado a cabo en este laboratorio se buscó

generar AMC que reconozcan antígenos expresados por las células “stem”, inmunizándose ratones Balb/c con células provenientes de un carcinoma de mama humano altamente indiferenciado. Los AMC obtenidos fueron analizados y seleccionados en cuanto a su reactividad y especificidad de reconocimiento, estudiándose su reacción con carcinoma mamario y otras neoplasias, patologías benignas, como así también distintos tejidos humanos normales. Aquellos que resultaron seleccionados se incluyeron en este estudio, investigándose entonces si reconocían antígenos expresados por células proliferantes o por subpoblaciones celulares en vías de diferenciación. En este trabajo de tesis se presentan solamente los datos correspondientes a uno de estos AMC, FC-2.15 (IgM), cuya reactividad demostró ser particularmente interesante. FC-2.15 reconoció carcinomas mamarios humanos independientemente de su tipo histológico y contenido de receptores hormonales, mientras que no reconoció tejido mamario normal. La positividad se observó principalmente en citoplasma y membrana plasmática. FC-2.15 dio reacción positiva también con otras neoplasias tales como algunos carcinomas de colon, carcinomas escamosos, etc. Cuando distintos tejidos normales fueron testeados una fuerte reactividad fue observada con granulocitos perisféricos y progenie mieloide de médula ósea.

Con este panel de AMC se estudió la expresión de los distintos marcadores sobre muestras tumorales obtenidas a partir de carcinomas mamarios humanos. Los resultados obtenidos, presentados a continuación, permitieron establecer una secuencia de expresión de marcadores a medida que disminuye capacidad proliferativa y progresa la diferenciación celular.

RESULTADOS

1.- Expresión de marcadores tumorales en cáncer de mama. Asociación con el grado de diferenciación tumoral

El propósito de este experimento fue investigar si la expresión de una serie de marcadores tumorales de carcinoma mamario está asociada al grado de diferenciación del tumor. Para esto se analizaron muestras tumorales provenientes de veintiocho pacientes con carcinoma primario de mama sometidos a tumorectomía o mastectomía. Los datos clínicos relevantes de dichos pacientes y características histopatológicas de sus tumores se presentan en la **Tabla 5**.

Sobre cortes histológicos secuenciales de cada tumor obtenidos en crióstato, se estudió la expresión de distintos marcadores por inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos (sección 1.4) con los siguientes AMC: **COL-12** (anti-CEA); **B6.2** (anti-NCA-90); **MBr1** (anti-CaMBr1); **436** (anti-PEM); **B72.3** (anti-TAG-72) y **FC-2.15** (anti-Ag 2.15). Se evaluó en cada tumor el porcentaje de células que daban reacción positiva con cada uno de los AMC. Paralelamente, en cortes de tejido de los mismos tumores se determinó la expresión de RE y RPg con los AMC correspondientes tal como se describió en el Capítulo I (Materiales y Métodos, sección 1.3).

Con el objeto de analizar si la expresión de dichos marcadores varía de acuerdo a la diferenciación tumoral, los tumores fueron agrupados en tres categorías según su grado de diferenciación, de acuerdo a la clasificación de Bloom y Richardson (Introducción General, sección 1.A.2): grado I (tumores bien diferenciados), grado II (diferenciación intermedia) y grado III (tumores altamente indiferenciados). Se determinó entonces, en cada grupo, el porcentaje promedio de células positivas para cada AMC y los resultados se muestran en la **Figura 9**. Como puede observarse, la expresión de CEA, NCA-90, TAG-72, CaMBr1, RE y RPg fue marcadamente menor en los tumores grado III que en los tumores grado I. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de acuerdo al test de Mann-Whitney (GraphPad Software Inc.). Por el contrario, no se observó diferencia significativa en la expresión de los marcadores PEM y Ag 2.15 entre tumores con distinto grado de diferenciación. Estos marcadores fueron expresados en un alto porcentaje de células en todos los tumores analizados, independientemente de la diferenciación tumoral.

Tabla 5: Datos clínicos y análisis histopatológico

Paciente	Estadío clínico	Status menopáusico	Tipo histológico	Grado de diferenciación
1. GM	III b	Post	Lobulillar infiltrante	I
2. GR	II b	Post	Lobulillar infiltrante	I
3. AM	I	Post	Lobulillar infiltrante	I
4. VR	III a	Pre	Lobulillar infiltrante	I
5. BN	III	Post	Lobulillar infiltrante	I
6. MA	III a	Post	Lobulillar infiltrante	I
7. MR	III	Post	Lobulillar infiltrante	I
8. BM	III b	Post	Ductal infiltrante, NOS	I
9. CD	II a	Pre	Ductal infiltrante, NOS	I
10. VV	III a	Post	Tubular	I
11. RA	I	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
12. VA	III a	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
13. LG	III b	Pre	Ductal infiltrante, NOS	II
14. AA	I	- (Hombre)	Ductal infiltrante, NOS	II
15. KE	III a	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
16. BB	III b	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
17. FN	I	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
18. GN	III b	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
19. OH	III a	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
20. GJ	III b	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
21. CR	III a	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
22. PM	III b	Pre	Ductal infiltrante, NOS	II
23. AY	III a	Post	Ductal infiltrante, NOS	II
24. GS	III a	Post	Medular	III
25. DN	III a	Pre	Ductal infiltrante, NOS	III
26. ED	II b	Post	Ductal infiltrante, NOS	III
27. RO	III a	Post	Ductal infiltrante, NOS	III
28. NN	II	Post	Ductal infiltrante, NOS	III

El análisis histopatológico fue realizado por las Dras. A.I. Bravo e I. Sorín del Servicio de Patología del Hospital Castex. Los sistemas de clasificación utilizados figuran en Materiales y Métodos

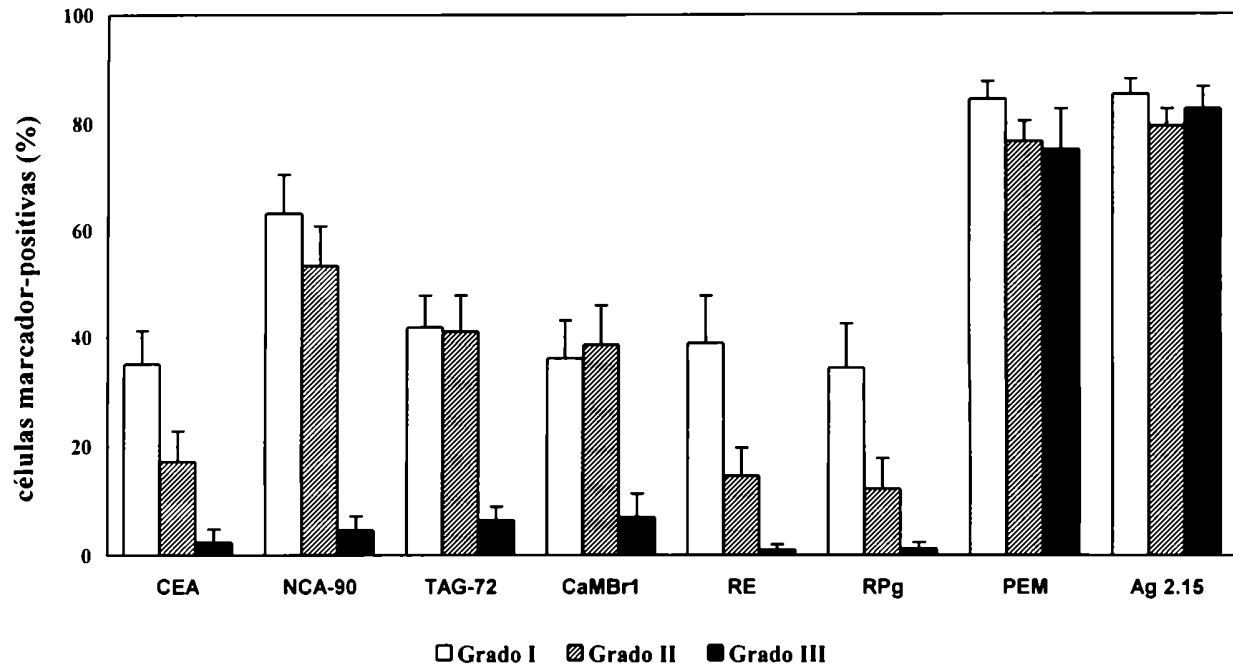


Figura 9. Expresión de marcadores de acuerdo a la diferenciación tumoral.

El porcentaje de células positivas para los distintos marcadores fue determinado en cada tumor por inmunohistoquímica según se describe en Materiales y Métodos. Se evaluaron más de 3000 células por corte histológico y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los tumores fueron agrupados según su grado de diferenciación (grado I, II y III - **Tabla 5**) y en cada grupo se calculó el porcentaje promedio de células positivas para los distintos marcadores (media \pm SEM).

2- Expresión de marcadores y proliferación celular

Los resultados reportados en la sección anterior mostraron una relación directa entre la expresión de diversos marcadores y el grado de diferenciación tumoral. Esto nos condujo a investigar si existía un patrón regular de expresión de marcadores a través de la diferenciación celular. Para este propósito debía establecerse un punto de partida en el proceso de la diferenciación, y operativamente las células proliferantes fueron definidas como aquellas correspondientes al estadio de diferenciación más temprano.

Se analizó entonces si las células en proliferación presentan los marcadores tumorales estudiados, o si éstos se expresan en células más diferenciadas, con disminuida o nula capacidad de dividirse. Para esto, fragmentos correspondientes a cada tumor se incubaron 30 minutos en presencia de [3 H] dT, se realizaron cortes histológicos y se determinó sobre el mismo preparado: a) expresión de marcadores por inmunohistoquímica con los AMC

específicos, y b) presencia de células en fase S del ciclo celular por autoradiografía (Materiales y Métodos, sección 1. 6). La figura 10 muestra tumores en los cuales se analizó simultáneamente la duplicación del ADN y la expresión de marcadores; como se observa se distingue claramente la incorporación de [³H] dT en las subpoblaciones celulares AMC-positivas y AMC-negativas.

En cada tumor se analizaron las células que incorporan [³H] dT, calculándose qué porcentaje de las mismas expresa cada marcador. Los resultados se presentan en la tabla 6 donde figuran los valores promedio de los 28 tumores analizados (media ± SEM). Puede observarse que, aquellos marcadores que según los datos presentados en la Figura 9 estaban asociados a la diferenciación tumoral (NCA-90, RE, RPg, CaMBr1, TAG-72 y CEA), fueron expresados por una baja proporción de células proliferantes, variando en un rango de 39,9 % (NCA-90) a 3 % (CEA). Por el contrario la mayoría de las células que incorporaron [³H] dT fueron Ag 2.15⁺ y PEM⁺.

En base a estos resultados puede definirse una secuencia de expresión de estos marcadores a medida que decrece la proliferación celular: 1°) Ag 2.15; 2°) PEM; 3°) NCA-90; 4°) RE; 5°) RPg - TAG-72 - CaMBr1 y 6°) CEA. Cuando el test de Mann-Whitney fue utilizado para comparar la expresión de estos marcadores en células proliferantes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,05$) excepto entre RPg, TAG-72 y CaMBr1.

Sin embargo, podría plantearse una interpretación alternativa. La baja expresión de un marcador por células en proliferación puede deberse a que éste se expresa solamente en una pequeña subpoblación de células, y no a que lo hace en forma tardía en la diferenciación celular. Para analizar la capacidad proliferativa de las distintas subpoblaciones celulares marcador-positivas independizándonos del tamaño de la subpoblación, se midió el TLI de cada una de ellas y los resultados se muestran en la figura 11. Como se observa, el mayor TLI correspondió a las células Ag 2.15⁺, siendo progresivamente menor para las restantes subpoblaciones. La capacidad proliferativa de las células RPg⁺, TAG-72⁺ y CaMBr1⁺ fue semejante, mientras que resultó ser mínima para la subpoblación celular CEA⁺. Confirmando resultados previos reportados en el Capítulo I, el TLI promedio de las células RE⁺ fue bajo, pero el doble del de las células RPg⁺.

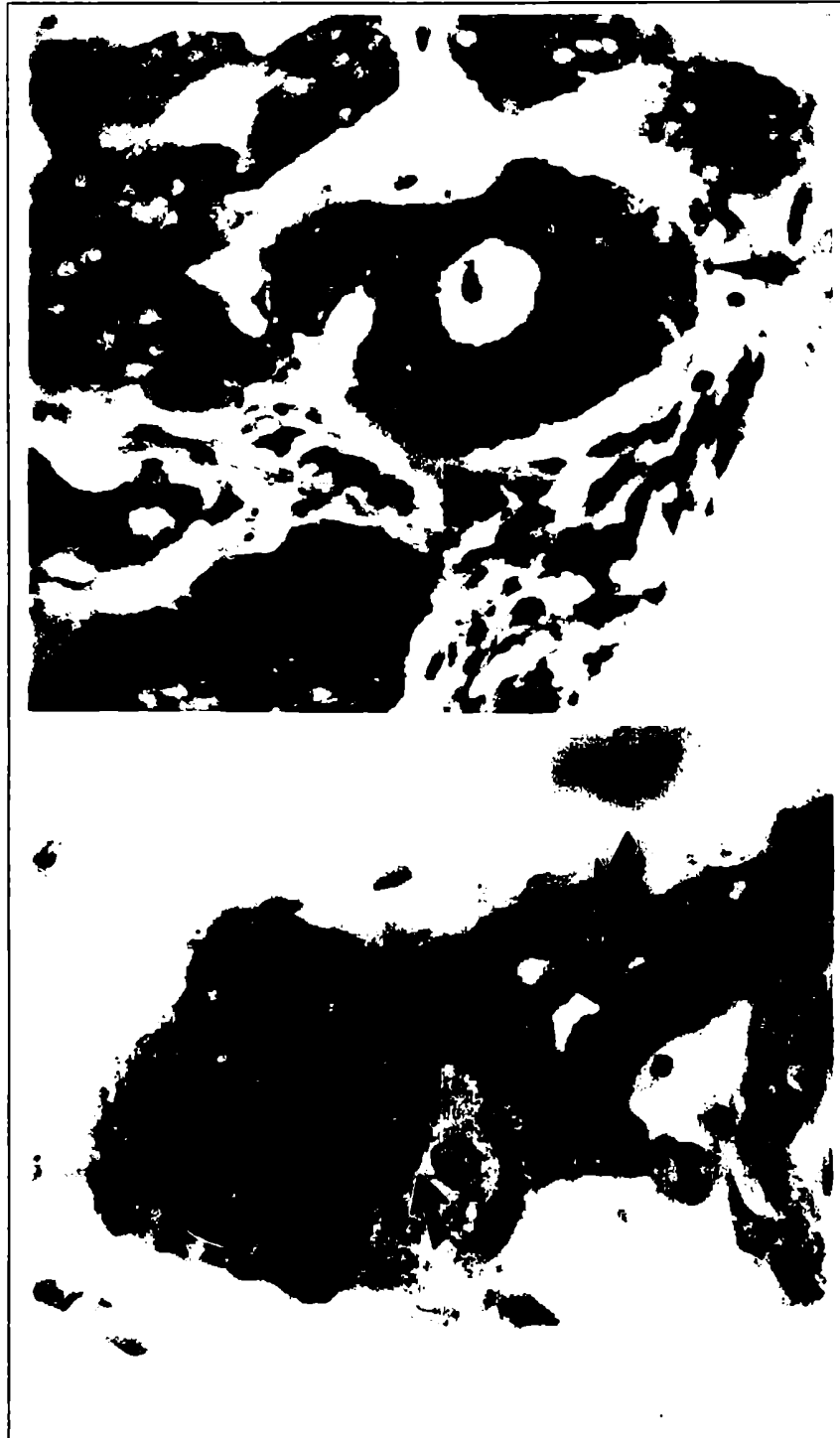


Figura 10. Expresión de marcadores tumorales en células que incorporan [³H] dT.

Las muestras tumorales fueron incubadas en presencia de [³H] dT y sobre cortes histológicos se determinó simultáneamente: expresión de un marcador tumoral por inmunohistoquímica y células en proceso de replicación del ADN por autoradiografía según se describe en Materiales y Métodos.

A: células proliferantes Ag 2.15⁺ (630 x); **B:** células proliferantes PEM⁺ y PEM⁻ (1000 x).

Estos resultados fueron consistentes con la hipótesis de la existencia de una secuencia regular de expresión de marcadores a medida que disminuye la capacidad proliferativa y progresa la diferenciación celular.

Marcador	Células que incorporan [³ H] dT marcador-positivas (%) *	N
Ag 2.15	91,3 ± 2,0	27
PEM	64,7 ± 4,1	28
NCA-90	39,9 ± 4,2	26
RE	27,1 ± 4,8	15
RPg	14,8 ± 3,6	14
CaMBr1	13,5 ± 2,9	23
TAG-72	13,6 ± 2,6	26
CEA	3,0 ± 1,4	20

Tabla 6: Expresión de marcadores tumorales en células proliferantes.

Sobre muestras tumorales incubadas con [³H] dT se evaluaron las células en proliferación (fase S) y la expresión de los distintos marcadores como se describió en Materiales y Métodos (sección 1.6), calculándose la proporción de células proliferantes que expresan un determinado marcador. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se evaluó un mínimo de 3500 células por corte histológico. El número total de células que incorporan [³H] dT fue definido como el 100 %. N: N° de tumores evaluados. Para cada marcador fueron excluidos del análisis los tumores negativos (0 % células positivas) para la expresión del mismo.

* : media ± SEM.

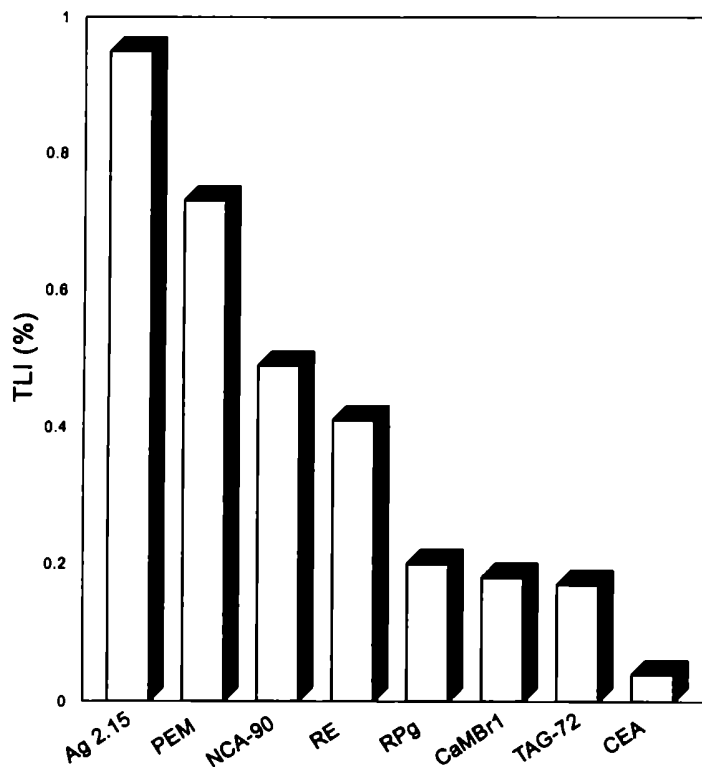


Figura 11. TLI de las subpoblaciones celulares marcador - positivas.
 En cada tumor se evaluó el TLI de las distintas subpoblaciones celulares marcador-positivas como se describe en Materiales y Métodos. La figura muestra los valores promedio de los 28 tumores analizados.

Cabe mencionar que, previamente al análisis simultáneo de expresión de marcadores tumorales y proliferación celular, se verificó la estabilidad de los distintos marcadores cuando los fragmentos tumorales eran incubados por 30 minutos a 37°C en MEM más 10 % FBS en presencia de [³H] dT, tal como fue referido para RE y RPg en el Capítulo I (Resultados, sección 3). Para esto, se determinó la expresión de los distintos marcadores (Ag 2.15, PEM, NCA-90, TAG-72, CaMBr1 y CEA) en fragmentos de tejido congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de la cirugía y en los incubados con [³H] dT por 30 minutos. En todos los casos se verificó que no hubiese diferencias significativas entre ambas determinaciones. Todos los marcadores analizados demostraron ser altamente estables bajo estas condiciones experimentales (datos no mostrados).

3- Coexpresión de marcadores tumorales

Con el objeto de determinar si los marcadores tumorales estudiados son expresados progresivamente a través de una secuencia única, o si por el contrario corresponden a vías de diferenciación alternativas, se investigó la expresión simultánea de marcadores en las mismas células. Para esto se realizaron doble-inmunohistoquímicas analizándose la coexpresión de RPg y los otros marcadores tal como se describe en materiales y métodos (sección 1.5). RPg fue elegido como marcador de referencia aprovechando su diferente localización subcelular (nuclear) y el distinto origen de su AMC (rata vs. ratón) que permite revelarlo con un anticuerpo secundario diferente.

Se utilizaron cortes histológicos obtenidos a partir de 2 tumores, ambos RPg⁺: # 10. VV (50% de células RPg⁺) y # 8. BM (52% células RPg⁺). Se calculó la proporción de células RPg⁺ (núcleos teñidos de marrón) que expresan también otro marcador (citoplasma y/o membrana teñidos de rojo) y los resultados se presentan en la **tabla 7**. Como puede observarse, la mayoría de las células RPg⁺ coexpresa los distintos marcadores analizados. Más de un 80 % de las células que presentan RPg son también TAG-72⁺ y CaMBr1⁺. Este resultado, sumado a los reportados en la sección anterior, indicaría que estos 3 marcadores se expresan a un mismo tiempo en el proceso de diferenciación y en la misma subpoblación celular.

Casi la totalidad de las células RPg⁺ coexpresa Ag 2.15 y PEM, sugiriendo que, si bien estos marcadores se expresan en forma temprana (tabla 6 y figura 11), se mantendrían presentes aún en subpoblaciones más diferenciadas, con escasa capacidad proliferativa.

Los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis que los marcadores analizados son expresados en una vía común de diferenciación celular.

Marcador	Células RPg ⁺ Marcador-Positivas (%)	
	Tumor	
	#10.VV	#8.BM
Ag 2.15	96	99
PEM	98	100
NCA-90	72	58
TAG-72	82	81
CaMBr1	98	98
CEA	74	77

Tabla 7: Coexpresión de marcadores tumorales.

Sobre cortes histológicos provenientes de 2 tumores (#10.VV y #8.BM) se analizó la coexpresión de RPg y distintos marcadores a través de doble-inmunoquímicas como se describió en Materiales y Métodos (sección 1.5). Se calculó la proporción de células RPg⁺ que expresa un determinado marcador. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se evaluó un mínimo de 3000 células por corte histológico. El número total de células RPg⁺ fue definido como el 100 %.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la expresión de diversos marcadores tumorales asociados a carcinoma mamario humano con el objeto de identificar distintos estadios en el proceso de diferenciación celular. Para esto se seleccionaron una serie de marcadores conocidos contra los cuales se han desarrollado AMC específicos y se buscó identificar las subpoblaciones celulares que expresan dichas moléculas e investigar la capacidad proliferativa de las mismas. Se incluyeron también diversos AMC obtenidos en nuestro laboratorio, que si bien reconocían antígenos aún no caracterizados, eran altamente reactivos contra carcinoma mamario humano. De estos últimos, sólo se presentan en este trabajo de Tesis los datos correspondientes al AMC FC-2.15 (anti-Ag 2.15), el cual presentó características especialmente interesantes.

Los resultados obtenidos mostraron que tumores diferenciados e indiferenciados presentan un patrón distinto de expresión de los marcadores analizados. Ag 2.15 y PEM fueron expresados por la mayoría de las células tumorales en los distintos carcinomas mamarios, independientemente de su grado de diferenciación. En contraste, la presencia de CEA, NCA-90, TAG-72 y CaMBr1 correlacionó positivamente con la diferenciación tumoral. Éstos estuvieron ausentes o muy pobremente expresados en tumores indiferenciados (grado III); mientras que se expresaron, aunque en distinta magnitud, en tumores grado I y II. Confirmando resultados previos [Spyratos F. 1992], la presencia de RE y RPg también estuvo asociada a la diferenciación tumoral.

Cuando la capacidad proliferativa de las distintas subpoblaciones celulares marcador - positivas fue investigada, se observaron amplias diferencias en los respectivos TLIs, siendo este valor máximo para la subpoblación Ag 2.15⁺. Las células proliferantes expresaron en su mayoría Ag 2.15 (91,3 %) y PEM (64,7 %), y en menor grado aquellos marcadores asociados a la diferenciación celular.

La evaluación simultánea de RPg y cada una de las restantes moléculas analizadas demostró que la mayoría de las células RPg⁺ coexpresa Ag 2.15, PEM, NCA-90, TAG-72, CaMBr1 y CEA. Por otra parte, resultados presentados en el capítulo I mostraron también coexpresión de RE y RPg en las mismas células. Estos datos apoyan la idea de la existencia de una vía común de expresión de estos marcadores a medida que progresa la diferenciación celular.

En base a los resultados presentados en este estudio puede proponerse el siguiente modelo:

- Ag 2.15 y PEM serían expresados constitutivamente en carcinomas mamarios humanos. Estos marcadores comenzarían a sintetizarse muy temprano en el proceso de diferenciación celular puesto que están presentes en la mayoría de las células proliferantes. Su expresión se mantendría a través de todo el proceso de diferenciación, de ahí que se encuentren en más del 75 % de las células neoplásicas independientemente del grado de diferenciación tumoral, e incluso sean coexpresados en la subpoblación celular RPg⁺, de baja capacidad proliferativa.

- Los restantes marcadores analizados, expresados casi exclusivamente en tumores grado I y II, aparecerían progresivamente a medida que avanza la diferenciación celular, pudiendo definirse una secuencia en base a la capacidad proliferativa de las distintas subpoblaciones marcador-positivas: NCA-90 \Rightarrow RE \Rightarrow RPg / TAG-72 / CaMBr1 \Rightarrow CEA. Células en estadios avanzados de diferenciación podrían coexpresar diversos marcadores, como se observa en los resultados reportados en la tabla 7. La expresión de RPg, TAG-72 y CaMBr1 correspondería a un mismo estadio puesto que las subpoblaciones celulares positivas para estos marcadores presentan TLIs semejantes y más del 80 % de las células RPg⁺ coexpresan TAG-72 y CaMBr1. Finalmente, CEA sería el más tardío de los marcadores estudiados, presente en células ya diferenciadas con muy baja capacidad de proliferación.

Este modelo concuerda con datos reportados por Contegiacomo A. y col. [1991] quienes encontraron dos fenotipos definidos en carcinomas mamarios humanos: uno de ellos caracterizado por una alta actividad proliferativa determinada mediante el TLI, e inmunoreactividad negativa con AMC anti-CEA y anti-TAG-72; y el otro con baja actividad proliferativa e intensa positividad para estos marcadores. Por otra parte, y también en concordancia con los resultados aquí presentados, en un estudio realizado sobre 950 muestras tumorales de carcinoma mamario se cuantificaron diversas proteínas demostrándose una fuerte asociación positiva entre CEA, RE y RPg [Levesque M.A. 1994].

Es de mencionar que en este estudio se analizaron también otros marcadores, cuya expresión no resultó estar relacionada con el proceso de diferenciación. Dichos marcadores no se reportan en este trabajo de Tesis. Este es el caso por ejemplo de la glicoproteína P (Pgp) o P-170. Pgp es una glicoproteína de membrana celular de 170 kDa, producto del gen *mdr1*. Ésta actúa como bomba transportadora de drogas dependiente de energía, impidiendo la acumulación intracelular de diferentes drogas citotóxicas [Mc Clean S. 1992; Fairchild C. 1987; Gottesman M.M. 1993; Salmon S. 1989]. Su sobre-expresión en ciertas células tumorales constituye uno de los principales mecanismos de resistencia múltiple a drogas comúnmente utilizadas en quimioterapia (fenotipo MDR). Cuando la presencia de esta glicoproteína fue investigada en este estudio, se observó que su expresión variaba ampliamente entre los distintos tumores; sin embargo esta fluctuación no estuvo asociada a

la diferenciación tumoral [% células positivas (media \pm SEM): 33,6 \pm 8,3 % para tumores grado I; 51,5 \pm 10,6 % para tumores grado II; 20,4 \pm 9,7 % para tumores grado III]. Puesto que la presencia de Pgp dependía de otros factores y no correspondía a un estadio del proceso de diferenciación, dicha proteína no fue incluida en este trabajo.

Diferentes estrategias han sido desarrolladas para el uso terapéutico de AMC que reconozcan antígenos presentes en la superficie de células tumorales: el uso de AMC no conjugados o su unión a radioisótopos, drogas quimioterapéuticas o toxinas. El modelo propuesto en este trabajo sugiere que AMC dirigidos contra marcadores expresados en forma constitutiva, tendrían mayor impacto terapéutico que aquellos dirigidos contra marcadores presentes solamente en células en vías de diferenciación. Los primeros podrían reconocer células en los distintos estadios, incluso aquellas indiferenciadas y de alta capacidad proliferativa. En este sentido, se trabajó especialmente en la caracterización del AMC FC-2.15, su reactividad y propiedades citotóxicas. Los resultados obtenidos se presentan y discuten en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO III

Propiedades Funcionales del AMC FC-2.15

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres, afectando en la actualidad aproximadamente a una de cada nueve [Lippman M.E. 1993], y luego del cáncer de pulmón es también el más letal [Marshall E. 1993]. Pese a los enormes progresos realizados en la detección y tratamiento de los carcinomas mamarios localizados, la sobrevivencia de las pacientes con cáncer de mama metastásico no ha aumentado significativamente en los últimos quince años [Marshall E. 1992, 1993] evidenciando la necesidad de desarrollar distintos enfoques terapéuticos.

La inmunoterapia con AMC que reconozcan específicamente antígenos asociados a tumor podría permitir una acción selectiva sobre las células neoplásicas. En los últimos años se han realizado diversos ensayos clínicos usando AMC en la terapia del cáncer. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos llevados a cabo en pacientes con tumores sólidos han producido resultados modestos, sin que se evidencie un patrón consistente de respuesta o importantes mejoras en la sobrevivencia [LoBuglio A. 1988; Bajorin D. 1990; Saleh M. 1992, 1993], y sólo recientemente algunos reportes alentadores comienzan a aparecer [Riethmüller G. 1994; George A. 1994]. Algunas causas argumentadas frecuentemente para explicar estas fallas terapéuticas han sido la heterogeneidad en la expresión de antígenos en las células tumorales y la unión del AMC a antígenos irrelevantes.

Con la idea de obtener AMC que reconozcan antígenos expresados en células stem de carcinoma mamario, en nuestro laboratorio se inmunizaron ratones Balb/c con células obtenidas de un carcinoma de mama humano altamente indiferenciado. Como se describe en el capítulo anterior uno de los AMC obtenidos, FC-2.15, reconoció carcinomas mamarios humanos independientemente de su tipo histológico y grado de diferenciación. Los resultados mostraron que el Ag 2.15 se expresa muy temprano en el proceso de diferenciación celular y está presente en la gran mayoría de las células tumorales, incluyendo el 91,3 % de las células proliferantes. Trabajos paralelos de caracterización del Ag 2.15 realizados en nuestro laboratorio [Mordoh J. 1994] han demostrado que el epítipo reconocido por FC-2.15 es un carbohidrato común a tres glicoproteínas de membrana presentes en la superficie de células de carcinomas mamarios humanos (160,

130 y 115 kDa). Así mismo, se observó que FC-2.15 reacciona con tres glicoproteínas de la membrana celular de granulocitos humanos normales (250, 185 y 105 kDa).

En esta etapa del trabajo se estudiaron las propiedades funcionales del AMC FC-2.15. Se investigó en particular su capacidad de mediar reacciones citotóxicas contra células Ag 2.15⁺, ya sea en forma directa, a través de fijación de complemento o de células efectoras. Se evaluaron también las características de la unión FC-2.15-Ag 2.15 (afinidad, número de sitios antigénicos por célula) y la endocitosis de FC-2.15 por la célula blanco, ya que estas propiedades son importantes en la determinación del modo óptimo de utilización del AMC. Para este propósito se utilizaron células obtenidas a partir de tumores primarios de mama humanos, como así también líneas celulares de carcinoma mamario humano que expresan Ag 2.15 en su membrana (células MCF-7) y Ag 2.15-negativas (células IIB-BR-G).

RESULTADOS

1.- Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) FC-2.15 dependiente:

Con el objeto de investigar la capacidad del AMC FC-2.15 de mediar efectos citotóxicos en presencia de complemento humano contra células que expresan Ag 2.15, se utilizó un ensayo de liberación de [⁵¹Cr] (Materiales y Métodos, sección 2.4). Para ésto células MCF-7 fueron marcadas con [⁵¹Cr] y posteriormente incubadas a 37°C por distintos intervalos de tiempo con 1, 5, 10, 25 y 50 µg/ml FC-2.15 en DMEM, en presencia de suero humano como fuente de complemento. Finalizado el período de incubación se cuantificó la radioactividad en los sobrenadantes y se calculó el porcentaje de citólisis específica.

La figura 12 muestra los resultados obtenidos. Puede observarse que FC-2.15 ejerce un potente efecto citotóxico contra células MCF-7 en presencia de suero humano. La máxima citotoxicidad se alcanzó con 25 µg/ml FC-2.15 y 90 minutos de incubación (media ± SD: 100,0 ± 11,3 % lisis), pero una importante citólisis fue obtenida aún a la menor concentración de FC-2.15 testada (1 µg/ml) luego de 30 minutos de incubación (59,7 ± 2,1 %). La citotoxicidad fue menor al 20 % en ausencia de FC-2.15 y fue nula cuando se omitió el suero humano. La figura muestra valores promedio de 2 experimentos, cada uno

de los cuales se realizó por triplicado. La desviación standard de los datos fue en todos los casos menor al 12 %.

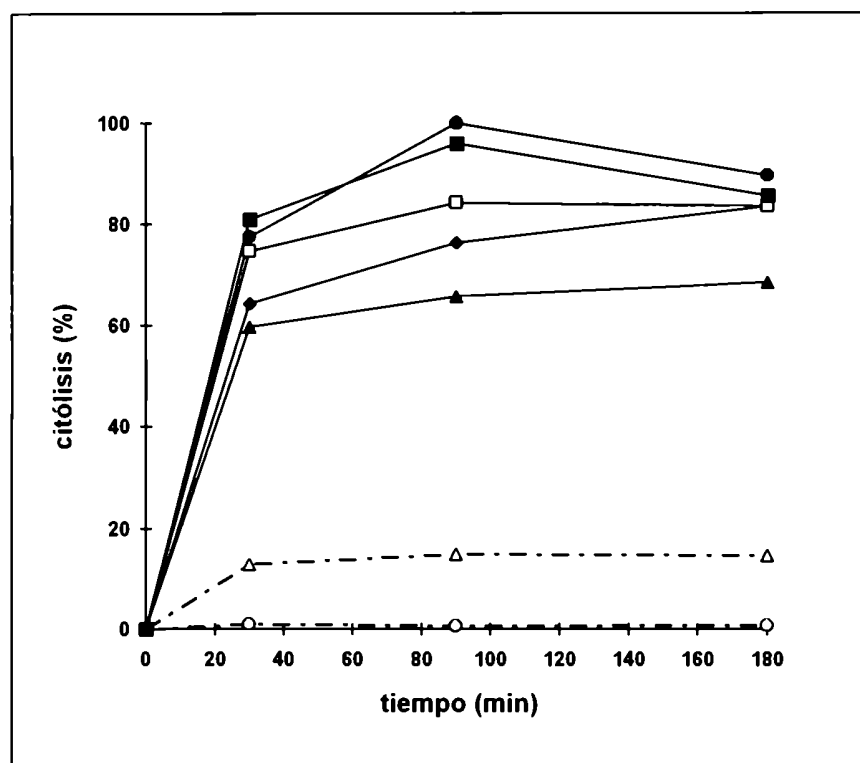


Figura 12. CMC sobre células MCF-7. Efecto de la concentración de FC-2.15. Células MCF-7 marcadas con $[^{51}\text{Cr}]$ fueron incubadas a 37°C por distintos intervalos de tiempo en presencia de suero humano y FC-2.15 a $1\mu\text{g/ml}$ (▲); $5\mu\text{g/ml}$ (◆); $10\mu\text{g/ml}$ (□); $25\mu\text{g/ml}$ (●) y $50\mu\text{g/ml}$ (■). Se realizaron experimentos control sin suero (O) o sin FC-2.15 (Δ). El porcentaje de citólisis específica fue calculado como se indica en Materiales y Métodos.

Cuando el mismo experimento fue realizado utilizando suero humano preincubado 30 minutos a 56°C o bien pretratado 30 minutos con 10 mM EDTA para inactivar el complemento, no se observaron efectos citotóxicos, aún a la mayor concentración de AMC testada, como se muestra en la **tabla 8**.

Por otra parte controles utilizando otro AMC, 436 (IgM murina, fuertemente reactivo con células MCF-7), o bien IgM total murina (inmunoglobulinas purificadas), no indujeron citólisis de células MCF-7 (Tabla 8).

Anticuerpo	Pretratamiento del suero humano	Lisis específica (%)*	Viabilidad Celular (%)*
Ninguno	-	12,4 ± 6,7	85,5 ± 4,2
FC-2.15 (50 µg/ml)	-	96,0 ± 7,2	3,8 ± 2,9
FC-2.15 (50 µg/ml)	56°C, 30 min.	9,6 ± 1,3	N.E.
FC-2.15 (50 µg/ml)	10 mM EDTA, 30 min.	14,7 ± 2,1	N.E.
AMC 436 (ascitis 1/50)	-	8,6 ± 2,8	N.E.
IgM murina (50 µg/ml)	-	13,2 ± 1,4	86,2 ± 4,6

Tabla 8: CMC FC-2.15 dependiente.

Células MCF-7 fueron incubadas durante 90 min. a 37°C con diferentes anticuerpos en presencia de suero humano (dilución 1/2). El porcentaje de lisis específica fue calculado con un ensayo de liberación de [⁵¹Cr] como se describe en Materiales y Métodos. La viabilidad celular se evaluó por exclusión de azul tripán. *: media ± SD de 2 experimentos, cada uno realizado por triplicado.

Para determinar si la citotoxicidad obtenida contra células MCF-7 es específica hacia células que expresan Ag 2.15, se investigó la capacidad del AMC FC-2.15 de mediar lisis por complemento con diferentes tipos celulares. Los resultados se presentan en las **figuras 13 y 14** donde se observa la reactividad de FC-2.15 con las distintas células determinada por inmunohistoquímica (**figura 13**) y el porcentaje de citólisis alcanzado en cada caso (**figura 14**). Como puede observarse las células IIB-BR-G no expresan Ag 2.15 y no fueron lisadas en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ FC-2.15 y complemento. En contraste cuando se utilizaron células MCF-7 o leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos una alta reactividad fue obtenida por inmunohistoquímica, y se observó una marcada citólisis. Se analizó también la actividad sobre células de cáncer de mama humano aisladas a partir de dos tumores primarios. El tumor #1 fue marcadamente positivo para FC-2.15 como puede observarse en la fig. 13. Cuando se lo disgregó, sólo 50 % de las células viables obtenidas fueron de origen tumoral, y al ser sometido al ensayo de CMC, la lisis fue de $54,8 \pm 4,6$ %. Como se muestra en la misma figura, FC-2.15 no tuvo efecto sobre las células tumorales aisladas a partir del tumor #2, que resultó Ag 2.15-negativo. Finalmente se testeó la reactividad de FC-2.15 con células leucémicas obtenidas a partir de sangre de un paciente con leucemia mieloide crónica (CML). Un 85 % de estas células fueron Ag 2.15⁺ de acuerdo a la determinación inmunohistoquímica. Como puede observarse en la fig. 14 la lisis específica fue de $82,3 \pm 7,0$ % con 50 $\mu\text{g/ml}$ FC-2.15, y una reactividad semejante se obtuvo con 5 $\mu\text{g/ml}$ (resultado no mostrado).

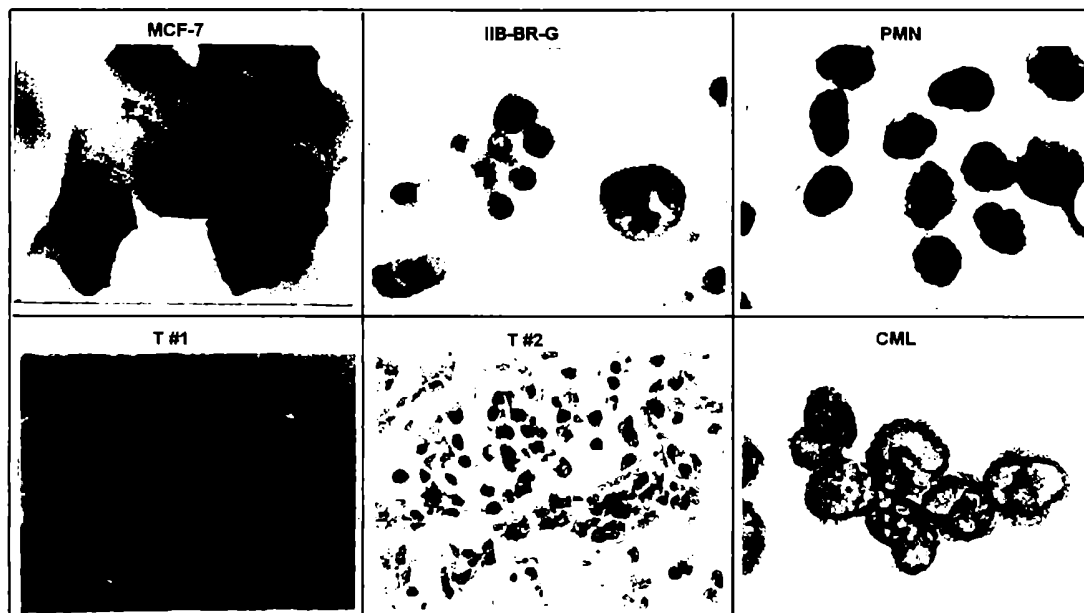


Figura 13. Reactividad del AMC FC-2.15 con diferentes tipos celulares.
 Expresión del Ag 2.15 determinada por inmunohistoquímica en células MCF-7, IIB-BR-G, carcinomas mamarios humanos #1 y #2, CML y PMN.

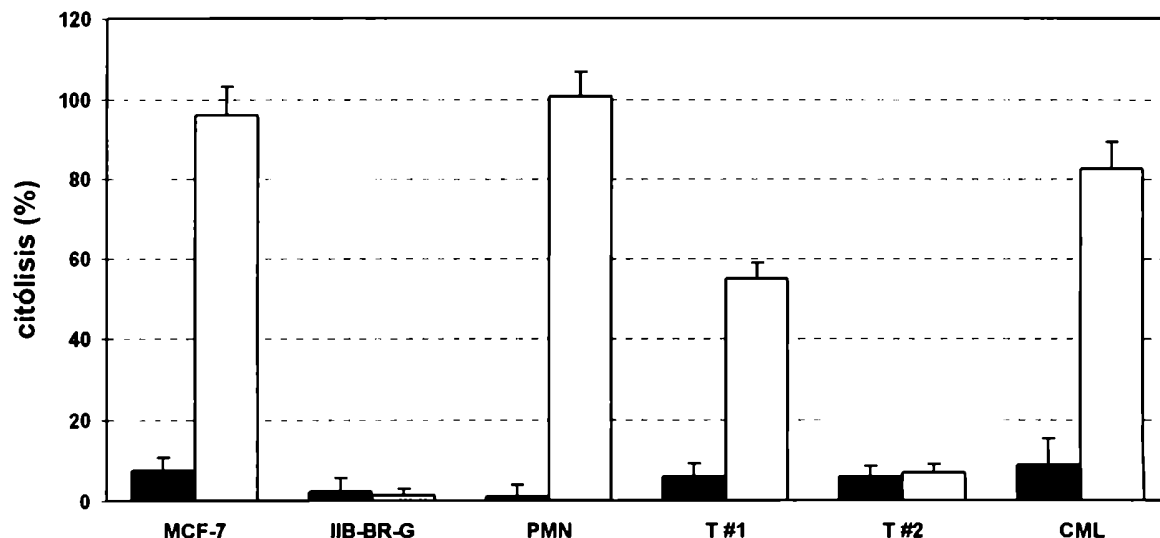


Figura 14. Actividad CMC FC-2.15-dependiente con diferentes tipos celulares.
 Células marcadas con ^{31}Cr fueron incubadas durante 90 minutos a 37°C en presencia de suero humano y $50 \mu\text{g/ml}$ FC-2.15 (□). Se realizaron incubaciones en paralelo en ausencia de FC-2.15 (■). El porcentaje de citólisis específica fue calculado como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados corresponden a la media de 2 experimentos realizados por triplicado y las barras verticales representan SD.

2.- Aislamiento y análisis de células MCF-7 resistentes a CMC FC-2.15-dependiente

Como se observó en los experimentos de liberación de [^{51}Cr] reportados en la sección anterior, las células MCF-7 son en su mayoría sensibles a CMC FC-2.15-dependiente; sin embargo parecería existir un pequeño porcentaje de células con capacidad de sobrevivir a este tratamiento. Se buscó entonces confirmar y cuantificar la existencia de células sobrevivientes e investigar las causas de esta resistencia. Para ésto, células MCF-7 se incubaron en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ FC-2.15 y suero humano (dilución 1/2) durante 90 minutos a 37°C, se observaron a microscopio y se cuantificó la viabilidad celular por el método de exclusión de azul tripán. Como se muestra también en la **tabla 8** solamente un $3,8 \pm 2,9 \%$ (media \pm SD) de la población celular sobrevivió al tratamiento. Por el contrario la mayoría de las células tratadas con IgM total murina o PBS en reemplazo de FC-2.15 fueron viables.

Se analizó a continuación si las células resistentes al tratamiento con FC-2.15 y complemento expresaban Ag 2.15 en su membrana. Para esto, dichas células fueron aisladas mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque que permite separar células viables de muertas, y se estudió la expresión del Ag 2.15 por citometría de flujo (Materiales y Métodos, secciones 2.5 y 2.6). Como puede observarse en la **figura 15. A**, las células MCF-7 no tratadas (población total) son marcadamente positivas para el Ag 2.15, con un amplio rango de intensidades. Sin embargo las células sobrevivientes al tratamiento con FC-2.15 y complemento humano (**figura 15. B**), fueron Ag 2.15-negativas o expresaron muy bajas cantidades de Ag 2.15.

3.- Citotoxicidad celular anticuerpo - dependiente (ADCC)

Para estudiar la capacidad de FC-2.15 de mediar ADCC contra células Ag 2.15⁺ se utilizó un ensayo de liberación de [^{51}Cr] similar al de CMC, pero usándose diferentes células efectoras en lugar de complemento (Materiales y Métodos sección 2.7). Como células blanco fueron utilizadas MCF-7 y como efectoras leucocitos mononucleares totales, linfocitos aislados o PMN humanos. Se testearon también linfocitos preincubados con IL-2 como células efectoras, dado que distintos autores han reportado un aumento de ADCC en estas condiciones [Morgan A. 1989; Munn D. 1987]. Fueron ensayadas diversas relaciones célula blanco : célula efectora, variando en un rango entre 1:5 y 1:100.

En cada caso se evaluó el porcentaje de citólisis específica y en ninguna de las condiciones estudiadas se observaron efectos de citotoxicidad celular mediada por FC-2.15 (resultados no mostrados).

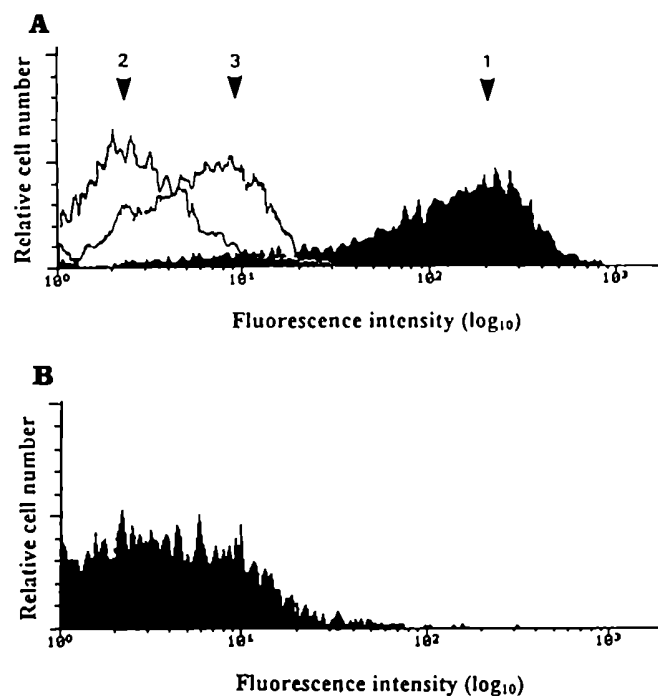


Figura 15. Análisis de citometría de flujo de células MCF-7 con AMC FC-2.15.

A. Reactividad de FC-2.15 con células MCF-7 (población total).

La expresión de Ag 2.15 fue analizada por citometría de flujo como se describió en Materiales y Métodos. *Curva 1* FC-2.15, *curva 2* control con PBS y *curva 3* control con IgM total murina.

B. Reactividad de FC-2.15 con células MCF-7 resistentes a CMC FC-2.15-dependiente.

Células MCF-7 fueron incubadas por 90 min. a 37°C con 50 µg/ml FC-2.15 más suero humano (dilución 1/2) y sembradas en un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células viables fueron recuperadas de la interfase y su expresión de Ag 2.15 se analizó por citometría de flujo.

4.- Análisis de la unión FC-2.15 - Ag 2.15 en células MCF-7:

La constante de afinidad (K_a) del AMC FC-2.15 y el número de sitios antigénicos en células MCF-7 fueron determinados mediante el análisis de Scatchard como se describe en Materiales y Métodos sección 2.9. La figura 16 muestra los resultados. La relación lineal obtenida indicó una población homogénea de sitios de unión, con una K_a de $6,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y una capacidad de unión de $2,8 \times 10^6$ sitios antigénicos por célula.

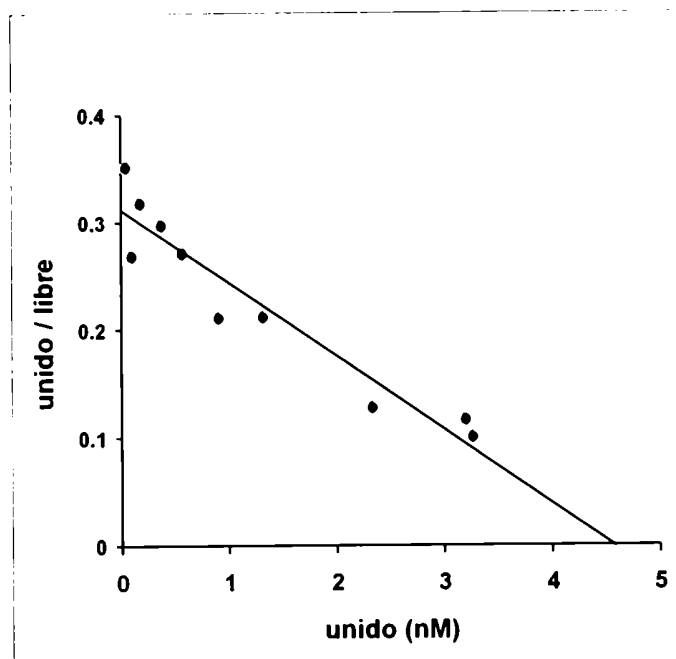


Figura 16. Análisis de Scatchard de FC-2.15 realizado sobre células MCF-7 como se describe en Materiales y Métodos. La figura muestra un gráfico representativo de 3 diferentes experimentos y cada punto corresponde a la media de determinaciones realizadas por triplicado. $K_a = 6,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y número de sitios antigénicos por célula = $2,8 \times 10^6$.

5.- Internalización del complejo FC-2.15 - Ag 2.15 :

a) *Ensayos de inmunofluorescencia :*

Para determinar si FC-2.15 es internalizado una vez que se une a la superficie celular, se realizó un ensayo de endocitosis del AMC con células MCF-7 como se describe en Materiales y Métodos (sección 2.10.a). Para esto, las células fueron incubadas 1 hora a 4°C con FC-2.15, lavadas con PBS/BSA y colocadas durante 0, 30, 60 ó 120 minutos a 37°C para permitir la internalización del AMC unido a la superficie celular. Finalizada la incubación se trataron con buffer ácido para remover el anticuerpo remanente presente en la membrana. La presencia y localización de FC-2.15 fue detectada por inmunofluorescencia.

Los resultados se muestran en la **figura 17**. Después de 1 hora de incubación a 4°C con FC-2.15, éste reaccionó fuertemente con la superficie celular (Fig. 17.A) y el lavado ácido removió eficientemente el AMC unido a la superficie (Fig. 17.B). Cuando las células fueron incubadas durante 1 hora a 4°C con FC-2.15 y luego lavadas e incubadas durante 2 hs a 37°C, todavía permaneció en la superficie celular una significativa reactividad (Fig. 17.C). Sin embargo, después del tratamiento ácido, pudo observarse fluorescencia resistente dentro de las células (Fig. 17.D y E). La figura 17.E muestra numerosos puntos pequeños, fluorescentes concentrados en la región perinuclear, con un patrón característico de lisosomas o endosomas. El mismo patrón se evidenció después de 30 ó 60 minutos a 37°C aunque con menor intensidad de fluorescencia. Estos resultados son consistentes con una parcial internalización del AMC FC-2.15 a vesículas citoplasmáticas.

b) *Radioinmunoensayo celular :*

Las cinéticas de internalización y catabolismo del AMC FC-2.15 se evaluaron utilizando un radioinmunoensayo celular como se describe en Materiales y Métodos (sección 2.10.b). Células MCF-7 fueron incubadas con 5 µg/ml [¹²⁵I]-FC-2.15 a 4°C durante 1 hora, lavadas e incubadas a 37°C durante 0 min., 30 min, 1, 3, 6 y 24 hs. para permitir la internalización del AMC unido a la superficie celular. A continuación, se separó el sobrenadante de cultivo, se removió el FC-2.15 unido a la membrana celular mediante lavados ácidos y se disolvieron las células para determinar la presencia de AMC internalizado. Se cuantificó entonces la radioactividad presente en cada uno de los tres compartimientos. Los resultados se muestran en la **figura 18. A**. Inicialmente, 88 % de la

marca total estuvo asociada a la superficie celular. Cuando las células fueron incubadas a 37°C, hubo un progresivo incremento de la radioactividad intracelular y una simultánea disminución de la radioactividad unida a membrana. La radioactividad intracelular alcanzó un máximo de 27,3 % a las 6 hs, decreciendo a 3 % después de 24 hs de incubación. Como puede observarse, la presencia de [¹²⁵I] en el sobrenadante de cultivo se incrementó a través del período de incubación a 37°C. Analizados en conjunto, estos resultados sugieren la internalización del FC-2.15 en células MCF-7, con la consecuente liberación de productos de degradación del AMC al sobrenadante de cultivo.

Para testear la presencia de productos de degradación del [¹²⁵I]-FC-2.15, los sobrenadantes de cultivo fueron precipitados con 5 % tricloroacético (TCA) (Fig. 18.B). Puede observarse que a tiempos cortos de incubación (hasta 6 hs), la mayor parte de la radioactividad fue TCA-precipitable. Subsecuentemente la contribución de la fracción TCA-soluble a la radioactividad total se incrementó progresivamente hasta 64 % después de 24 hs de incubación.

La aparición de radioactividad TCA-soluble en los sobrenadantes de cultivo puede reflejar la degradación intracelular del [¹²⁵I]-FC-2.15, seguida por la liberación de productos de bajo peso molecular marcados. Para investigar en más detalle esta hipótesis, el mismo experimento fue realizado agregando 50 µM monensina durante las incubaciones y los lavados para inhibir la degradación lisosomal del AMC internalizado. Los resultados mostraron que, en presencia de monensina, la marca en el sobrenadante alcanzó un 46 % de la radioactividad total después de 24 hs de incubación (en contraste con un 90,3 % sin monensina), pero la fracción TCA-soluble fue sólo del 2 % de la radioactividad total del cultivo. Por otra parte, cultivos mantenidos por 24 hs a 4°C en lugar de a 37°C para impedir la endocitosis del [¹²⁵I]-FC-2.15, demostraron una acumulación de radioactividad TCA-precipitable en el sobrenadante, y ausencia de radioactividad TCA-soluble (resultado no mostrado).

Experimentos control realizados en presencia de FC-2.15 no marcado en un exceso de 100 veces, señalaron que la unión inespecífica fue menor que el 3 % con respecto a la unión específica.

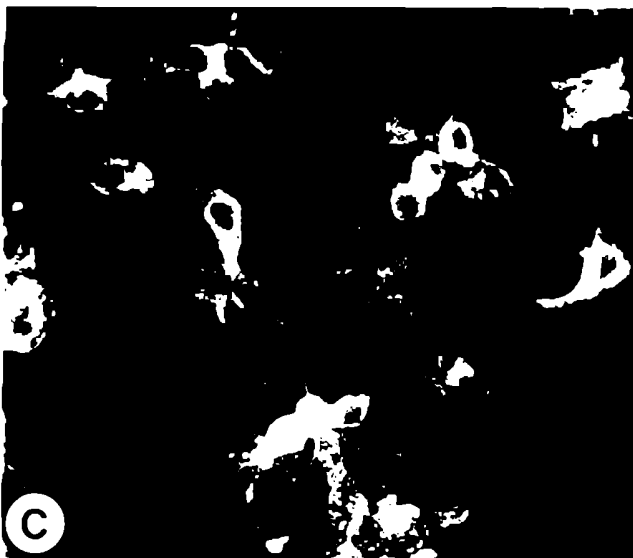
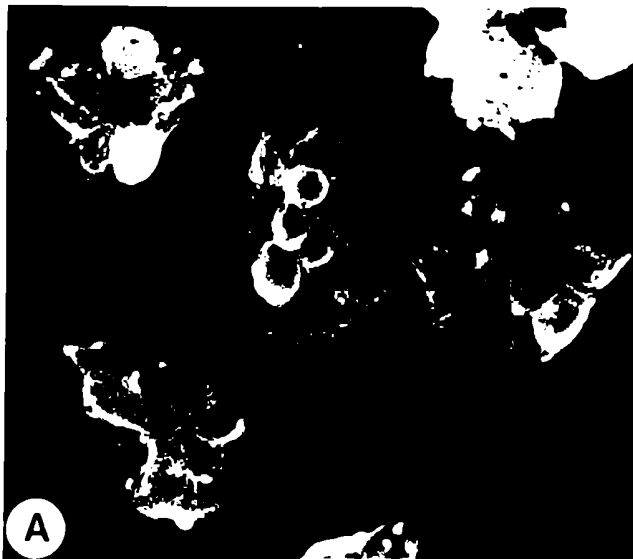


Figura 17. Internalización de FC-2.15. Células MCF-7 fueron incubadas 1 hora a 4°C con 5 µg/ml FC-2.15. Luego de lavarse con PBS/BSA, las células fueron:
 - tratadas (B) o no (A) con buffer ácido;
 - incubadas 2 hs a 37°C y tratadas (D, E) o no (C) con buffer ácido.
 A continuación se fijaron, permeabilizaron e incubaron con un antisuero hecho en cabra anti-Ig de ratón, conjugado con FITC. Aumento: A-D 400 x ; E 1000 x .

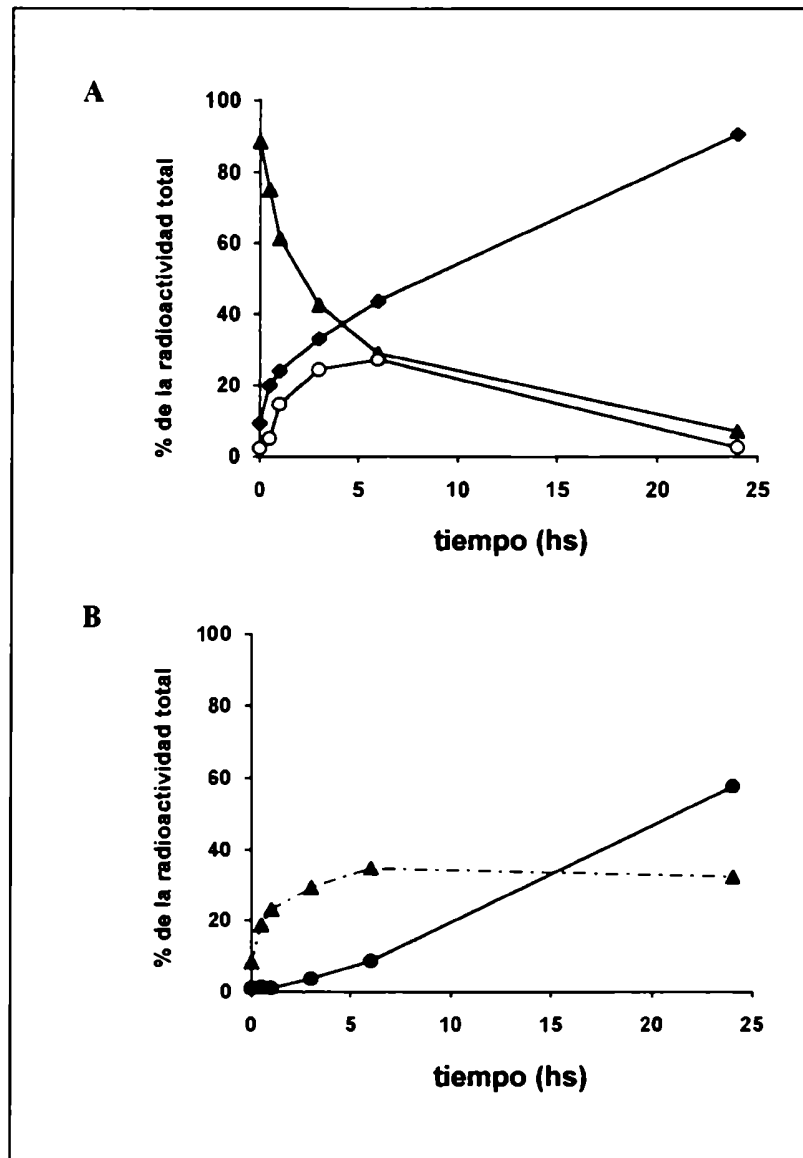


Figura 18. Internalización y catabolismo del AMC FC-2.15.

A. Cinética de endocitosis del $[^{125}\text{I}]$ -FC-2.15 por células MCF-7. La distribución relativa de la radioactividad total del cultivo en el sobrenadante (◆), la superficie celular (▲) y el compartimiento intracelular (○), es representada en función del tiempo de incubación a 37°C .

B. Los sobrenadantes de cultivo fueron precipitados con 5 % TCA para distinguir $[^{125}\text{I}]$ unido a proteínas (precipitable) (▲), de los catabolitos de bajo peso molecular (solubles en ácido) (●).

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado, cada punto representa la media de los datos obtenidos.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron las propiedades funcionales del AMC FC-2.15, su capacidad citotóxica, especificidad y las características de unión al Ag 2.15.

Los resultados obtenidos demostraron que FC-2.15 media específicamente la lisis de células que expresan Ag 2.15, a través de la fijación de complemento humano. Cuando un ensayo de liberación de [^{51}Cr] con células MCF-7 fue utilizado, la actividad citotóxica fue máxima en presencia de complemento y 25 $\mu\text{g/ml}$ FC-2.15, pero una importante CMC fue obtenida aún con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo. Pudo observarse que sólo 3,8 % de las células MCF-7 sobrevivieron al tratamiento y éstas fueron Ag 2.15-negativas de acuerdo a un ensayo de citometría de flujo, demostrando que FC-2.15 medió la lisis de las células MCF-7 Ag 2.15⁺. Este efecto resultó ser antígeno-específico puesto que tanto células provenientes de un carcinoma mamario humano Ag 2.15-negativo, como células IIB-BR-G no fueron lisadas. Por el contrario, un efecto citotóxico potente fue observado cuando se testearon células que expresan Ag 2.15 tales como MCF-7, PMN, células provenientes de un tumor de mama primario Ag 2.15⁺ y un caso de CML Ag 2.15⁺.

FC-2.15 no medió reacciones de ADCC cuando diferentes células fueron utilizadas como efectoras. Este resultado es consistente con reportes previos que señalan que anticuerpos de clase IgM son pobres mediadores de ADCC [Nakamura K. 1994; Orlandi R. 1992]. Si bien se han descrito receptores de Fc μ sobre linfocitos B, linfocitos T CD4 (helpers) y recientemente sobre células NK (natural killers), su rol funcional todavía no ha sido clarificado. En las células NK, parecen ser moléculas importantes involucradas en el envío de señales regulatorias negativas [Pricop L. 1993].

Un estudio clínico fase I de FC-2.15 llevado a cabo en pacientes con cancer avanzado para determinar toxicidad y esquema óptimo de administración del AMC, permitió observar respuestas clínicas objetivas [Mordoh J. 1995]. El potente efecto citotóxico sobre células Ag 2.15⁺ demostrado en este estudio *in vitro* en presencia de suero humano, sugiere que el mecanismo responsable de los efectos antitumorales de este AMC sería la activación de complemento. Es importante notar que en el ensayo clínico los niveles de FC-2.15 en suero variaron entre 1,3 y 7,5 $\mu\text{g/ml}$, concentraciones que probaron ser efectivas *in vitro* para mediar la lisis por complemento.

Por otra parte, en el presente estudio se demostró también que FC-2.15 media CMC contra PMN humanos normales, así como células de leucemia mieloide crónica derivadas de un único paciente analizado. Cuando FC-2.15 fue administrado a pacientes en el mencionado estudio clínico, una marcada neutropenia se observó luego de 1 hora del comienzo de cada infusión [Mordoh J. 1995]. Esta neutropenia podría resultar de la lisis de los granulocitos, su marginación periférica o de la eliminación de los granulocitos opsonizados de la sangre periférica. Los resultados observados en este trabajo sugieren que el primer mecanismo es al menos parcialmente responsable de tal neutropenia. Por otra parte esto no representó un problema clínico significativo, ya que los PMN se recuperaron rápidamente después de cada aplicación [Mordoh J. 1995]. Cabe mencionar que previamente al ensayo clínico se estudió el efecto de CMC FC-2.15-dependiente sobre la capacidad clonogénica de médula ósea normal. Los resultados mostraron que el tratamiento no afectó el potencial clonogénico de células de médula ósea, al mismo tiempo que disminuyó significativamente el índice clonogénico de células MCF-7 y de células obtenidas de tumor de mama primario utilizadas como control [Mordoh J. 1994]. Estas observaciones indicarían que el Ag 2.15 no está presente en células stem de médula ósea.

La correspondencia entre la alta afinidad de un AMC por su antígeno y su eficacia terapéutica ha sido cuestionada. Se ha reportado que el uso de anticuerpos de alta afinidad puede representar una desventaja al dificultar la penetración del AMC en el tumor, disminuyendo así su potencial citotóxico [Fujimori K. 1989; Weinstein J.N. 1987]. Contrariamente, Schlom y col. demostraron la ventaja terapéutica del uso de anticuerpos de alta afinidad, cuando tres AMC de diferente K_a dirigidos contra TAG-72 fueron comparados [Schlom J. 1992]. Con respecto a anticuerpos de clase IgM, aún cuando éstos son generalmente muy efectivos en mediar lisis por complemento, tal eficacia parece estar comprometida en AMC de poca afinidad [Neuberger M. 1981], así como por una baja densidad de moléculas antigénicas en la superficie de la célula blanco [Fogler W. 1989]. Como se muestra en este estudio, FC-2.15 presentó una K_a intermedia de $6,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Cabe destacar que el AMC 17-1A, con una similar afinidad de unión, ha mostrado efectividad en un ensayo clínico en pacientes con carcinoma de colon [Riethmüller G. 1994]. Por otra parte se demostró que el Ag 2.15 está presente en una alta densidad

en células MCF-7 ($2,8 \times 10^6$ sitios antigénicos por célula). Ambos hechos podrían explicar el poderoso efecto de FC-2.15 en mediar lisis por complemento.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que FC-2.15 podría ser útil en inmunoterapia de pacientes con carcinomas Ag 2.15⁺. Diferentes estrategias han sido desarrolladas para el uso terapéutico de anticuerpos antitumorales: el uso de AMC no conjugados o su unión a radioisótopos, drogas quimioterapéuticas o toxinas. Como se mencionó en la Introducción General de esta Tesis, el uso de un AMC sin conjugar requiere que éste reconozca antígenos sobre la superficie de células cancerosas y posea capacidad citotóxica por sí mismo o mediando reacciones de CMC o ADCC. En este caso la internalización celular del AMC disminuiría su eficacia terapéutica. Por otra parte, el uso de anticuerpos como vehículos para dirigir drogas requiere la endocitosis del conjugado AMC- droga en las células cancerosas.

Con respecto a FC-2.15, una lenta internalización celular fue observada alcanzando un máximo luego de 6 hs. Sin embargo, la mayor parte del AMC permaneció unida a la membrana celular el tiempo suficiente para permitir que ocurra la reacción de CMC. En base a estas observaciones, el uso de FC-2.15 no conjugado en terapias antitumorales sería más apropiado que su unión a drogas o toxinas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Este trabajo de Tesis se ha centrado en el estudio de la heterogeneidad celular existente en los carcinomas mamarios humanos y particularmente en la identificación de distintas subpoblaciones celulares presentes en estos tumores. Para esto se analizó la expresión de una serie de marcadores asociados a carcinomas mamarios, incluyendo receptores hormonales, antígenos oncofetales, glicoconjugados de membrana aberrantemente glicosilados (mucinas y glicolípidos), etc.

De los resultados presentados y discutidos en los capítulos precedentes pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- **Todos los marcadores analizados se expresan en forma heterogénea en los carcinomas mamarios, coexistiendo en los tumores células positivas y negativas para los mismos.**
- **Si bien los resultados obtenidos no descartan la existencia de clones celulares con distinto contenido de RE y RPg en carcinomas de mama humanos, indicarían que estos receptores no están presentes en células stem tumorales sino que se expresan durante la diferenciación celular, en células con disminuida capacidad proliferativa. Esto podría explicar el efecto transitorio más que curativo observado frecuentemente con las terapias hormonales antiestrogénicas.**
- **El análisis de diversos marcadores tumorales asociados a carcinoma mamario humano demostró que tumores diferenciados e indiferenciados presentan un patrón distinto de expresión de estas moléculas: Ag 2.15 y PEM se expresan en más del 90 % de los tumores y en la gran mayoría de las células independientemente del grado de diferenciación del tumor; mientras que la presencia de TAG-72, CEA, NCA-90, CaMBr1, RE y RPg está asociada a la diferenciación tumoral.**

Los resultados obtenidos permitieron establecer un modelo basado en una secuencia regular de expresión de marcadores a medida que progresa la diferenciación celular y disminuye la proliferación. De acuerdo a este modelo Ag 2.15 y PEM comenzarían a sintetizarse en células indiferenciadas, de alta capacidad

proliferativa, y su expresión se mantendría a través de todo el proceso de diferenciación celular. Los restantes marcadores se expresarían progresivamente a lo largo de la diferenciación en una secuencia: NCA-90 \Rightarrow RE \Rightarrow RPg / TAG-72 / CaMBr1 \Rightarrow CEA.

La figura 19 ilustra el modelo propuesto para la expresión de marcadores en carcinomas mamarios diferenciados e indiferenciados. En estos últimos, al estar bloqueado el proceso de diferenciación celular, las células serían mantenidas en un estadio altamente proliferativo, indiferenciado, y por lo tanto sólo estarían presentes aquellos marcadores de expresión "temprana": Ag 2.15 y PEM.

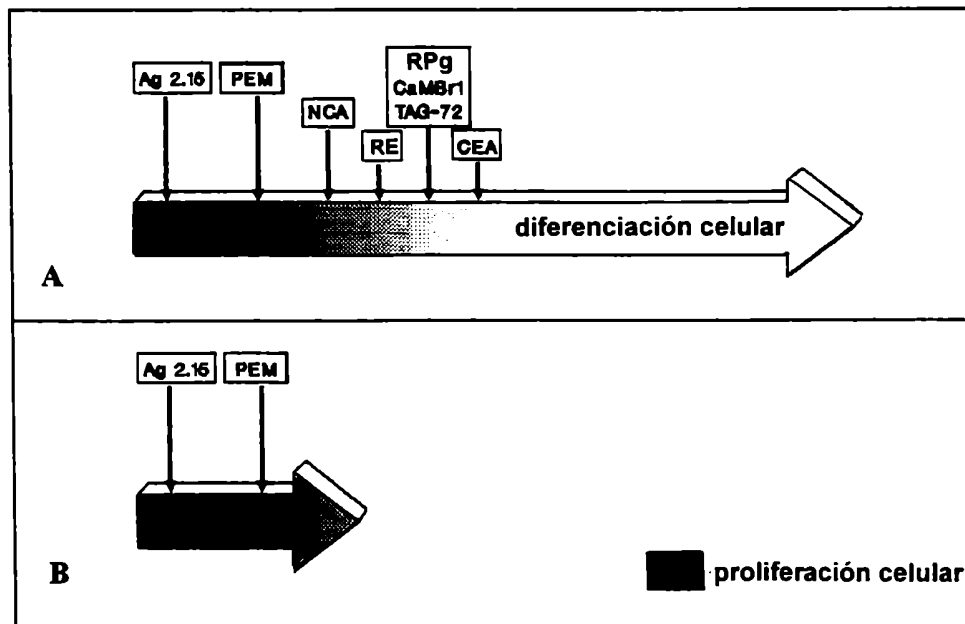


Figura 12: Secuencia de expresión de marcadores tumorales durante el proceso de diferenciación celular en carcinomas mamarios humanos.

A - carcinomas diferenciados

B- carcinomas indiferenciados

- EL AMC FC-2.15 (anti-Ag 2.15) fue desarrollado en nuestro laboratorio utilizando como inmunógeno células provenientes de un carcinoma mamario humano indiferenciado. Este AMC reconoce carcinomas mamarios y también otras neoplasias. En este trabajo se demostró que FC-2.15 presenta una potente actividad

citotóxica específica contra células que expresan Ag 2.15, mediando la lisis por complemento humano. Los estudios en células MCF-7 demostraron que FC-2.15 reconoce un antígeno expresado en membrana plasmática en alta densidad ($2,8 \times 10^6$ sitios antigénicos por célula), presenta una K_a de $6,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y es lentamente internalizado en la célula blanco.

Los resultados aquí presentados sugieren que el AMC FC-2.15 puede ser útil en inmunoterapia pasiva de pacientes con neoplasias Ag 2.15⁺ y podría ser utilizado sin necesidad de conjugarlo con drogas o toxinas. Cabe señalar que, como se mencionó previamente, un ensayo clínico (fase I) de FC-2.15 en pacientes con cáncer avanzado permitió observar respuestas objetivas [Mordoh J. 1995]. Por otra parte, recientemente estudios *in vitro* demostraron un efecto citotóxico aditivo en células de carcinoma mamario entre FC-2.15 y adriamicina o taxol (drogas corrientemente usadas en el tratamiento del cáncer mamario). Más aún, ha sido demostrado que el Ag 2.15 se expresa en células de carcinoma mamario con fenotipo MDR (resistentes a múltiples drogas) y que FC-2.15 media la lisis por complemento humano de estas células [Ballaré y col., enviado a publicación]. Esto es particularmente importante puesto que la resistencia a drogas representa uno de los problemas principales en el tratamiento del cáncer. De acuerdo a estos resultados FC-2.15 podría ser un agente útil contra células tumorales resistentes a quimioterapia y su administración combinada será objeto de posteriores estudios.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Parte 1 -

Determinación de proliferación celular, receptores hormonales y otros marcadores tumorales en carcinomas mamarios humanos

1. 1.- Obtención de las muestras tumorales :

1. 1. a.- Selección de pacientes:

Se incluyeron en este estudio pacientes del Hospital Interzonal de Agudos Eva Perón (ex Hospital Dr. Mariano Castex), del Hospital Privado Güemes y del Hospital Rivadavia, con carcinoma primario de mama, no tratados previamente, que fueron sometidos a mastectomías y tumorectomías.

El estadio clínico de los pacientes fue determinado según las definiciones de la AJCC (*American Joint Commission on Cancer Staging*) y la UICC (Unión Internacional Contra el Cancer, Ginebra) para la clasificación TNM (*Tumor-Node-Metastases classification*). Este sistema tiene en cuenta el tamaño tumoral, presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales y presencia de metástasis a distancia.

La clasificación histológica fue realizada de acuerdo a van Bogaert L. [1978] y el grado de diferenciación de los tumores se estableció según la clasificación de Bloom H.J.G. [1957]; ambos parámetros fueron evaluados por la Dra. I. Bravo y la Dra. I. Sorín del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Castex.

1. 1. b.- Procesamiento de las muestras tumorales:

Los tumores fueron obtenidos y procesados en condiciones de esterilidad. Se limpiaron inmediatamente de grasa, tejido necrótico y tejido normal adyacente y se colocaron en medio mínimo esencial Eagle's (MEM) adicionado con penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml). El tejido tumoral fue dividido en la siguiente forma: un fragmento se fijó en formaldehído 4% en buffer fosfato salino (PBS) para la evaluación del tipo histológico y grado de diferenciación tumoral y el resto se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 mm³. Diez de éstos se congelaron en nitrógeno líquido para posterior análisis de la expresión de RE, RPg (sección 1. 3) y marcadores tumorales (sección 1. 4). Los restantes se utilizaron para la estimación de la proliferación celular (sección 1. 2) y para la determinación simultánea de proliferación celular y expresión de receptores hormonales o marcadores tumorales (sección 1. 6).

1. 2.- Estimación de la proliferación celular :

La capacidad proliferativa de las células tumorales fue evaluada a través de la incorporación de [³H] Timidina ([³H] dT) al DNA. El índice de marcación con [³H] dT (TLI) se determinó de acuerdo a Silvestrini R. y col [1987] con leves modificaciones [Sorín I. 1988]. Para cada determinación se incubaron entre 10 y 15 fragmentos de cada tumor a 37°C en 3 ml de MEM conteniendo 10% suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y depletado de esteroides, y con el agregado de 10 µCi/ml de [³H] dT (New England Nuclear, actividad específica 80 Ci/mmol). Las incubaciones fueron realizadas por distintos intervalos de tiempo, en un rango de 30 - 120 minutos, según se indica en cada experimento. Al finalizar el período de incubación, los fragmentos tumorales fueron lavados 3 veces (10 minutos cada lavado) con PBS a 4°C y embebidos en medio de inclusión de tejidos (OCT) a -20°C para la realización de cortes histológicos en crióstato. Se obtuvieron secciones de tejido de 3 µm y se montaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina para una mayor adhesión del tejido. Los cortes se fijaron inmediatamente con 3,7% formaldehído en PBS (15 minutos a 4°C) y, luego de lavarse con PBS (6 minutos) se transfirieron a metanol (4 minutos a -20°C), acetona (2 minutos a -20°C) y PBS (5 minutos). Finalmente se guardaron a -20°C en solución para conservación de tejidos (42,8 g sacarosa - 0,7 g Mg₂Cl / 250ml PBS : 250 ml glicerol) hasta el momento de su uso. Se realizó entonces una autoradiografía*. Para ésto las secciones de tejido fueron lavadas tres veces con 5% tricloroacético (TCA) (10 minutos cada lavado), luego con H₂O destilada y se cubrieron con emulsión fotográfica Kodak NTB-2 Nuclear Track (Eastman Kodak Co.) y mantuvieron durante 15 días a 4°C en oscuridad. Al cabo de este período, las muestras fueron reveladas con solución D19 (0,2 g metol; 9 g Na₂SO₃; 0,8 g hidroquinona; 4,5 g Na₂CO₃; 0,5 g KBr en 100 ml H₂O destilada), teñidas con Hematoxilina de Harris, deshidratadas y montadas en Permount. Para la determinación del TLI se calculó el porcentaje de células que incorporaron [³H] dT, analizándose las zonas perisféricas de los fragmentos tumorales con un aumento de 1000 x bajo un microscopio standard Zeiss. Fueron consideradas "positivas" aquellas células con precipitado de plata sobre su núcleo. Se evaluaron más de 3000 células neoplásicas por corte de tejido y cada determinación fue realizada en secciones por duplicado.

* En algunos experimentos, se efectuó primero una inmunohistoquímica para detectar expresión de receptores hormonales o diversos marcadores tumorales como se describirá en las sección 1. 6, y a continuación la autoradiografía)

1. 3.- Evaluación de la expresión de RE y RPg :

1. 3. a.- Anticuerpos :

Se utilizaron los AMC anti-RE y anti-RPg de Laboratorios Abbott. Dichos AMC reconocen la presencia de sus respectivos receptores independientemente de que ellos estén unidos o no a la hormona correspondiente.

1. 3. b.- Determinación de RE y RPg por inmunohistoquímica:

Muestras tumorales conservadas en nitrógeno líquido desde el momento de la intervención quirúrgica, fueron embebidas en OCT para la realización de cortes histológicos en crióstato, cortadas, fijadas y conservadas como se describió en la sección 1. 2. La determinación de RE y RPg se realizó por inmunohistoquímica con los AMC anti-RE y anti RPg y se reveló con el sistema peroxidasa - anti-peroxidasa (Abbott ER-ICA Monoclonal kit y Abbott PgR-ICA Monoclonal kit) según se describió previamente [Ballaré C. 1991]. Básicamente, después de 2 lavados con PBS (10 minutos cada uno), los cortes histológicos fueron incubados con suero normal de cabra (10 % en buffer fosfato) por 15 minutos y a continuación por 60 minutos con AMC anti-RE o anti-RPg (0,1 µg/ml en buffer fosfato) o con IgG normal de rata como control negativo (0,1 µg/ml en buffer fosfato). En determinados experimentos los AMC anti-RE y anti RPg fueron agregados simultáneamente. Seguidamente las muestras se incubaron con un antisuero anti-IgG de rata hecho en cabra (1 µg/ml en buffer fosfato) durante 30 minutos y por último con el complejo peroxidasa - anti-peroxidasa hecho en rata (0,1 µg/ml en buffer Tris) por 30 minutos. Todas las incubaciones fueron llevadas a cabo en cámara húmeda, a temperatura ambiente y seguidas por 2 lavados con PBS (10 minutos cada lavado). La reacción fue detectada usando como sustrato cromogénico diaminobencidina (DAB/H₂O₂) [DAB 20 mg /100 ml PBS + 2 % H₂O₂ 30 vol.] por 9 minutos. Finalmente las muestras se tiñeron con Hematoxilina de Harris (1/100), se deshidrataron y montaron en Permount. Se observaron a microscopio determinándose el porcentaje de células que expresan RE (células RE⁺) o RPg (células RPg⁺). Fueron consideradas positivas aquellas células con núcleos teñidos de marrón, independientemente de la intensidad de color, mientras fueran claramente distinguibles del control negativo. Se evaluaron más de 3000 células neoplásicas por corte de tejido y todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

1. 4.- Evaluación de la expresión de marcadores tumorales :

1. 4. a.- *Anticuerpos :*

Los AMC utilizados y los antígenos (Ag) contra los cuales están dirigidos fueron: AMC COL-12 [Muraro R. 1985] contra Ag carcinoembrionario (CEA); AMC 436 [Nutti M. 1992] que reconoce a la proteína "core" de la mucina epitelial polimórfica (PEM) en cancer mamario humano; AMC B6.2 [Colcher D. 1981; Kufe D.W. 1983; Robbins P.F. 1993] contra NCA-90 (*nonspecific cross-reacting antigen*, Mr=90.000); AMC MBr1 [Menard S. 1983] contra el Ag CaMBr1; AMC B72.3 [Colcher D. 1981] contra el Ag TAG-72 (*tumor-associated glycoprotein*); y el AMC FC-2.15 [Mordoh J. 1994] contra el Ag 2.15.

AMC COL-12 y MBr1 fueron provistos por Dr. J. Schlom (National Cancer Institute, USA) y Dr. M.I. Colnaghi (Istituto dei Tumori - Milán, Italia) respectivamente. AMC 436, B72.3 y B6.2 fueron provistos por Dr. M. Nutti (Universita di Roma "La Sapienza", Italia). FC-2.15 es un AMC desarrollado recientemente en nuestro laboratorio, obtenido inmunizando ratones Balb/c con células tumorales provenientes de un carcinoma primario de mama humano altamente indiferenciado [Mordoh J. 1994] y purificado a partir de líquido ascítico como fue descrito previamente [Mordoh J. 1995].

1. 4. b.- *Detección de marcadores por inmunohistoquímica*

Para la determinación de marcadores tumorales se utilizaron cortes histológicos sucesivos de 3 µm de espesor, realizados en crióstato, a partir de muestras tumorales conservadas en nitrógeno líquido desde su obtención. Dichos cortes fueron montados, fijados y conservados según se describió en la sección 1. 2. El ensayo de inmunohistoquímica fue llevado a cabo utilizando el equipo Zymed Streptavidin - Biotin Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante (Zymed). Los cortes fueron lavados dos veces con PBS (5 minutos cada lavado) e incubados 10 minutos con suero normal de conejo (10% en PBS). A continuación, secciones independientes se incubaron con diferentes AMC: 436 (ascitis 1/500), COL-12 (ascitis 1/500), B6.2 (ascitis 1/500), MBr1 (ascitis 1/50), B72.3 (ascitis 1/500) y FC-2.15 (purificado, 50 µg/ml). La incubación se realizó durante 60 minutos a temperatura ambiente para los AMC 436 y COL-12; y toda la noche a 4°C en el caso de los restantes AMC. Como controles negativos se utilizaron IgG normal de ratón (50 µg/ml) o PBS. A continuación, los cortes se incubaron por 10 minutos con

anti-Ig de ratón hecho en conejo, biotinilado (anticuerpo puente); seguido de 5 minutos con el conjugado streptoavidina - peroxidasa. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda a temperatura ambiente y fueron seguidas por 2 lavados con PBS (5 min cada uno). La reacción fue revelada con DAB/ H₂O₂ por 5 minutos. Finalmente las muestras se tiñeron con Hematoxilina de Harris, se deshidrataron, montaron en Permount, y se observaron a microscopio determinándose el porcentaje de células que expresan los distintos marcadores tumorales. Fueron consideradas positivas para un dado marcador aquellas células con citoplasma y/o membrana teñidos de marrón (según la localización del marcador correspondiente). Se evaluaron más de 3000 células neoplásicas por corte de tejido y todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

1. 5.- Coexpresión de RPg y otros marcadores tumorales :

Doble-inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo sobre cortes histológicos provenientes de 2 tumores (#8.BM y #10.VV - tabla 5), analizándose la coexpresión de RPg y diversos marcadores tumorales. Dado que los respectivos AMC tienen distinto origen (AMC anti-RPg: hecho en rata y AMC anti-otros marcadores tumorales: hechos en ratón), fue posible revelarlos con diferentes anticuerpos secundarios.

A partir de ambas muestras tumorales se realizaron cortes de tejido secuenciales en crióstato, que se fijaron y conservaron según se describe en la sección 1. 2. Sobre cada corte se determinó la expresión de RPg con el sistema peroxidasa - anti-peroxidasa tal como se describe en la sección 1. 3 y luego la presencia de un marcador (PEM, NCA, TAG-72 o CaMBr1) usando el sistema fosfatasa alcalina - anti-fosfatasa alcalina DAKO APAAP Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente, luego de revelar la presencia de RPg con DAB / H₂O₂, los cortes se lavaron 4 veces (5 min. cada lavado) con TBS [0,05 M Tris - 0,15 M NaCl, pH 7,6] y cortes independientes fueron incubados con AMC 436, B6.2, MBr1 o COL-12 según se describe en la sección anterior (sección 1. 4). Un antisuero hecho en conejo anti-Ig de ratón fue utilizado como puente (30 minutos, temperatura ambiente) y finalmente se agregó el complejo fosfatasa alcalina - anti-fosfatasa alcalina hecho en ratón (30 minutos, temperatura ambiente). La reacción se reveló con naphtol AS-MX /cromógeno Fast Red TR. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y fueron seguidas por 2 lavados con TBS (5 min cada uno).

Finalmente las muestras se tiñeron con Hematoxilina de Harris, se deshidrataron y montaron en Permount. Se observaron a microscopio con un aumento de 1000 x, identificándose las células que expresan RPg (núcleos teñidos de marrón), las células que expresan algún marcador tumoral (citoplasma y/o membrana rojos) y las células que coexpresan RPg y otro marcador analizado (doble marcación). Se evaluaron más de 3000 células neoplásicas por corte de tejido y todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

1. 6.- Evaluación simultánea de proliferación celular y expresión de receptores hormonales u otros marcadores tumorales :

Una doble técnica permitió determinar simultáneamente, en un mismo corte histológico: a) expresión de receptores hormonales o diversos marcadores tumorales por inmunohistoquímica y b) células en proliferación por autoradiografía.

Muestras tumorales cortadas en pequeños fragmentos, fueron incubadas 30 minutos con [³H] dT y procesadas de acuerdo a lo descrito en la sección 1. 2. Sobre los cortes histológicos ya fijados, se realizaron inmunohistoquímicas con los AMC específicos para evaluar la expresión de receptores hormonales (sección 1. 3), o bien de distintos marcadores tumorales (sección 1. 4). A continuación, se efectuó una autoradiografía sobre el mismo preparado (sección 1. 2) evidenciándose así las células que duplican su ADN. Se analizaron entonces las zonas periféricas de los distintos fragmentos tumorales, evaluándose: incorporación de [³H] dT y expresión de RE, RPg o distintos marcadores tumorales, con un aumento de 1000 x, bajo un microscopio standard Zeiss. Cada determinación fue realizada en secciones por duplicado y se analizaron más de 3500 células neoplásicas por corte de tejido.

- Parte 2 -

AMC FC-2.15: Propiedades Funcionales

2. 1.- Células :

2. 1. a.- Líneas celulares :

Se utilizaron dos líneas celulares de carcinomas mamarios humanos: MCF-7 [Soule H.D. 1973] e IIB-BR-G [Bover L. 1991].

Las células MCF-7 se mantuvieron en cultivo continuo en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) / mezcla de nutrientes de Ham F12 (1:1) suplementado con 10 % FBS (Gibco), 2 mM glutamina, 10 µg/ml insulina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina.

La línea celular IIB-BR-G, desarrollada en nuestro laboratorio por la Dra. L. Bover y col., fue crecida en el mismo medio de cultivo suplementado con 20 nM selenito de sodio, 100 µM ácido ascórbico, 5 ng/ml factor de crecimiento epidermal, 5 µg/ml prolactina, 1,4 µM hidrocortisona y 0,1 nM 17 β-estradiol.

Para los distintos experimentos las células fueron cosechadas con una solución conteniendo 15 mM citrato de sodio - 135 mM KCl.

2. 1. b.- Células obtenidas a partir de tumores primarios :

Dos tumores primarios de mama humanos se obtuvieron a partir de pacientes con carcinomas mamarios no tratados previamente. El material quirúrgico fresco fue limpiado de grasa, tejido necrótico y tejido normal adyacente, cortado en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm³ y disgregado enzimáticamente para obtener células tumorales aisladas. Para ésto los fragmentos se incubaron durante 4 hs a 37°C con agitación suave en MEM conteniendo 10 % FBS inactivado por calor, 1 mg/ml colagenasa tipo I; 0,2 mg/ml DNAsa tipo I; 1 mg/ml hialuronidasa; 0,1 mg/ml elastasa; 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina según fue descrito previamente [Podhajcer O.L. 1986]. La suspensión celular obtenida fue filtrada a través de varias capas de gasa estéril y lavada 2 veces con medio fresco. Las células recuperadas se congelaron en nitrógeno líquido hasta el momento de uso.

2. 1. c.- Leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares humanos :

PMN fueron obtenidos de sangre humana fresca proveniente de dadores normales. A partir de sangre heparinizada se realizó primero una sedimentación de eritrocitos en dextrán (concentración final 0,6 %) por 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, 15 ml de sobrenadante fueron sembrados sobre 10 ml de un gradiente de Ficoll 9 % : Hypaque 33,9 % (24:10 v:v) y se centrifugó 30 minutos a 1500 rpm. Los PMN fueron recuperados en el pellet y los eritrocitos remanentes se eliminaron mediante una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente en solución de lisis (0,1 M EDTA - 10 mM KCO₃H - 155 mM NH₄Cl). Finalmente los PMN fueron lavados con PBS y resuspendidos en DMEM para los ensayos.

Los leucocitos mononucleares se aislaron a partir de la interfase del gradiente de Ficoll : Hypaque, se lavaron 3 veces con PBS y resuspendieron en DMEM para los ensayos. En ciertos experimentos las células mononucleares fueron depletadas de monocitos, utilizándose la propiedad de estos últimos de adherirse a superficies plásticas. Para ésto, los leucocitos mononucleares totales fueron incubados en cajas de cultivo plásticas por 1 hora a 37°C en medio RPMI, recuperándose aquellas células que permancieron en suspensión (linfocitos).

2. 1. d.- Células de leucemia mieloide crónica (CML) :

Dichas células fueron obtenidas a partir de sangre de un paciente con CML (A.M.) del Servicio de Hematología del Hospital de Clínicas. La sangre fue sometida a una sedimentación en dextrán (0,6 % concentración final) durante 1 hora a temperatura ambiente para eliminar los eritrocitos y los leucocitos fueron recuperados en el sobrenadante. Los eritrocitos remanentes fueron lisados por incubación con solución de lisis como se describió previamente en la sección 2. 1.c. Finalmente los leucocitos se lavaron con PBS y resuspendieron en DMEM para los ensayos.

2. 2.- Anticuerpos utilizados :

El AMC FC-2.15 (IgM) desarrollado en nuestro laboratorio [Mordoh J. 1994] fue utilizado en este estudio (ver sección 1. 4.a). Otros anticuerpos usados como control fueron: AMC murino 436 (IgM, ascitis), fuertemente reactivo con células MCF-7 [Nuti M. 1992] e IgM total murina (inmunoglobulinas purificadas, Sigma).

2. 3.- Complemento humano :

Como fuente de complemento se utilizó suero humano obtenido de donadores de sangre normales del Servicio de Hemoterapia del Hospital Naval Pedro Mallo.

2. 4.- Citotoxicidad mediada por complemento (CMC) anticuerpo-dependiente:

Un ensayo de liberación de [^{51}Cr] fue utilizado para testear la capacidad del AMC FC-2.15 de mediar lisis por complemento. Como células blanco se utilizaron: MCF-7, IIB-BR-G, células de carcinoma mamario humano aisladas a partir de dos tumores primarios, PMN humanos y células de CML. Para el ensayo, las células blanco ($2,5 \times 10^6$ /ml) fueron marcadas con [^{51}Cr] ($150 \mu\text{Ci/ml}$) ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, actividad específica 550 mCi/mg , New England Nuclear) por 2 hs a 37°C , y lavadas tres veces con medio de cultivo. Células marcadas con [^{51}Cr] (10^5 cél.) fueron incubadas en $100 \mu\text{l}$ DMEM más $100 \mu\text{l}$ de suero humano como fuente de complemento. AMC FC-2.15 purificado fue agregado a distintas concentraciones, en un rango entre 1 y $50 \mu\text{g/ml}$ (concentraciones finales). Las incubaciones se realizaron a 37°C por un período de tiempo especificado en cada experimento. Paralelamente se efectuaron incubaciones de células blanco resuspendidas en medio sólo, o con $0,1 \text{ M HCl}$ para evaluar la liberación espontánea y máxima de [^{51}Cr], respectivamente. Cada ensayo fue llevado a cabo por triplicado. Al final del período de incubación, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos y se cuantificó la radioactividad en los sobrenadantes en un contador γ . El porcentaje de citólisis específica fue calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ lisis específica} = \frac{\text{liberación experimental (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}{\text{liberación máxima (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}} \times 100$$

En determinados experimentos el complemento presente en el suero humano fue inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos o pretratado con 10 mM EDTA por 30 minutos. Se realizaron experimentos control utilizando AMC 436 (ascitis 1/50), IgM total murina ($50 \mu\text{g/ml}$) o PBS en lugar de FC-2.15.

2. 5.- Aislamiento de células MCF-7 resistentes a CMC FC-2.15 - dependiente:

Células MCF-7 (20×10^6) fueron incubadas en suspensión en 20 ml DMEM más 20 ml de suero humano y $50 \mu\text{g/ml}$ FC-2.15. En experimentos control el AMC FC-2.15 fue

omitido utilizándose en su lugar PBS ó 50 µg/ml de IgM total murina. Después de 90 minutos de incubación a 37°C con agitación, las células se lavaron tres veces con PBS y la viabilidad celular fue evaluada por el método de exclusión de azul tripán. La suspensión celular (en 20 ml) fue sembrada sobre 12,8 ml de un gradiente de Ficoll 9 % : Hypaque 33,9 % (22 : 10 v : v) y centrifugada durante 30 minutos a 2500 rpm para separar células viables de células muertas [Mordoh J. 1981]. Bajo estas condiciones, las células viables fueron recuperadas de la interfase del gradiente mientras que las células muertas sedimentaron formando un pellet.

2. 6.- Ensayos de citometría de flujo :

Células MCF-7 fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente con suero normal de cabra (10 % en PBS) y a continuación 60 minutos a 4°C con FC-2.15 (50 µg/ml en PBS). Posteriormente se lavaron tres veces con PBS e incubaron con un antisuero hecho en cabra anti-inmunoglobulinas totales de ratón, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, dilución 1/50 en PBS) por 60 minutos a 4°C. Finalmente se lavaron tres veces con PBS y la intensidad de fluorescencia fue analizada (5000 eventos) con un citómetro de flujo (FAC-Star Plus, Becton Dickinson). En experimentos control PBS o IgM total murina (50 µg/ml en PBS) se utilizaron en lugar de FC-2.15.

2. 7.- Citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (ADCC) :

Se realizó un ensayo de liberación de [⁵¹Cr] sobre células MCF-7 similar al descrito en la sección 2. 4, excepto que en lugar de suero humano se utilizaron diferentes células efectoras: leucocitos mononucleares totales, linfocitos aislados o PMN humanos. Las relaciones célula blanco : célula efectora ensayadas fueron 1:5, 1:10, 1:50, 1:75 y 1:100. Las incubaciones se realizaron durante 4 hs a 37°C y se utilizaron 50 µg/ml FC-2.15. En algunos experimentos los linfocitos fueron previamente estimulados 16 ó 48 hs con interleukina 2 recombinante humana (rIL-2) a 1200 U/ml [Morgan A. 1989; Munn D. 1987].

2. 8. - Iodinación del AMC FC-2.15 :

FC-2.15 fue radiomarcado con ¹²⁵I (Na¹²⁵I, New England Nuclear, 368 µCi/µl) usando el método de iodogen [Franker P.J. 1978]. Básicamente, 100 µg de AMC FC-2.15 en un

volúmen de 100 μ l de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, fueron agregados a 1 mCi de Na^{125}I en un tubo de vidrio previamente cubierto con 40 μ g de reactivo de iodogen (Pierce) e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación ocasional. El Na^{125}I libre fue separado de la proteína marcada por filtración a través de una columna de Sephadex G-50. Las fracciones eluidas fueron analizadas en un contador γ , y aquellas conteniendo [^{125}I]-FC-2.15 fueron reunidas y conservadas a 4°C. La actividad específica del [^{125}I]-FC-2.15 osciló entre 2,4 y 5,3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

2. 9.- Análisis de Scatchard :

Células MCF-7 en suspensión fueron usadas como antígeno blanco. Se incubaron 10^5 células en 100 μ l de PBS conteniendo cantidades crecientes de FC-2.15 (rango: 0,05 - 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 3 hs a 4°C. Para determinar la captación inespecífica, se realizaron incubaciones control en presencia de FC-2.15 frío en un exceso de 100 veces. Al finalizar el período de incubación, se efectuaron dos lavados con PBS y se cuantificó la radioactividad unida a las células en un contador γ . Se utilizó el análisis de Scatchard [Scatchard G. 1949] para calcular la constante de afinidad del AMC FC-2.15 (K_a) y el número promedio de sitios antigénicos por célula.

2. 10.- Ensayos de endocitosis del AMC FC-2.15 :

2. 10. a.- *Análisis de inmunofluorescencia :*

La capacidad de internalización de FC-2.15 fue evaluada por un ensayo de inmunofluorescencia diseñado para visualizar el AMC internalizado, sin interferencia del AMC unido a la superficie celular [Chang K. 1992]. Células MCF-7, plaqueadas un día antes del ensayo en placas de Petri de 35 mm, se incubaron 10 minutos con 0,1 % seroalbumina bovina en PBS (PBS/BSA) y a continuación 60 minutos a 4°C con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FC-2.15 en PBS. Luego de tres lavados con PBS/BSA, las placas fueron incubadas a 37°C durante 0, 30, 60 y 120 minutos para permitir al AMC unido a la superficie celular internalizarse dentro de la célula. Seguidamente se lavaron con PBS/BSA y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con buffer ácido (0,5 M NaCl / 0,2 M ácido acético pH 3,0) para remover el anticuerpo remanente que permanezca unido a la superficie celular. (Placas control no fueron tratadas con buffer ácido). Las células se

fijaron entonces durante 10 minutos en 3,7 % formaldehído en PBS y se lavaron con PBS/BSA. A continuación, se incubaron 10 minutos en PBS conteniendo 10 % suero normal de cabra y 0,1 % saponina, y luego 60 minutos a 4°C con un antisuero hecho en cabra anti-inmunoglobulinas de ratón, conjugado con FITC (Sigma) (dilución 1/50 en PBS/0,1% saponina). Por último se lavaron y fijaron nuevamente con 3,7 % formaldehído en PBS y se analizaron en un fotomicroscopio de epifluorescencia.

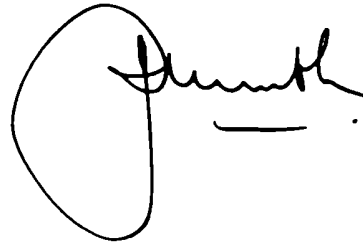
2. 10. b.- Radioinmunoensayo celular :

La cinética de internalización de FC-2.15 se estudió utilizando un radioinmunoensayo celular según fue descrito previamente [Press O. 1988], con modificaciones. Células MCF-7, plaqueadas en microplacas de 96 pocillos (25 000 células / pocillo) un día antes del ensayo, fueron incubadas 1 hora a 4°C con 100 µl de medio de cultivo conteniendo 5 µg/ml [¹²⁵I]-FC-2.15. Posteriormente se lavaron tres veces con medio frío e incubaron a 37°C por distintos intervalos de tiempo para permitir la internalización del AMC unido a la superficie celular. Se cuantificó entonces la radioactividad en el sobrenadante de cultivo, la superficie celular y el compartimiento intracelular, como se describe más adelante en esta misma sección. En algunos experimentos las incubaciones y lavados se realizaron en presencia de 50 µM monensina para inhibir la degradación lisosomal del AMC internalizado [Press O. 1988]. Se realizaron también incubaciones control para determinar la unión inespecífica, agregando FC-2.15 no marcado en un exceso de 100 veces respecto del [¹²⁵I]-FC-2.15.

Para cuantificar la radioactividad en los diferentes compartimientos, los sobrenadantes de cultivo fueron aspirados y analizados en un contador γ. El [¹²⁵I]-FC-2.15 unido a la superficie celular fue removido de la membrana mediante dos lavados ácidos consecutivos de 15 minutos cada uno. Ambos lavados fueron reunidos y la radioactividad presente en los mismos determinada en contador γ. (La solución de lavado fue preparada llevando medio MCF-7 a pH 2 con 1 M HCl y agregándole 2,5 mg/ml de papaína). La presencia de AMC internalizado (ácido-resistente) fue determinada disolviendo las células en 0,2 M NaOH y cuantificando la radioactividad en contador γ.

A continuación, los sobrenadantes fueron tratados por 60 minutos a 4°C con 5 % TCA para precipitar proteínas y estimar la proporción de productos de degradación de [¹²⁵I]-

FC-2.15 (TCA soluble). Los precipitados obtenidos y los sobrenadantes TCA-solubles fueron analizados en contador γ .

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'P' followed by a cursive name that appears to be 'P. Smith'.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Adams J.M.**, Cory S. Transgenic models of tumor development. *Science* **254**: 1161-1167; 1991.
- Alderson M.R.**, Hamlin I., Staunton M.D. The relative significance of prognostic factors in breast carcinoma. *Br.J.Cancer* **25**: 646-656; 1971.
- Alexander I.E.**, Shine J., Sutherland R.L. Progesterone regulation of estrogen receptor messenger RNA in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **4**: 821-828; 1990.
- Allard W.J.**, Neaman I.E., Elting J.J. y col. Non-specific cross-reacting antigen 50/90 is elevated in patients with breast, lung, and colon cancer. *Cancer Res.* **54**: 1227-1234; 1994.
- Allred D.C.** Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **85**: 200-206; 1993.
- Alonso K.** Human tumor stem cell assay. A prospective clinical trial. *Cancer* **54**: 2475-2479; 1984.
- Amadori D.**, Bonaguri C., Volpi A. y col. Cell kinetics and prognosis in gastric cancer. *Cancer* **71**: 1-4; 1993.
- Arakawa F.**, Kuroki M., Misumi Y. y col. Characterization of a cDNA encoding a new species of nonspecific cross-reacting antigen (NCA), a member of the CEA gene family. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **166**: 1063-1071; 1990.
- Audette M.**, Buchegger F., Schreyer M. y col. Monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen (CEA) identifies two new forms of crossreacting antigens of molecular weight 90,000 and 160,000 in normal granulocytes. *Mol.Immunol.* **24**: 1177-1186; 1987.
- Azumi N.**, Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and non epithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin and alcohol fixed tumors. *Am. J.Clin.Pathol* **88**: 286-296; 1987.
- Azzopardi J.G.** Classification of primary breast carcinoma. En: *Problems in Breast Pathology* (J.L. Bennington, ed.), pp. 240-257. W.B. Saunders Company Ltd, London; 1979.
- Bajorin D.**, Chapman P., Wong G. y col. Phase I evaluation of a combination of monoclonal antibody R24 and Interleukin 2 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Res.* **50**: 7490-7495; 1990.
- Ballaré C.**, Bravo A.I., Sorin I. y col. The expression of progesterone receptors coincides with an arrest of DNA synthesis in human breast cancer. *Cancer* **67**: 1352-1358; 1991.
- Bargmann C.I.**, Hung M.C., Weinberg R.A. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor related protein. *Nature* **316**: 226-230; 1986.
- Barnett T.**, Goebel S.J., Nothdurft M.A. y col. Carcinoembryonic antigen family: Characterization of cDNAs coding for NCA and CEA and suggestion of nonrandom sequence variation in their conserved loop domains. *Genomics* **3**: 59-66; 1988.
- Bast R.C.**, De Fabritis P., Lipton J. y col. Elimination of malignant clonogenic cells from human bone marrow using multiple monoclonal antibodies and complement. *Cancer Res.* **45**: 499-503; 1985.

- Battifora H.** Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins. *Am. J. Surg. Pathol.* **12**: 24-62; 1988.
- Benchimol S., Fuks A., Jothy S. y col.** Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intracellular adhesion molecule. *Cell* **57**: 327-334; 1989.
- Bergh J., Norberg T., Sjogren S. y col.** Complete sequencing of the *p53* gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Med.* **1**: 1029-1034; 1995.
- Berkenstam A., Glaumann H., Martin M. y col.** Hormonal regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in T47Dco and MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **3**: 22-28; 1989.
- Bishop J.M.** Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-248; 1991.
- Bloom H.J.G., Richardson W.W.** Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* **11**: 359-377; 1957.
- Bover L., Barrio M., Slavutsky I. y col.** Description of a new human breast cancer line, IIB-BR-G, established from a primary, undifferentiated tumor. *Breast Cancer Res. Treat.* **19**: 47-56; 1991.
- Boyd A.L., Samid D.** Review: Molecular biology of transgenic animals. *J. Anim. Sci* **71**(S3): 1-9; 1993.
- Bravo A.I., Sorin I., Guman N., Mordoh J.** Carcinoembryonic antigen and differentiation in human breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **4**: 3-10; 1985.
- Bremer E.G., Levery S.B., Sonnino S. y col.** Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MBr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J. Biol. Chem.* **259**: 14773-14777; 1984.
- Briggs S., Price M.R., Tendler S.J.** Fine specificity of antibody recognition of carcinoma-associated epithelial mucins: antibody binding to synthetic peptide epitopes. *Eur. J. Cancer* **29A**: 230-237; 1993.
- Brockhausen I., Yang J.M., Burchell C. y col.** Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.* **233**: 607-617; 1995.
- Brown A.M.C., Jeltsch J-M., Roberts M. y col.** Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6344-6348; 1984.
- Buick R.N.** ⁽¹⁾ The cellular basis of cancer chemotherapy. En: *Antineoplastic Agents* (W.A. Remers, ed.), pp. 1-39. John Wiley & Sons, Inc., NY; 1984.
- Buick R.N.** ⁽²⁾ Pollak M.N. Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells and oncogenes. *Cancer Res.* **44**: 4909-4918; 1984.
- Buick R.N., Mackillop W.J.** Measurement of self-renewal in culture of clonogenic cells from human ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer* **44**: 349-355; 1981.
- Burchell J., Gendler J., Taylor-Papadimitriou J. y col.** Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res.* **47**: 5476-5482; 1987.

- Burchell J.**, Taylor-Papadimitriou J., Boshell M. y col. A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int.J.Cancer* **44**: 691-696; 1989.
- Burguer P.C.**, Shibata T., Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells. *Am.J.Surg.Pathol.* **10**: 611-617; 1986.
- Calvo F.**, Brower M., Carney D.N. Continuous culture and soft agarose cloning of multiple human breast carcinoma cell lines in serum-free medium. *Cancer Res.* **44**: 4553-4559; 1984.
- Canevari S.**, Fossati G., Balsari A. Immunochemical analysis of the determinant recognized by a monoclonal antibody (MBr1) which specifically binds to human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **43**: 1301-1305; 1983.
- Carrasquillo J.A.**, Bunn P.A., Keenam T.A., y col. Radioimmuno-detection of cutaneous T-cell lymphoma with ¹¹¹In-labeled T101 monoclonal antibody. *N.Engl.J.Med.* **315**: 673-680; 1986.
- Carter C.L.**, Allen C., Henson D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cases. *Cancer* **63**: 181-187; 1989.
- Cassanelli S.**, Guillaud P., Louis J. y col. Image cytometry of progesterone receptor expression during the cell cycle in the MCF-7 cell line. *J.Histochem.Cytochem.* **39**: 1713-1718; 1991.
- Cassanelli S.**, Louis J., Seigneurin D. Progesterone receptor heterogeneity in MCF-7 cell subclones is related to clonal origin and kinetics data. *Tumour Biol.* **16**: 222-229; 1995.
- Cavaillès V.**, Augereau P., Rochefort H. Cathepsin D gene of human MCF7 cells contains estrogen-responsive sequences in its 5' proximal flanking region. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **174**: 816-824; 1991.
- Chalbos D.**, Escot C., Joyeux C. y col. Expression of the progestin-induced fatty acid synthetase in benign mastopathies and breast cancer as measured by RNA in situ hybridization. *J.Natl.Cancer Inst.* **82**: 602-606; 1990.
- Chalbos D.**, Galtier F. Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor on estradiol-dependent transcription. *J.Biol.Chem.* **269**: 23007-23012; 1994.
- Chalbos D.**, Vignon F., Keydar I. y col. Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T47D). *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **55**: 276-283; 1982.
- Chamness G.C.** Progestin action and progesterone receptors in breast cancer. Meeting Report. *Cancer Res.* **49**: 7176-7179; 1989.
- Chang K.**, Pai L., Batra J. y col. Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. *Cancer Res.* **52**: 181-186; 1992.
- Chen L.C.**, Kurisu W., Ljung B.M. y col. Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **84**: 506-510; 1992.
- Chen Y.H.**, Li C.D., Yap E.P., McGee J.O. Detection of loss of heterozygosity of p53 gene in paraffin-embedded breast cancers by non-isotopic PCR-SSCP. *J.Pathol.* **177**: 129-134; 1995.

- Cher M.L.**, Chew K., Rosenau W. y col. Cellular proliferation in prostatic adenocarcinoma as assessed by bromodeoxyuridine uptake and Ki-67 and PCNA expression. *Prostate* **26**: 87-93; 1995.
- Chu M.Y.**, Hagerty M.G., Wiemann M.C. y col. Differential characteristics of two newly established human breast carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **45**: 1357-1366; 1985.
- Clark G.M.**, McGuire W.L. Follow-up study of HER-2/*neu* amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* **51**: 944-948; 1991.
- Colcher D.**, Esteban J.M., Carrasquillo J.A. y col. Quantitative analysis of selective radiolabeled monoclonal antibody localization in metastatic lesions of colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **47**: 1185-1189; 1987.
- Colcher D.**, Horan Hand P., Nuti M., Schlom J. A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**: 3199-3203; 1981.
- Connolly K.M.**, Bogdanffy M.S. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *J.Histochem.Cytochem.* **41**: 1-6; 1993.
- Contegiacomo A.**, Mariani Constantini R., Muraro R. y col. Cell kinetics and tumor-associated antigen expression in human mammary carcinomas. *Int.J.Biol.Markers* **6**: 159-166; 1991.
- Costa A.**, Banadonna G., Villa E. y col. Labeling index as a prognostic marker in non-Hodgkin lymphomas. *J.Natl.Cancer Inst.* **66**: 1-5; 1981.
- Cox L.A.**, Chen G., Lee E.Y. Tumor suppressor genes and their roles in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* **32**: 19-38; 1994.
- Crispino S.**, Brenna A., Colombo D. y col. Ki-67 labeling index in breast cancer. *Tumori* **75**: 557-562; 1989.
- De Santes K.**, Slamon D., Anderson S.K. y col. Radiolabeled antibody targeting of the HER-2/*neu* oncoprotein. *Cancer Res.* **52**: 1916-1923; 1992.
- DeFriend D.J.**, Howell A., Nicholson R.I. y col. Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res.* **54**: 408-414; 1994.
- Doerr R.J.**, Abdel-Nabi H., Krag D. y col. Radiolabeled antibody imaging in the management of colorectal cancer. *Ann.Surg.* **214**: 118-124; 1991.
- Donehower L.A.**, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochim.Biophys.Acta* **1155**: 181-205; 1993.
- Dressler L.G.** DNA flow cytometry measurements as surrogate endpoints in chemoprevention trials: clinical, biological, and quality control considerations. *J.Cell Biochem., Suppl.* **17**: 212-218; 1993.
- Dressler L.G.**, Seamer L.C., Owens M.A. y col. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* **61**: 420-427; 1988.
- Durie B.G.M.**, Salmon S.E., Moon T.E. Pretreatment tumor mass, cell kinetics, and prognosis in multiple myeloma. *Blood* **55**: 364-372; 1980.

- Einspahr J.**, Alberts D., Xie T. y col. Comparison of proliferating cell nuclear antigen versus the more standard measures of rectal mucosal proliferation rates in subjects with a history of colorectal cancer and normal age-matched controls. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**: 359-366; 1995.
- Ellis G.**, Ferguson M., Yamanaka E. y col.. Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer* **63**: 2509-2514; 1989.
- Esteban J.M.**, Colcher D., Sugarbaker P. y col. Quantitative and qualitative aspects of radiolocalization in colon cancer patients of intravenously administered MAAb B72.3. *Int.J.Cancer* **39**: 50-59; 1987.
- Fairchild C.**, Ivy S.P., Kao-Shan C. y col. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequence from adriamycin - resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* **47**: 5141-5148; 1987.
- Fanidi A.**, Harrington E.A., Evan G.I. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* **359**: 554-556; 1992.
- Fearon E.R.**, Hamilton S.R., Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* **238**: 193-197; 1987.
- Fearon E.R.**, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767; 1990.
- Fialkow P.J.** Clonal origin of human tumors. *Biochim.Biophys.Acta* **458**: 283-321; 1976.
- Fidler I.J.**, Hart I.R. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* **217**: 998-1003; 1982.
- Finlay C.A.**, Hinds P.W., Tan T.H. y col. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with altered half life. *Mol.Cell.Biol.* **8**: 531-539; 1988.
- Finn O.J.** Immunity to epithelial tumors and mucin-based vaccine design. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **36**: 675; 1995.
- Fishel R.** Genomic instability, mutators, and the development of cancer: is there a role for p53. *J.Natl.Cancer Inst.* **88**: 1608-1609; 1996.
- Fogler W.**, Sun L., Klinger M. y col. Biological characterization of a chimeric mouse-human IgM antibody directed against the 17-1A antigen. *Cancer Immunol. and Immunother.* **30**: 43-50; 1989.
- Ford C.H.J.**, Casson A.G. Antibody-mediated targeting in the treatment and diagnosis of cancer: an overview. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **17**: 197-208; 1986.
- Franker P.J.**, Speck J.C. Protein and cell membrane iodination with sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycouril. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **80**: 849 - 857; 1978.
- Fritzer M.**, Szekeres T., Szuts V. y col. Cytotoxic effects of a doxorubicin-transferrin conjugate in multidrug-resistant KB cells. *Biochem.Pharmacol.* **51**: 489-493; 1996.
- Frixen U.H.**, Behrens J., Sachs M. y col. E-Cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J.Cell Biol.* **113**: 173-185; 1991.
- Fujii H.** ⁽¹⁾, Marsh C., Cairns P., y col. Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res.* **56**: 1493-1497; 1996.

- Fujii H.** ⁽²⁾, Szumel R., Marsh C. y col. Genetic progression, histological grade, and allelic loss in ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Cancer Res.* **56**: 5260-5265; 1996.
- Fujimori K.**, Covell D., Fletcher J. y col. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')₂ y Fab in tumors. *Cancer Res.* **49**: 5656-5663; 1989.
- Fuqua S.A.**, Fitzgerald S.D., Allred D.C. y col. Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res.* **52**: 483-486; 1992.
- Fuqua S.A.**, Fitzgerald S.D., Chamness G.C. y col. Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res.* **51**: 105-109; 1991.
- Galand P.**, Del Bino G., Morret M. y col. PCNA immunopositivity index as a substitute to ³H-thymidine pulse-labeling index (TLI) in methanol-fixed human lymphocytes. *Leukemia* **9**: 1075-1084; 1995.
- Gallinger S.**, Reilly R.M., Kirsh J.C. y col. Comparative dual label study of first and second generation antitumor-associated glycoprotein-72 monoclonal antibodies in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **53**: 271-278; 1993.
- Galfre G.**, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth.Enzimol.* **73**: 3-46; 1981.
- Gendler S.J.**, Lancaster C.A., Taylor-Papadimitriou J. y col. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J.Biol.Chem* **265**: 15286-15293; 1990.
- George A.**, Spooner R., Epenetos A. Applications of monoclonal antibodies in clinical oncology. *Immunol.Today* **15**: 559-561; 1994.
- Gerhard M.**, Juhl H., Kalthoff H. y col. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J.Clin.Oncol.* **12**: 725-729; 1994.
- Gill P.G.**, Tilley W.D., De Young N.J. y col. Inhibition of T47D human breast cancer cell growth by the synthetic progestin R5020: effects of serum, estradiol, insulin and EGF. *Breast Cancer Res.Treat.* **20**: 53-62; 1991.
- Giovanella B.**, Fogh J. The nude mouse in cancer research. *Adv.Cancer Res.* **44**: 69-120; 1985.
- Girling A.**, Bartkova J., Burchell J. y col. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int.J.Cancer* **43**: 1072-1076; 1989.
- Go V.L.W.**, Zamchek N. The role of tumor markers in the management of colorectal cancer. *Cancer* **30** (suppl.): 2618-2623; 1982.
- Gold P.** ⁽¹⁾, Freedman S.O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J.Exp.Med.* **121**: 439-462; 1965.
- Gold P.** ⁽²⁾, Freedman S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J.Exp. Med.* **122**: 467-481; 1965.
- Goldenberg D.M.**, Goldenberg H., Sharkey R.M. y col. Clinical studies of cancer radioimmuno-detection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with ¹²³I or ^{99m}Tc. *Cancer Res.* **50**: 909-921; 1990.

- Goldenberg D.M.**, Leland F., Kim E. y col. Use of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localisation of diverse cancers by external photoscanning. *N.Engl.J.Med.* **298**: 1384-1388; 1978.
- Goldenberg D.M.**, Preston D.F., Primus F.J. y col. Photoscan localisation of GW-39 tumors in hamsters using radiolabelled anticarcinoembryonic antigen immunoglobulin G. *Cancer Res.* **34**: 1-9; 1974.
- Gompel A.**, Malet C., Spritzer P. y col. Progestin effect on cell proliferation and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal human breast cells in culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**: 1174-1180; 1986.
- Gottesman M.M.**, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu.Rev.Biochem.* **62**: 385-427; 1993.
- Griffin T.W.**, Bodgen A.E., Reich S.D. y col. Initial clinical trials of the subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. *Cancer* **52**: 2185-2192; 1983.
- Groffen J.**, Stephenson J.R., Heisterkamp N. y col. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**: 93-99; 1984.
- Gudas J.M.**, Nguyen H., Li T. y col. Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **55**: 4561-4565; 1995.
- Gusterson B.**, Gelber R., Goldhirsch A. y col. Prognostic importance of *c-erbB-2* expression in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* **10**: 1049-1056; 1992.
- Hakomori S.** Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.* **45**: 2405-2414; 1985.
- Hamburger A.W.**, Salmon S.E. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-463; 1977.
- Hancock M.C.**, Langton B.C., Chan T. y col. A monoclonal antibody against the *c-erbB-2* protein enhances the cytotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines. *Cancer Res.* **51**: 4575-4580; 1991.
- Harris J.R.**, Morrow M., Banadonna G. Cancer of the breast. En: Principles and Practice of Oncology (V.T. De Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, eds.) - Capítulo 40. J.B. Lippincott Co., Philadelphia; 1993.
- Hartwell L.** Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* **71**: 543-546; 1992.
- Hartwerth I.M.**, Wels W., Marte B.M. y col. Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the *erbB-2* receptor function as partial ligand agonist. *J.Biol.Chem.* **267**: 15160-15167; 1992.
- He W.**, Meyer J.S., Scrivner D.L. y col. Assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in breast cancer using anti-PCNA PC10 and 19A2: correlation with 5-bromo-2'-deoxyuridine or tritiated thymidine labeling and flow cytometric analysis. *Biotech.Histochem.* **69**: 203-212; 1994.
- Hefta S.A.**, Paxton R.J., Shively J.E. Sequence and glycosylation site identity of two distinct glycoforms of nonspecific cross-reacting antigen as demonstrated by sequence analysis and fast atom bombardment mass spectrometry. *J.Biol.Chem.* **265**: 8618-8626; 1990.

- Herman C.J.** Citometric DNA analysis in the management of cancer: clinical and laboratory considerations. *Cancer* **69**: 1553-1556; 1992.
- Hertel A., Baum R.P., Lorenz M. y col.** Immunoscintigraphy using a technetium-99m labelled monoclonal anti-CEA antibody in the follow-up of colorectal cancer and other tumours producing CEA. *Br.J.Cancer* **62** (Suppl. X): 34-36; 1990.
- Hilkens J., Vos H.L., Wesseling J. y col.** Is episialin / MUC1 involved in breast cancer progression? *Cancer Lett.* **90**: 27-33; 1995.
- Hinds P.W., Weinberg R.A.** Tumor suppressor genes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**: 135-141; 1994.
- Hissom J.R., Moore M.R.** Progestin effects on growth in the human breast cancer cell line T-47D - Possible therapeutic implications. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **145**: 706-711; 1987.
- Ho J.J., Kim Y.S.** Serological pancreatic tumor markers and the MUC1 apomucin. *Pancreas* **9**: 674-691; 1994.
- Ho S.B., Kim Y.S.** Carbohydrate antigens on cancer-associated mucin-like molecules. *Semin.Cancer Biol.* **2**: 389-400; 1991.
- Horwitz K.B.** How do breast cancers become hormone resistant? *J.Steroid Biochem.Mol. Biol.* **49**: 295-302; 1994.
- Horwitz K.B., McGuire W.L.** Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. *J. Biol.Chem.* **253**: 2223-2228; 1978.
- Hoskins K., Weber B.L.** The biology of breast cancer. *Curr.Opin.Oncol.* **6**: 554-559; 1994.
- Hudziak R.M., Schlessinger J., Ullrich A.** Increased expression of the putative growth factor receptor p185^{HER2} causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc.Natl. Acad. Sci USA* **84**: 7159-7163; 1987.
- Hung M-C., Matin A., Zhang Y. y col.** HER-2/*neu*-targeting gene therapy - A review. *Gene* **159**: 65-71; 1995.
- Hunter T.** Cooperation between oncogenes. *Cell* **64**: 249-270; 1991.
- Hunter T.** Oncogenes and cell cycle. *Cur.Opin.Genet.Devel.* **3**: 1-4; 1993.
- Hynes N.E., Stern D.F.** The biology of *erbB-2 / neu / HER-2* and its role in cancer. *Biochim.Biophys. Acta* **1198**: 165-184; 1994.
- Iatropoulus M.J., Williams G. M.** Proliferation markers. *Exp.Toxicol.Pathol.* **48**: 175-181; 1996.
- Imai K., Makiguchi Y.** Functions of mucin molecules in gastrointestinal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **97**: 152-159; 1996.
- Jakesz R., Smith C.A., Aitken S. y col.** Influence of cell proliferation and cell cycle phase on expression of estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **44**: 619-625; 1984.
- Jeng M.H., Langan-Fahey S.M., Jordan V.C.** Estrogenic actions of RU486 in hormone-responsive MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinol.* **132**: 2622-2630; 1993.

- Jeng M.H., Parker C.J., Jordan V.C. Estrogenic potential of progestins in oral contraceptives to stimulate human breast cancer cell proliferation. *Cancer Res.* **52**: 6539-6546; 1992.
- Johnson V.G., Schlom J., Paterson A.J. y col. Analysis of a human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) identified by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res.* **46**: 850-857; 1986.
- Kahlenberg M.S., Stoler D.L., Basik M. y col. p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. *J.Natl.Cancer Inst.* **88**: 1665-1670; 1996.
- Kamel O.W., Franklin W.A., Ringus J.C. y col. Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. *Am.J.Pathol.* **134**: 107-113; 1989.
- Kasprzyk P.G., Song S.U., Di Fiore P.P. y col. Therapy of an animal model of human gastric cancer using a combination of anti-*erbB*-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **52**: 2771-2776; 1992.
- Kastner P., Krust A., Turcotte B. y col. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptors form A and B. *EMBO J.* **9**: 1603-1614; 1990.
- Kelsey J.L., Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu.Rev.Public.Health* **17**: 47-67; 1996.
- Khan W.N., Frångsmyr L., Teglund S. y col. Identification of three new genes and estimation of the size of the carcinoembryonic antigen family. *Genomics* **14**: 384-390; 1992.
- Kim Y.S. Altered glycosylation of mucin glycoproteins in colonic neoplasia. *J.Cell Biochem. (Suppl)* **16G**: 91-96; 1992.
- Kim Y.S. Carbohydrate antigen expression in colorectal cancer. *Semin.Cancer Biol.* **1**: 189-197; 1990.
- Kjeldsen T., Clausen H., Hirohashi S. y col. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2→6 α -N-acetylgalactosaminyl (Sialosyl-Tn) epitope. *Cancer Res.* **48**: 2214-2220; 1988.
- Klein G., Klein E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature* **315**: 190-195; 1985.
- Klinge C.M., Peale F.V., Hilf R. y col. Cooperative estrogen receptor interaction with consensus or variant estrogen responsive elements *in vitro*. *Cancer Res.* **52**: 1073-1081; 1992.
- Köhler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature* **256**: 495-497; 1975.
- Kovach J.S., Hartmann A., Blaszyk H. y col. Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **93**: 1093-1096; 1996.
- Kufe D.W., Nadler L., Sargent L. y col. Biological behavior of human breast carcinoma-associated antigens expressed during cellular proliferation. *Cancer Res.* **43**: 851-857; 1983.
- Kung W.M., Silver E., Novak I. y col. Effects of hormones and growth factors on the growth of six human breast cancer cell lines in defined media. *Contr.Oncol* **23**: 26-32; 1986.

- Lane D.P.** p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16; 1992.
- Levesque M.A.**, Diamandis E.P., Yu H. y col. Quantitative analysis of mutant p53 protein in breast tumor cytosols and study of its association with other biochemical prognostic indicators in breast cancer. *Breast Cancer Treat.* **30**: 179-195; 1994.
- Lidor Y.J.**, O'Briant K.C., Xu F.J. y col. Alkylating agents and immunotoxins exert synergistic cytotoxic activity against ovarian cancer cells. Mechanism of action. *J. Clin. Invest.* **92**: 2440-2447; 1993.
- Liebmann J.E.**, Fisher J., Teague D. y col. Sequence dependence of paclitaxel (Taxol) combined with cisplatin or alkylators in human cancer cells. *Oncol. Res.* **6**: 25-31; 1994.
- Ligtenberg M.J.**, Vos H.L., Gennissen A.M., Hilkens J. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J. Biol. Chem.* **265**: 5573-5578; 1990.
- Lippman M.E.** The development of biological therapies for breast cancer. *Science* **259**: 631-632; 1993.
- Livingstone L.R.**, White A., Sprouse J. y col. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* **70**: 923-935; 1992.
- LoBuglio A.**, Saleh M., Lee J. y col. Phase I trial of multiple large doses of murine monoclonal antibody CO17-1A. I. Clinical Aspect. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**: 932-936; 1988.
- Lohmann D.**, Ruhri C., Schmitt M. y col. Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation in breast cancer. Occurrence of false-positives and false-negatives. *Diagn. Mol. Pathol.* **2**: 36-41; 1993.
- Lykkesfeldt A.E.**, Larsen J.K., Christensen I.J. Cell cycle analysis of estrogen stimulation and antiestrogen inhibition of growth of the human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res. Treat* **7** (Suppl.) S83-90; 1986.
- Mach J.P.**, Carrel S., Merenda C. y col. In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. *Nature* **248**: 704-706; 1974.
- Mach J.P.**, Carrel S., Forni M. y col. Tumor localization of radiolabelled antibodies against carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **303**: 5-10; 1980.
- Mackillop W.J.**, Buick R.N. Cellular heterogeneity in human ovarian carcinoma studied by density gradient fractionation. *Stem Cells* **1**: 355-366; 1982.
- Mackillop W.J.**, Ciampi A, Till J.E., Buick R.N. A stem cell model of human tumor growth: Implications for tumor cell clonogenic assays. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**: 9-16; 1983.
- Mackillop W.J.** ⁽²⁾, Trent J.M., Stewart J.S., Buick R.N. Tumor progression studied by analysis of cellular features of serial ascitic ovarian carcinoma tumors. *Cancer Res.* **43**: 874-878; 1983.
- Malkin D.** p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**: 197-213; 1994.

- Marshall E.** Breast cancer: Stalemate in the war on cancer. *Science* **254**: 1719-1720; 1992.
- Marshall E.** Search for a killer: focus shifts from fat to hormones. *Science* **259**: 618-621; 1993.
- Masiakowski P., Breathnach R., Bloch J. y col.** Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* **10**: 7895-7903; 1982.
- Mc Clean S., Hill B.T.** An overview of membrane, cytosolic and nuclear proteins associated with the expression of resistance to multiple drugs in vitro. *Biochim.Biophys.Acta* **1114**: 107-127; 1992.
- McGuire W.L., Clark G.M., Dressler L.B. y col.** Role of steroid hormone receptors as prognostic factors in primary breast cancer. *NCI Monogr.* **1**: 19-23; 1986.
- Ménard S., Tagliabue E., Canevari S., Fossati G., Colnaghi M.I.** Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res.* **43**: 1295-1300; 1983.
- Meyer D., Birchmeier C.** Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378**: 386-390; 1995.
- Meyer J.S. Wittliff J.L.** Regional heterogeneity in breast carcinoma: thymidine labelling index, steroid hormone receptors, DNA ploidy. *Int.J.Cancer* **47**: 213-220; 1991.
- Meyer J.S., Koehm S.L., Hughes J.M. y col.** Bromodeoxyuridine labeling for S-phase measurement in breast carcinoma. *Cancer* **71**: 3531-3540; 1993.
- Meyer J.S., Province M.** Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: prognostic power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res. Treat.* **12**: 191-204; 1988.
- Miotti S., Leoni F., Canevari S., Sonnino S., Colnaghi M.I.** Immunoblotting detection of carbohydrate epitopes in glycolipids and glycoproteins of tumoral origin. En: *Gangliosides and Cancer* (H.F.Oettgen ed.), Cap. 17, pp.169-176. VCH Publishers, New York, NY, 1989.
- Mordoh J., Chacon R., Filmus J.** Isolation of tumor cells from patients with osteosarcoma and analysis of their sensitivity to Methotrexate. *Cancer Res.* **41**: 3621-3628; 1981.
- Mordoh J., Leis S., Bravo A.I. y col.** Description of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reactive with human breast cancer and other human neoplasias. *Int.J.Biol. Markers* **9**: 125-134; 1994.
- Mordoh J., Silva C., Albarellos M. y col.** A phase I clinical trial in cancer patients of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reacting with tumor proliferating cells. *J.Immunother.* **17**: 151-160; 1995.
- Morgan A., Sullivan W., Graves S. y col.** Murine monoclonal IgG3 to human colorectal tumor-associated antigens: Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by Interleukin 2. *Cancer Res.* **49**: 2773-2776; 1989.
- Mori M., Mimori K., Inoue H. y col.** Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **55**: 3417-3420; 1995.
- Munn D., Cheung N.** Interleukin-2 enhancement of monoclonal antibody-mediated cellular cytotoxicity against human melanoma. *Cancer Res.* **47**: 6600-6605; 1987.

- Muraro R.**, Kuroki M., Wunderlich D. y col. Generation and characterization of B72.3 second generation (CC) monoclonal antibodies reactive with TAG-72 antigen. *Cancer Res.* **48**: 4588-4596; 1988.
- Muraro R.**, Wunderlich D., Thor A. y col. Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes on carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinomas versus normal adult tissues. *Cancer Res.* **45**: 5769-5780; 1985.
- Musgrove E.A.**, Lee C.S., Sutherland R.L. Progesterins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol. Cell Biol.* **11**: 5032-5043; 1991.
- Myklebust A.T.**, Godal A., Pharo A. y col. Eradication of small cell lung cancer cells from human bone marrow with immunotoxins. *Cancer Res.* **53**: 3784-3788; 1993.
- Nadler L.M.**, Takvorian T., Botnick L. y col. Anti-B1 monoclonal antibody and complement treatment in autologous bone-marrow transplantation for relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* **2**: 427-431; 1984.
- Nakamura K.**, Koike M., Shitara K. y col. Chimeric anti-ganglioside GM2 antibody with antitumor activity. *Cancer Res.* **54**: 1511-1516; 1994.
- Nap M.**, Hammarström M.L., Börner O. y col. Specificity and affinity of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* **52**: 2329-2339; 1992.
- Neuberger M.**, Rajewsky K. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur. J. Immunol.* **11**: 1012-1016; 1981.
- Nowell P.C.** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-28; 1976.
- Nuti M.**, Turchi V., Masci A.M. y col. Characterization of monoclonal antibody 436 recognizing the ARG-PRO-ALA-PRO sequence of the polymorphic epithelial mucin (PEM) protein core in breast carcinoma cells. *Int. J. Biol. Markers* **7**: 71-79; 1992.
- Oikawa S.**, Inuzuka C., Kuroki M. y col. Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 39-45; 1989.
- Orlandi R.**, Canevari S., Conde F.P. y col. Immunoconjugate generation between the ribosome inactivating protein restrictocin and an anti-human breast carcinoma MAb. *Cancer Immunol. Immunother.* **26**: 114-120; 1988.
- Orlandi R.**, Figini M., Tomassetti A. y col. Characterization of a mouse-human chimeric antibody to a cancer-associated antigen. *Int. J. Cancer* **52**: 588-593; 1992.
- Osborne C.K.**, Arteaga C.L. Autocrine and paracrine growth regulation of breast cancer: clinical implications. *Breast Cancer Res. Treat* **15**: 3-11; 1990.
- Palmiter R.D.** Germ line transformation of mice. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 465-499; 1986.
- Patel D.D.**, Bhatavdekar J.M., Chikhlikar P.R. y col. Node negative breast carcinoma: hyperprolactinemia and/or overexpression of p53 as an independent predictor of poor prognosis compared to newer and established prognosticators. *J. Surg. Oncol.* **62**: 86-92; 1996.

- Patton S., Gendler S.J., Spicer A.P.** The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim.Biophys.Acta* **1241**: 407-423; 1995.
- Pavelic Z.P., Pavelic K., Carter C.P. y col.** Heterogeneity of c-myc expression in histologically similar infiltrating ductal carcinomas of the breast. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **118**: 16-22 ; 1992.
- Peterson J.A., Couto J.R., Taylor M.R. y col.** Selection of tumor-specific epitopes on target antigens for radioimmunotherapy of breast cancer. *Cancer Res.* **55**: 5847s-5851s; 1995.
- Pietra N., Sarli L., Sansebastiano G. y col.** Prognostic value of ploidy, cell proliferation kinetics, and conventional clinicopathologic criteria in patients with colorectal carcinoma: a prospective study. *Dis. Colon Rectum* **39**: 494-503; 1996.
- Podhajcer O.L., Bravo A.I., Sorin I. y col.** Determination of DNA synthesis, estrogen receptors, and carcinoembryonic antigen in isolated cellular subpopulations of human breast cancer. *Cancer* **58**: 720-729; 1986.
- Podhajcer O.L., Resnicoff M., Bover L. y col.** Effect of estradiol and tamoxifen on the anchorage-independent growth of the subpopulations derived from MCF-7 breast carcinoma cells: cytogenetic analysis of the stem cell subpopulation. *Exp.Cell Res.* **179**: 58-64; 1988.
- Potten C.J., Schofield R., Lajtha L.G.** A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochim.Biophys.Acta* **560**: 281-299; 1979.
- Poulsen H.S., Jensen J., Hermansen C.** Human breast cancer: Heterogeneity of estrogen binding sites. *Cancer* **48**: 1791-1793; 1981.
- Press O., Hansen J., Farr A. y col.** Endocytosis and degradation of murine anti-human CD3 monoclonal antibodies by normal and malignant T-lymphocytes. *Cancer Res.* **48**: 2249-2257; 1988.
- Pricop L., Rabinowich H., Morel P. y col.** Characterization of the Fc μ receptor of human natural killer cells. *J.Immunol.* **151**: 3018-3029; 1993.
- Resnicoff M., Medrano E.E., Podhajcer O.L. y col.** Subpopulations of MCF-7 cells separated by Percoll gradient centrifugation: A model to analyze the heterogeneity of human breast cancer. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* **84**: 7295-7299; 1987.
- Riethmuller G., Schneider-Gadicke E., Schlimok G. y col.** Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet* **343**: 1177-1183; 1994.
- Ro J., Sahin A., Ro J.Y. y col.** Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum.Pathol.* **21**:787-791; 1990.
- Robbins P.F., Eggenesperger D., Qi C.F. y col.** Definition of the expression of the human carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen in human breast and lung carcinomas. *Int..J.Cancer* **53**: 892-897; 1993.
- Rochefort H.** Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. *Ciba Found.Symp.* **191**: 254-265; 1995.
- Rughetti A., Turchi V., Ghetti C.A. y col.** Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. *Cancer Res.* **53**: 2457-2459; 1993.

- Saez R.A.**, McGuire W.L., Clark G.M. Prognostic factors in breast cancer. *Semin.Surg.Oncol* **5**: 102-110; 1989.
- Saleh M.**, Khazaeli M., Grizzle E. y col. A Phase I clinical trial of murine monoclonal antibody D612 in patients with metastatic gastrointestinal cancer. *Cancer Res.* **53**: 4555-4562; 1993.
- Saleh M.**, Khazaeli M., Wheeler R. y col. Phase I trial of a murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res.* **52**: 4342-4347; 1992.
- Salmon S.**, Grogan T., Miller T. y col. Prediction of doxorubicin resistance in vitro in myeloma, lymphoma, and breast cancer by P-glycoprotein staining. *J.Natl.Cancer Inst.* **81**: 696-701; 1989.
- Salmon S.E.**, Hamburger A.W., Soehnlen B. y col. Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anti-cancer drugs. *N.Engl.J.Med.* **298**: 1321-1325; 1978.
- Savoldi G.**, Ferrari F., Ruggeri G. y col. Progesterone agonists and antagonists induce down- and up-regulation of estrogen receptors and estrogen inducible genes in human breast cancer cell lines. *Int. J. Biol.Markers* **10**: 47-54; 1995.
- Scatchard G.** The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**: 660-672; 1949.
- Schlimok G.**, Funke I., Bock B. y col. Epithelial cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: Immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. *J. Clin.Oncol.* **8**: 831-837; 1990.
- Schlom J.**, Eggenesperger D., Colcher D. y col. Therapeutic advantage of high-affinity anticarcinoma radioimmunoconjugates. *Cancer Res.* **52**: 1067-1072; 1992.
- Selby P.**, Bizzari J-P., Buick R.N. Therapeutic implications of a stem cell model in human breast cancer: A hypothesis. *Cancer Treat.Rep.* **67**: 659-663; 1983.
- Seregni E.**, Bombardieri E., Bogni A. y col. The role of serum carcinoembryonic antigen (CEA) in the management of patients with colorectal carcinoma: the experience of the Instituto Tumori of Milan. *Int.J.Biol.Markers* **7**: 167-170; 1992.
- Shi Y.E.**, Liu Y.E., Lippman M.E. y col. Progestins and antiprogestins in mammary tumour growth and metastasis. *Hum.Reprod.* **9**: 162-173; 1994.
- Shin S.I.** Use of nude mice for tumorigenicity testing and mass propagation. *Meth.Enzimol.* **58**: 370-379; 1979.
- Silvestrini R.**⁽¹⁾ Daidone M.G., Mastore M. y col. Cell kinetics as a predictive factor in node-positive breast cancer treated with adjuvant hormone therapy. *J.Clin.Oncol.* **11**: 1150-1155; 1993.
- Silvestrini R.**⁽²⁾ Benini E., Daidone M.G. y col. p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J.Natl.Cancer.Inst.* **85**: 965-970; 1993.
- Silvestrini R.**, Daidone M.G., Luisi A. y col. Biologic and clinicopathologic factors as indicators of specific relapse types in node-negative breast cancer. *J.Clin.Oncol* **13**: 697-704; 1995.

- Silvestrini R.**, Daidone M.G., Valagussa P. y col. Cell kinetics as a prognostic marker in locally advanced breast cancer. *Cancer Treat.Rep.* **71**: 375-379; 1987.
- Silvestrini R.**, Daidone M.G., Valagussa P. y col. ³H-thymidine-labeling index as a prognostic indicator in node-positive breast cancer. *J.Clin.Oncol.* **8**: 1321-1326; 1990.
- Sivolapenko G.B.**, Douli V., Pectasides D. y col. Breast cancer imaging with radiolabelled peptide from complementary-determining region of antitumour antibody. *Lancet* **346**: 1662-1666; 1995.
- Sjogren S.**, Inganas M., Norberg T. y col. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J.Natl.Cancer Inst.* **88**: 173-182; 1996.
- Slamon D.J.**, Godolphin W., Jones L.A. y col. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast an ovarian cancer. *Science* **244**: 707-712; 1989.
- Slamon D.J.**, Clark G.M., Wong S.G. y col. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**: 177-182; 1987.
- Sluysers M.** Steroid / thyroid receptor-like proteins with oncogenic potential: a review. *Cancer Res.* **50**: 451-458; 1990.
- Smith H.S.**, Wolman S.R., Hackett A.J. The biology of breast cancer at the cellular level. *Biochim. Biophys.Acta* **738**: 103-123; 1984.
- Solomon E.**, Borrow J., Goddard A.D. Chromosome aberrations and cancer. *Science* **254**: 1153-1160; 1991.
- Sorin I.**, Bravo A.I., Podhajcer O.L. y col. Analysis of DNA synthesis and carcinoembryonic antigen expression in human breast cancer. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* **7**: 35-42; 1988.
- Soule H.D.**, Vazquez J., Long A. y col. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* **51**: 1409-1415; 1973.
- Spyratos F.**, Martin P.M., Hacene K. y col. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **84**: 1266-1272; 1992.
- Stenkvist B.**, Bengtsson E., Dahlqvist B. y col. Predicting breast cancer recurrence. *Cancer* **50**: 2884-2893; 1982.
- Sutherland R.L.**, Green M.D., Hall R.E. y col. Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in the G₀-G₁ phase of the cell cycle. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* **19**: 615-621; 1983.
- Sutherland R.L.**, Hall R.E., Pang G.Y. y col. Effect of medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* **48**: 5084-5091; 1988.
- Szollosi J.**, Balazs M., Feuerstein B.G. y col. ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res.* **55**: 5400-5407; 1995.
- Takeichi M.** Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr.Opin.Cell Biol.* **5**: 806-811; 1993.

- Taki T.** Cancer-associated alterations of glycoconjugates: Special reference to glycosphingolipids. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **97**: 123-130; 1996.
- Taylor R.E., Powles T.J., Humphreys J. y col.** Effects of endocrine therapy on steroid-receptor content of breast cancer. *Br.J.Cancer* **45**: 80-85; 1982.
- Teixeira M.R., Pandis N., Bardi G. y col.** Clonal heterogeneity in breast cancer: karyotypic comparisons of multiple intra- and extra-tumorous samples from 3 patients. *Int.J.Cancer* **63**: 63-68; 1995.
- Teixeira M.R., Pandis N., Bardi G. y col.** Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. *Cancer Res.* **56**: 855-859; 1996.
- Thompson E.W., Reich R., Shima T.B. y col.** Differential regulation of growth and invasiveness of MCF-7 breast cancer cells by antiestrogens. *Cancer Res.* **48**: 6764-6768; 1988.
- Thompson J.A.** Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol.* **16**: 10-16; 1995.
- Thompson J.A., Grunert F., Zimmermann W.** Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J.Clin.Lab.Anal.* **5**: 344-366; 1991.
- Thor A., Ohuchi N., Szpak C.A. y col.** Distribution of oncofetal antigen Tumor-associated Glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res.* **46**: 3118-3124; 1986.
- Thorpe S.M., Rose C., Rasmussen B.B. y col.** Prognostic value of steroid hormone receptors: Multivariate analysis of systematically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res.* **47**: 6126-6133; 1987.
- Tlsty T.D., Margolin B.H., Lum K.** Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **86**: 9441-9445; 1989.
- Toikkanen S., Helin H., Isola J. y col.** Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J.Clin.Oncol.* **10**: 1044-1048; 1992.
- Trail P.A., Wilner D., Lasch S.J. y col.** Cure of xenografted human carcinomas by BR96-doxorubicin immunoconjugates. *Science* **261**: 212-215; 1993.
- Tsai C-M., Chang K-T., Perng R-P. y col.** Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with HER-2/*neu* gene expression but not with ras gene mutations. *J.Natl.Cancer Inst.* **85**: 897-901; 1993.
- van Bogaert L.J., Maldague P.** Histologic classification of pure primary epithelial breast cancer. *Hum.Pathol.* **9**: 175-180; 1978.
- van der Burg B.** Sex steroids and growth factors in mammary cancer. *Acta.Endocrinol. (Copenh.)* **125** Suppl 1: 38-41; 1991.
- van der Burg B., Kalkhoven E., Isbrucker L. y col.** Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions. *J.Steroid. Biochem.Mol.Biol.* **42**: 457-465; 1992.

- Verma M.** Carcinoma associated mucins: molecular biology and clinical applications. *Cancer Biochem.Biophys.* **14**: 151-162; 1994.
- Viale G., Flamini G., Grassi F. y col.** Idiotypic replica of an anti-human tumor-associated antigen monoclonal antibody. Analysis of monoclonal Ab1 and Ab3 fine specificity. *J.Immunol.* **143**: 4338-4344; 1989.
- Vogelstein B., Kinzler K.W.** The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**: 138-141; 1993.
- Vollmer G., Gerdes J., Knuppen R.** Relationship of cytosolic estrogen and progesterone receptor content and the growth fraction in human mammary carcinomas. *Cancer Res.* **49**: 4011-4014; 1989.
- Von Hoff D.D., Casper J., Bradley E. y col.** Association between human tumor colony forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.* **70**: 1027-1032; 1981.
- Von Hoff D.D., Clark G.M., Stogdill B.J. y col.** Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.* **43**: 1926-1931; 1983.
- von Kleist S., Chavanel G., Burtin P.** Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **69**: 2492-2494; 1972.
- Wagener C., Müller-Waliraf R., Nisson S. y col.** Localization and concentration of carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal tumors: Correlation with CEA levels in plasma. *J.Natl.Cancer Inst.* **67**: 539- 547; 1981.
- Watts C.K., Sweeney K.J., Warlters A. y col.** Antiestrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* **31**: 95-105; 1994.
- Wawrzynczac E.J., Derbyshire E.J.** Immunotoxins:The power and the glory. *Immunol.Today* **13**: 381-383; 1992.
- Weinberg R.A.** Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J.Clin.* **44**: 160-170; 1994.
- Weinstein J.N., Eger R., Covell D. y col.** The pharmacology of monoclonal antibodies. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* **507**: 199-207; 1987.
- Wright C., Angus B., Nicholson S. y col.** Expression of *c-erbB-2* oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* **49**: 2087-2090; 1989.
- Wright J.A., Smith E.S., Watt F.M. y col.** DNA amplication is rare in normal human cells. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* **87**: 1791-1795; 1990.
- Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T. y col.** Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* **319**: 230-234; 1986.
- Yin Y., Tainsky M.A., Bischoff F.Z. y col.** Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70**: 737-748; 1992.
- Zhang S., Graeber L.A., Helling F. y col.** Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in mice. *Cancer Res.* **56**: 3315-3319; 1996.

ABREVIATURAS

ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN	ácido desoxiribonucleico
Ag	antígeno
AMC	anticuerpo monoclonal
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BrdU	5-Bromodeoxiuridina
BSA	seroalbúmina bovina
CEA	antígeno carcinoembrionario
CMC	citotoxicidad mediada por complemento
CML	leucemia mieloide crónica
DAB	diaminobencidina
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
dT	timidina
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
FBS	suero fetal bovino
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Ig	inmunoglobulina
Ka	constante de afinidad
MDR	resistencia múltiple a drogas
MEM	medio mínimo esencial Eagle
NCA	“nonspecific cross-reacting antigen”

NOS	“not otherwise specified”: carcinomas ductales infiltrantes sin rasgos histológicos especiales
NRGs	neuregulinas
OCT	medio de inclusión de tejidos para la realización de cortes histológicos en crióstato
PBS	buffer fosfato salino
PEM	mucina epitelial polimórfica
Pg	progesterona
PMN	leucocitos polimorfonucleares
RE	receptor estrogénico
RPg	receptor de progesterona
TAG-72	glicoproteína asociada a tumor
TBS	buffer tris salino
TCA	ácido tricloroacético
TLI	índice de marcación con timidina tritiada

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Mordoh, por darme la posibilidad de integrar su grupo de trabajo, por la dirección y supervisión de esta Tesis.

A las autoridades del Hospital Interzonal de Agudos Dr. Mariano Castex y particularmente al Dr. Natalio Guman, por permitirme desarrollar gran parte del trabajo de Tesis en dicha Institución.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por haberme permitido completar este trabajo en el Instituto.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA, por otorgarme el cargo que posibilitó la realización de mis tareas.

A la Fundación Sales, por el valioso apoyo económico brindado a nuestro grupo de trabajo durante todos estos años.

A la Dra. Inés Bravo y la Dra. Irene Sorín, por haber colaborado en muchos de los experimentos reportados en este trabajo; por sus enseñanzas de patología y por los buenos ratos compartidos en el Castex.

Al Dr. Osvaldo Podhajcer, con quien aprendí a trabajar en el laboratorio, por muchas charlas constructivas y por el apoyo que me brindó cada vez que necesité de él.

A la Dra. Laura Bover, a quien le debo muchos de mis conocimientos adquiridos estos años y también muchos de mis logros personales. Por estar siempre atenta a las necesidades de cada uno de los integrantes del laboratorio y brindar su ayuda sincera y desinteresada en todo momento.

A mis compañeras del laboratorio 101, Mariana Capurro, Fernanda Ledda, Verónica Morvillo, Marcela Barrio, Paula Portela, Claudia Kairiyama, Soraya Adris; y a Liliana Dain y Susana Laucella del Castex, por toda la ayuda que me brindaron durante estos años, por compartir mis triunfos y fracasos, por los muchos buenos momentos que vivimos juntas. A todas ellas mi más profundo agradecimiento!!

A los Dres J. Schiaffi, R. Yomha, A. Bagnati, R. Cerdeiro, J. Loza y F. Sousa Martínez, oncólogos, cirujanos y patólogos que me facilitaron las muestras tumorales para la realización de los experimentos de esta Tesis.

A las Dras. Marianna Nuti y Valeria Turchi del Policlinico Umberto I de la Universidad de Roma, por facilitarme muchos de los anticuerpos empleados en este trabajo y por su hospitalidad durante mi estadía en su laboratorio.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) por financiar mi viaje y estadía en Italia.

A la gente de la biblioteca, la administración, el droguero, al personal de apoyo y de mantenimiento tanto de Campomar como del Castex, porque su valiosa contribución en las múltiples tareas cotidianas ha sido esencial para la realización de este trabajo.

A tanta gente de otros laboratorios del Instituto y servicios del Hospital, a los que pedí ayuda en distintas ocasiones y con los que compartí tantos buenos momentos en estos años: Muchas gracias!

A la gente de la Secretaría del Dpto. de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, por su amabilidad y permanente buena disposición para informar y solucionar problemas.

A muchos amigos como Nora, Enrique, María Ameña, Pablo, Carina, Gio, Liliana, Yoli, Marcela, quienes me han brindado siempre su ayuda, estímulo y mucho cariño (... a pesar del tiempo que "les robé" por esta Tesis ...).

A mis padres, a Carlos y a Ana, por su apoyo y su afecto, por estar siempre cuando los necesito.

A Emil, por su permanente estímulo, su comprensión y por todo su amor.