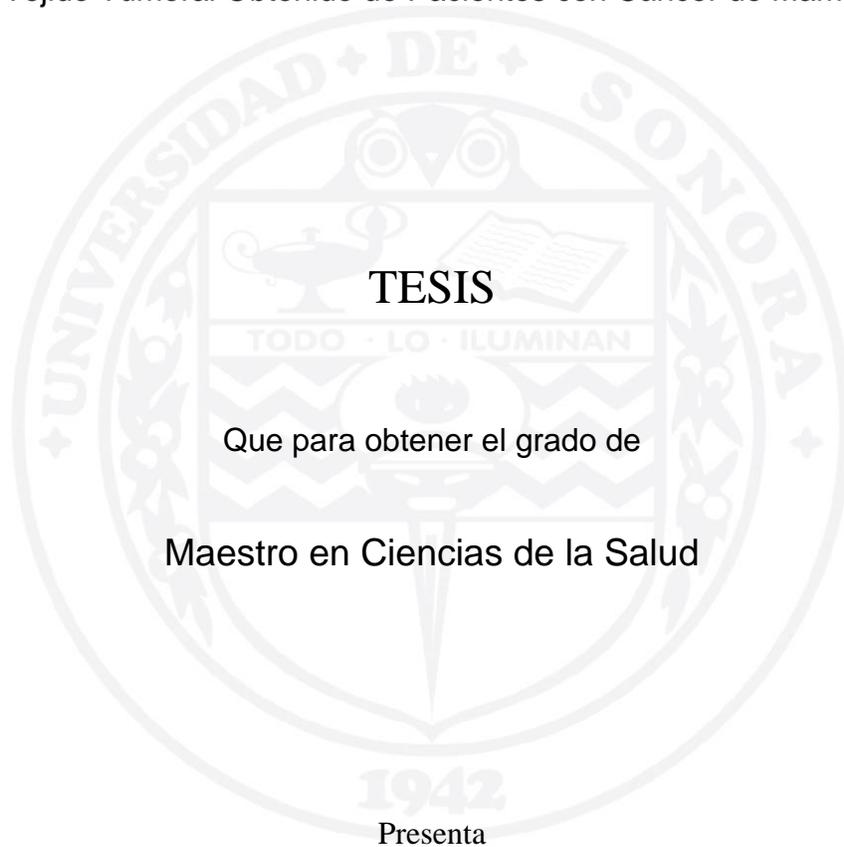


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Generación y Caracterización Parcial de Líneas Celulares Cancerosas a Partir de  
Tejido Tumoral Obtenido de Pacientes con Cáncer de Mama



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

**María Lourdes Valencia Peña**

Hermosillo, Sonora

Enero de 2019

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **DEDICATORIA**

A mis padres Nicolas Valencia y Lourdes Peña, gracias por apoyarme en cada una de mis decisiones, por fomentar en mí y en mis hermanos la necesidad de superarnos tanto profesionalmente, como de manera personal. Gracias por el interés que mostraron siempre en mi trabajo, por la preocupación que sentían junto a mí cuando mis experimentos no salían. Les agradezco el que siempre hayan estado a mi lado apoyándome a pesar de mi carácter, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Tadeo y Nicole, gracias por ser mi felicidad; sus ocurrencias y ánimos fueron indispensables durante este trayecto. Gracias por aguantarme, los quiero mucho.

A Raúl, gracias por tu paciencia y por confiar en mí.

A mis amigos y colegas Lucinda, Efraín, Alejandra L., Isaac, Thania, Víctor, Alejandra V., Paola, Gloria, Luis, David, Patricia H., Patricia R., Mónica, María José, Maritza, Ramsés, Edgar, Héctor, sin el apoyo de todos ustedes no hubiera logrado culminar este trabajo. ¡Gracias por todo!

A mi director de tesis Dr. Velázquez, admiro su visión y la manera de dirigir a sus estudiantes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas.

Al Programa de Maestría en Ciencias de la Salud.

A mi director de tesis, Dr. Carlos A. Velázquez, gracias por toda la paciencia y confianza que depositó en mí para llevar a cabo este proyecto.

A mi comité sinodal, Dra. Isabel Lüthy, Dr. Roberto De León y Dra. Aracely Angulo, gracias por tener siempre la disposición de ayudarme durante este trabajo de maestría.

A la M.C. Alejandra López, Dr. Efraín Alday y Q.B. Omar Ríos, gracias por todo su apoyo y ayuda en el desarrollo de este proyecto, no lo hubiera logrado sin ustedes.

Al Laboratorio de Inmunología y Biología Celular, en especial a la M. C. Lucila Rascón, por toda su ayuda.

Al Centro en Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) y al Laboratorio de Patología Experimental.

Al Hospital General del Estado de Sonora "Ernesto Ramos Bours".

Al Centro Estatal de Oncología "Dr. Ernesto Rivera Claisse".

Al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (ISSSTESON).

Al Centro de Patología Avanzada de Sonora.

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
OBJETIVOS .....	viii
Objetivo General .....	viii
Objetivos Particulares .....	viii
RESUMEN .....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
Cáncer de Mama .....	3
Características de las Células Tumorales.....	4
Transición Epitelial- Mesenquimal (Epithelial-Mesenchymal Transition- EMT).....	6
microRNAs .....	7
Diferencias Poblacionales en Cáncer de Mama.....	8
Líneas Celulares.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
Consideraciones Éticas .....	11
Recolección de Muestras Clínicas .....	11
Generación del Cultivo Celular Primario.....	12
Identificación de Marcadores Tumorales Asociados a Cáncer de Mama .....	12
Evaluación <i>in vitro</i> de la Sensibilidad de las Líneas Celulares Generadas ante el Efecto Antiproliferativo de 5- Fluorouracilo, Doxorubicina y CAPE .....	13
Cuantificación de la Expresión de microRNAs .....	14
Análisis Estadístico .....	15
RESULTADOS.....	16
Se Generaron Siete Cultivos Primarios a Partir de Tejido Mamario Obtenido de Pacientes Diagnosticadas con Carcinoma Ductal Infiltrante .....	16
Las Células de las Líneas ID014-T e ID014-G Expresan Características de Células de Origen Epitelial y Mesenquimal .....	19
Las Líneas Celulares ID014-T e ID014-G Expresan Características de Origen Luminal .....	22
Análisis de cuantificación del nivel de expresión de miRNA 145, 155, 181a y 205 en las líneas ID014-T e ID014-G .....	22
La Línea Celular ID014-T Presenta Susceptibilidad al Tratamiento con CAPE (Éster Fenetílico del Ácido Caféico) .....	25

DISCUSIÓN .....	27
CONCLUSIONES .....	32
REFERENCIAS.....	33
ANEXOS .....	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Diagnóstico y subtipo molecular de las pacientes.	17
II.	Tipo de tejido obtenido para la generación de cultivos primarios.	17
III.	Concentración e índice de pureza del RNA total.	24
IV.	Cálculo del nivel de expresión relativa de miRNA asociados a cáncer.	24

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anatomía de la mama	5
2	Subtipos moleculares de cáncer de mama	5
3	Cultivos celulares derivados de tejidos tumorales.	18
4	Las células expresan características de células de origen epitelial y mesenquimal.	20
5	Las células ID014-T expresan de manera homogénea características de células epiteliales y mesenquimales.	21
6	Las células expresan características de origen luminal.	23
7	Susceptibilidad de la línea ID014-T hacia fármacos antineoplásicos.	26

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Generar y caracterizar parcialmente líneas celulares cancerosas a partir de tejido tumoral obtenido de pacientes con cáncer de mama.

### **Objetivos Particulares**

1. Establecer líneas celulares a partir de un cultivo primario obtenido de pacientes con cáncer de mama.
2. Evaluar características fenotípicas y genotípicas mediante la expresión de marcadores tumorales y cuantificación de microRNAs.
3. Evaluar la sensibilidad de las líneas celulares cancerosas generadas ante diferentes fármacos antineoplásicos (Doxorrubicina, 5-fluorouracilo) y compuestos bioactivos (CAPE).

## RESUMEN

El conocimiento sobre los principales procesos biológicos asociados al cáncer de mama se ha basado en gran medida en el uso de líneas celulares de cáncer. La mayoría de esas líneas celulares se han generado a partir de tumores humanos de población caucásica, lo que limita los estudios centrados en la evaluación de las diferencias en la biología del cáncer y la respuesta o susceptibilidad de las drogas entre las poblaciones. El objetivo principal del presente estudio fue generar y caracterizar parcialmente líneas celulares a partir de tejido obtenido de mujeres mexicanas que padecen cáncer de mama. Para cumplir con ello se trabajó con cuatro pacientes diagnosticadas con carcinoma ductal infiltrante. Las muestras fueron procesadas hasta obtener una suspensión celular. Una vez obtenida la línea celular se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de citoqueratina 7 y vimentina para determinar el fenotipo celular. Asimismo, se cuantificó mediante PCR en tiempo real la expresión de los microRNAs miR-145, miR-155, miR-181a y miR-205, los cuales están implicados en la oncogénesis. Por último, se evaluó mediante MTT la susceptibilidad de la línea ID014-T ante doxorrubicina, 5-fluorouracilo y CAPE. De las muestras de tejido obtenidas de las cuatro pacientes se establecieron siete cultivos celulares primarios de tejido tumoral (ID010-T, ID012-T, ID013-T e ID014-T), tejido aparentemente normal (ID013-N e ID014-N) y de un ganglio linfático involucrado (ID014-G). Las líneas tumorales ID014-T e ID014-G provenientes de la misma paciente mostraron un fenotipo consistente con células de origen epitelial luminal que asimismo presentaban características de células mesenquimales, sugiriendo estar en una transición epitelial-mesenquimal, que podría estar favorecida por la baja expresión de miR-145. Adicionalmente, la línea ID014-T presentó susceptibilidad a CAPE a 200  $\mu$ M. En conclusión, durante el desarrollo del presente estudio se generaron 4 líneas celulares de cáncer de mama y se inició con la caracterización fenotípica y molecular de las mismas. Estas líneas celulares generadas representan un modelo de estudio importante que nos permitirá realizar diferentes ensayos encaminados a comprender y tratar la enfermedad de una manera más personalizada tomando en cuenta nuestra gran diversidad genética.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad molecularmente heterogénea (Ferreira y col, 2013), que puede implicar a todos los órganos y tejidos del cuerpo humano (Rezaei, 2015). Esta enfermedad es ocasionada por mutaciones en la célula que hacen que se divida más rápido que las demás (Alberts y col, 2008), excediendo la tasa de muerte celular y provocando la formación del tumor o neoplasia. La razón principal de la mortalidad del cáncer se debe a la capacidad que tienen estas células de invadir y establecerse en otros órganos formando tumores secundarios (Lodish y col, 2000).

La importancia de esta enfermedad radica en su complejidad abarcando más de 100 enfermedades distintas con diversos factores de riesgo (Stratton y Futreal, 2009), como la edad, género, raza, estilo de vida o factores ambientales (Rezaei, 2015). Según los últimos datos reportados a nivel mundial, señalan que este padecimiento es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con aproximadamente 18 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes durante el 2018 (Bray y col, 2018).

El cáncer de mama representa el tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres a nivel mundial (Bray y col, 2018). En México es la principal causa de mortalidad en mujeres de 20 años o más (INEGI, 2018). Esta enfermedad puede ser clasificada en diferentes tipos, siendo el carcinoma ductal y el lobular los que se presentan en la mayoría de los casos (Makki, 2015).

En la actualidad, gran parte del conocimiento sobre los principales procesos en las células cancerosas ha dependido en gran medida del uso de diferentes tipos de modelos experimentales, como las líneas celulares cancerosas (Wang y col, 2006; Mitra y col, 2013), las cuales han demostrado tener un gran valor clínico y biológico. Según información obtenida de American Type Culture Collection (ATCC, 2012), el cual es uno de los más importantes repositorios de líneas celulares a nivel mundial, existen más de 60 líneas celulares de cáncer de mama, siendo la mayoría estas de origen caucásico y solo una de ellas de origen hispano.

La importancia de generar una línea celular tumoral originaria de nuestra población, se debe a que actualmente en el tratamiento contra el cáncer, se prescriben a menudo dosis similares a diferentes poblaciones étnicas, sin tomar en cuenta la eficacia, seguridad y tolerabilidad hacia los medicamentos (Nagar y col, 2014), siendo que se ha reportado que diversos factores son los que juegan un papel importante en cuanto a la diversidad étnica y su respuesta a un fármaco o su toxicidad (fármaco-etnicidad), estos pueden ser ambientales o fisiológicos tales como la edad, el sexo, el estadio de la enfermedad, estado nutricional (O'Donnell y Dolan, 2009; Nagar y col, 2014), estado inflamatorio (Phan y col, 2009) o polimorfismos genéticos en enzimas implicadas en la vía metabólica de fármacos (Nagar y col, 2014; Phan y col, 2009; Yasuda y col, 2008, Hasegawa y col, 2011).

La comprensión de estas diferencias étnicas en el metabolismo citotóxico puede ayudar a mejorar el tratamiento contra el cáncer. Desde este punto de vista, es importante generar líneas celulares que se puedan utilizar como modelo celular para caracterizar genotípica y fenotípicamente el cáncer de mama, permitiéndonos conocer más esta enfermedad y las posibles diferencias en la susceptibilidad a drogas antitumorales.

## ANTECEDENTES

### Cáncer de Mama

La denominación de los tumores al igual que las células normales a menudo se clasifican según su tejido embrionario de origen. Los tumores malignos se clasifican como carcinomas si las células epiteliales que se derivan de endodermo o ectodermo están siendo afectadas y sarcomas si las células involucradas provienen del tejido conectivo o muscular, las cuales se derivaron partir del mesodermo (Lodish y col, 2000). Las neoplasias malignas de mama además de tomar en cuenta el fenotipo celular también se consideran sus características moleculares. Aunque el cáncer de mama se puede presentar en cualquier célula de la glándula mamaria, el carcinoma mamario es el diagnosticado más comúnmente. Derivados en su mayoría del epitelio que recubren los conductos o lóbulos, clasificándose estos carcinomas como ductal o lobular (Makki, 2015). A su vez, estos tipos de cáncer de mama pueden categorizarse de dos maneras, *in situ*, detectado cuando las células permanecen en el mismo sitio anatómico, en donde comenzó el crecimiento anormal, e infiltrante cuando el crecimiento celular invade el tejido adyacente (Makki, 2015; Esebua, 2013).

Las células epiteliales que conforman la glándula mamaria presentan receptores que responden a las hormonas esteroideas ováricas, progesterona y estradiol, las cuales son fundamentales para el crecimiento y la proliferación de la mama durante el desarrollo normal (Hilton y col, 2014). Los receptores específicos de estas hormonas funcionan clásicamente como factores de transcripción activados por ligando, siendo la señalización del receptor de estrógeno (RE) necesaria para el alargamiento ductal y la del receptor de progesterona (RP) esencial para la ramificación de ductal y la alveogénesis (Leehy y col, 2018). Estos receptores se ven expresados de manera anormal en algunos tipos de cáncer mamaros, estimulando el crecimiento de células cancerosas.

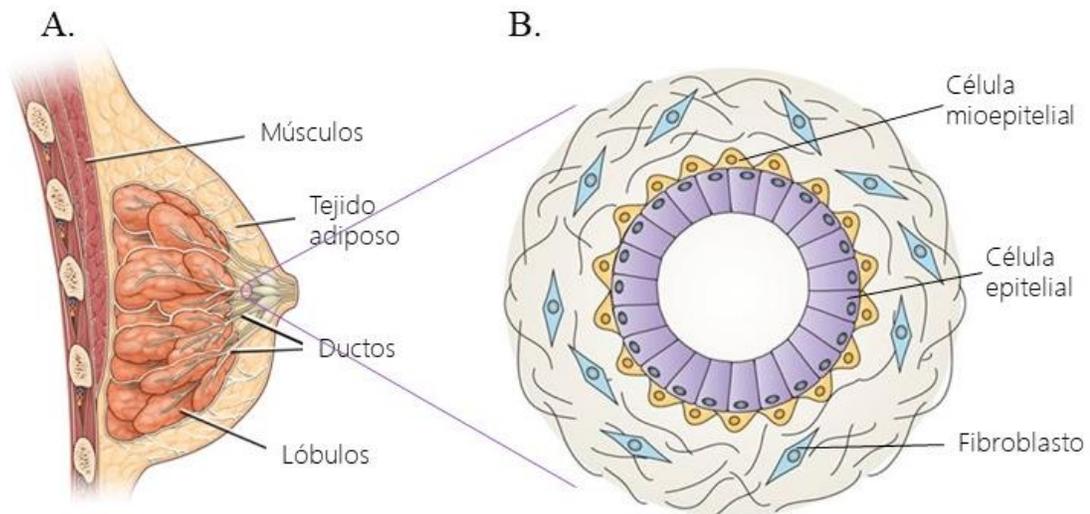
Además de estos receptores hormonales, se encuentra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), un receptor tirosina quinasa que desencadena

una vía de señalización que controla el crecimiento, diferenciación, motilidad y adhesión. La amplificación del gen HER-2 o la sobreexpresión de la proteína ocurre en aproximadamente el 20% de los pacientes con cáncer de mama (Oakman y col, 2009), relacionándose esta sobreexpresión con un mal pronóstico (Eccles, 2001, Oakman y col, 2009).

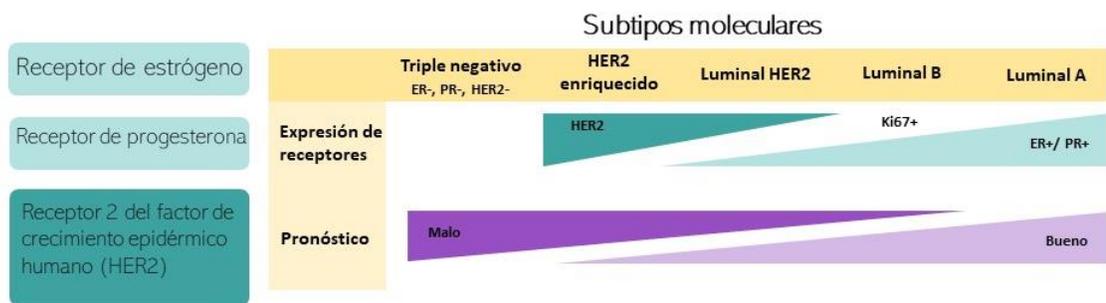
El seno humano normal se compone de estroma y epitelio, en donde los lóbulos y ductos están revestidos por una sola capa de células epiteliales luminales asociadas con actividad secretora, rodeada por una capa de células basales, que consiste principalmente en células mioepiteliales con propiedades contráctiles (Hilton y col, 2014) (Figura 1). Siendo MUC1 (Hilton y col, 2014; Vilardell y col, 2012), citoqueratina-7 (Vilardell y col, 2012), citoqueratina-18 (Hilton y col, 2014; Chaffer y Weinberg, 2010), citoqueratina-19 (Vilardell y col, 2012), RE $\alpha$  (Chaffer y Weinberg, 2010) entre otros, marcadores para células luminales maduras y citoqueratina 5/6 (Hungermann y col, 2005; Chaffer y Weinberg, 2010), citoqueratina-14 (Chaffer y Weinberg, 2010; Hilton y col, 2014), p63 (Hilton y col, 2014; Hungermann y col, 2005), vimentina (Hungermann y col, 2005), entre otros, marcadores característicos de células mioepiteliales. Dependiendo del tipo de célula y la expresión de receptores, los subtipos moleculares de cáncer de mama se clasifican como: luminal A (RE+ o PR+ y Ki-67<14%), luminal B (RE+ o RP+ y Ki-67  $\geq$  14%), luminal-HER2 (RE+ o RP+ y HER2+), HER2 enriquecido (RE-, RP- y HER2 +), de tipo basal (RE-, RP-, HER2 - y EGFR + o CK5/6 +) y triple negativo no basal (RE-, RP-, HER2 - y EGFR - o CK5/6 -) (Voduc y col, 2010) (Figura 2). Siendo la proteína ki-67 un indicador de actividad proliferativa en la célula tumoral, el cual ha sido utilizado como marcador de agresividad tumoral (Li y col, 2015).

### **Características de las Células Tumorales**

La oncogénesis se considera un proceso de múltiples etapas y alteraciones genéticas que sufre una célula normal hasta convertirse en una célula maligna. Hanahan y Weinberg en el 2000 describieron seis características o capacidades biológicas distintivas de las células



**Figura 1.** Anatomía de la mama. A. Vista lateral del seno, compuesta mayormente por tejido adiposo que rodea los ductos y lóbulos. B. Vista transversal de un ducto, donde las células epiteliales rodean el lumen y sobre estas se encuentran células mioepiteliales y fibroblastos. Imágenes modificadas de Butcher y col (2009).



**Figura 2.** Subtipos moleculares de cáncer de mama. Según la expresión de RE, RP y HER2 los subtipos de cáncer se pueden clasificar como luminal A, luminal B, luminal HER2, HER2 enriquecido y triple negativo, donde el primer y último subtipo tienen el mejor y peor pronóstico respectivamente.

cancerosas: 1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, 2) insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento (anti-crecimiento), 3) evasión de muerte celular (apoptosis), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis sostenida e 6) invasión tisular y metástasis. En el 2011, agregan cuatro características más a la lista, la inestabilidad del genoma y mutación, la inflamación que promueve el tumor, reprogramación del metabolismo energético y evadir la destrucción inmune (Hanahan y Weinberg, 2011).

En cuanto a su morfología, las células cancerosas se caracterizan por poseer un gran núcleo de forma irregular, con cromosomas asimétricos y de formas atípicas, sus nucléolos son prominentes, y el citoplasma es escaso frecuentemente con vacuolas y relativamente poca estructura especializada (Lodish y col, 2000; Baba y Câtoi, 2007). La membrana celular sufre cambios moleculares superficiales como el aumento o disminución del número de receptores de superficie (Baba y Câtoi, 2007), entre estos receptores afectados está el HER2, cuya expresión se ve elevada en células cancerosas, implicando un tipo de cáncer de mama en particular, siendo esta una molécula diana en el tratamiento de la enfermedad.

Los componentes de su citoesqueleto se encuentran en proporciones diferentes en la célula cancerosa, siendo pieza fundamental durante la invasión y metástasis (Baba y Câtoi, 2007). Los carcinomas epiteliales contienen en sus filamentos intermedios citoqueratinas y los tumores mesenquimales contienen vimentina (Baba y Câtoi, 2007), la presencia de ambas está relacionada a un proceso biológico que experimenta la célula epitelial cancerosa al asumir un fenotipo mesenquimal que le permite tener una capacidad migratoria, invasividad y resistencia elevada a la apoptosis (Mani y col, 2008; Kalluri y Weinberg, 2009).

### **Transición Epitelial- Mesenquimal (Epithelial-Mesenchymal Transition- EMT)**

La EMT y el proceso inverso (Transición mesenquimal-epitelial.MET) juegan un papel fundamental durante la embriogénesis (Mani y col, 2008), el desarrollo de los órganos, reparación de tejidos y durante la invasión y metástasis de las células epiteliales cancerosas (Kalluri y Weinberg, 2009). Esta se activa y perpetúa en respuesta a señales paracrinas que

emanan principalmente de células estromales (Abba y col, 2016).

Durante este proceso es necesario que se lleven a cabo varios procesos moleculares en la célula, como la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas específicas de la superficie celular, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (ECM) y cambios en la expresión de microRNA específicos (Kalluri y Weinberg, 2009).

### **microRNAs**

Los microRNAs son pequeños fragmentos de RNA no codificante de aproximadamente 18 a 23 nucleótidos implicados en el silenciamiento de genes, donde un solo miRNA puede regular múltiples genes y varios miRNA pueden controlar juntos un único objetivo (Pabón, 2011). Algunos estudios estiman que el 30% de todos los genes eucariotas están regulados por miRNA y hasta el momento han sido reportados más de 500 miRNA (Mattiske y col, 2012), de los cuales se ha visto que varios de estos están involucrados en la oncogénesis, mostrando su participación en cada una de las características de la célula tumoral descritas por Hanahan y Weinberg (Goh y col, 2016). Mostrando así su posible papel como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta hacia los tratamientos (Nassar y col, 2017).

Reportes recientes han asociado la expresión anormal del miR-145 (Singh y Mo 2013; Cui y col, 2014; Zheng y col, 2015; Zhao y col, 2016; Ding y col, 2017; Ye y col, 2018), miR-155 (Mattiske y col, 2012; Liu y col, 2015; Petrovic y col, 2016), miR-181a (Taylor y col, 2012) y miR-205 (Gregory y col, 2008; Wu y col, 2009) con la proliferación anormal y migración de células de cáncer de mama. Además, los miR-145 (Gao y col, 2016; Lv y col, 2014), miR-155 (Ouyang y col 2014), miR-181a (Jiao y col, 2013) se han visto involucrados en procesos de quimiorresistencia. A pesar de su posible papel como biomarcadores de tratamientos, estudios recientes han encontrado que existe una expresión diferencial de algunos microRNA implicados en cáncer de mama entre distintas poblaciones (Nassar y col, 2017; Huang y col, 2011). Sugiriendo la importancia biológica

y farmacológica de las diferencias en cuanto a la expresión de miRNA entre poblaciones (Nassar y col, 2017).

### **Diferencias Poblacionales en Cáncer de Mama**

En los últimos años se ha generado un interés en entender el papel que desempeña la raza y la etnicidad en la carcinogénesis. Hasta el momento se tiene el conocimiento que existen ciertas poblaciones ancestrales que portan mutaciones o polimorfismos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad, que en conjunto con factores ambientales pueden conducir a diferencias biológicas en el perfil molecular del tumor (Wiencke y col, 2004).

En un estudio realizado por Porter y col (2004), encontraron que la raza puede ser un factor determinante en carcinomas de mama agresivos y en defectos específicos del ciclo celular, independientemente del estadio y la edad, al comparar muestras tumorales de mujeres afroamericanas y mujeres blancas. Esta misma asociación se hace comparando mujeres negras o hispanas y caucásicas, encontrando que las mujeres de raza negra e hispana presentan mayor predisposición de presentar tumores más agresivos con pronósticos desfavorables (Al-Alem y col, 2014). Tal es el caso del cáncer de mama triple negativo, el cual es significativamente más frecuente en mujeres negras en comparación con mujeres de otras razas (Özdemir y Dotto, 2017).

Existe evidencia clínica sobre las diferencias étnicas en genes relacionados con el procesamiento de fármacos contra el cáncer (Yasuda y col, 2008; O'Donnell y Dolan, 2009; Phan y col, 2009; Hasegawa y col, 2011; Nagar y col, 2014), incluso se han reportado diferencias entre ciertas poblaciones y los efectos secundarios al recibir tratamiento oncológico (Ryan y col, 2007).

En estos tipos de estudios poblacionales es común encontrar que se engloba a una gran cantidad de individuos como personas hispanas, agrupando a toda aquella persona con relaciones históricas y culturales con España (Özdemir y Dotto, 2017), sin tomar en cuenta sus características genotípicas y fenotípicas que los separa de otras poblaciones. Limitando

las investigaciones enfocadas a evaluar diferencias étnicas y cáncer. Inclusive Al-Alem y col (2014) en su estudio con mujeres hispanas, no hispanas y negras destacan la importancia de no generalizar los hallazgos en todas las poblaciones hispanas.

A pesar de la importancia demostrada de la inclusión racial/étnica en la investigación del cáncer, la mayoría de las líneas celulares y xenoinjertos derivados de pacientes hasta biobancos, genómica y ensayos clínicos, no presentan información del origen de la persona y hay una representación excesiva de las muestras de individuos caucásicos; por lo que la comprensión básica del cáncer y la selección inicial de medicamentos se ha realizado utilizando líneas celulares aisladas principalmente de pacientes blancos y desconocidos. (Guerrero y col, 2018).

### **Líneas Celulares**

Una línea celular es definida como un cultivo celular el cual proliferará indefinidamente, al proporcionarle nutrientes y el espacio adecuados; esta se origina a partir de un cultivo primario, el cual representa la relación más estrecha con el tejido original (Langdon, 2010), asemejándose más al estado fisiológico de las células en tejido *in vivo*. Las líneas celulares han demostrado ser de gran valor clínico y biológico (Sharma y col, 2010), en la identificación, caracterización de las moléculas diana y en el estudio de resistencia a fármacos (Ferreira y col, 2013); proporcionando una fuente ilimitada de células malignas (Wang y col, 2006). Esta herramienta ha sido ampliamente utilizada desde el momento que se generó la primera línea celular a principios de los años cincuenta, la cual proviene de un adenocarcinoma de cérvix. Gracias a la utilización de esta línea celular se logró desarrollar la vacuna contra la polio y descubrir efectos de la radiación, así como también a mejorar la fertilización *in vitro*, la clonación y el mapeo de genes, entre muchos otros avances científicos (Khan, 2011).

El aislar y el cultivar *in vitro* células provenientes de tumores sólidos, en un entorno similar al microambiente del tumor original es un desafío y requiere de técnicas especializadas (Mitra y col, 2013). Las muestras de tejido son regularmente heterogéneas,

ya que la masa tumoral consiste no solo en una población de células cancerosas, sino también de múltiples tipos de células estromales, que junto con factores secretados y proteínas de la ECM, soportan el nicho tumoral primario (Quail y Joyce, 2013; Wang y col, 2017), sin embargo, después de varios subcultivos, las células cultivadas asumen una constitución uniforme, debido a que las células se mezclan al azar en cada transferencia y la presión selectiva de las condiciones de cultivo tiende a producir un cultivo homogéneo. En el desarrollo de líneas celulares, esto es necesario para permitir que surja una población única (Langdon, 2010).

Diversos autores han reportado la generación de líneas celulares de cáncer de mama (Langlois y col, 1979; Smith y col, 1990; Speirs y col, 1998; Gazdar y col, 1998; Pechoux y col, 1999, Vazquez y col, 2004; Shen y col, 2009), de pulmón (Gazdar y col, 1985; Zheng y col, 2011) de colon (Ku y col, 2010; Maletzki y col, 2015), entre otras. Sin embargo, no se cuenta con líneas celulares disponibles obtenidas de población mexicana. Debido a esto, el presente proyecto tiene como objetivo principal el generar líneas celulares de cáncer de mama, que provengan de un origen mexicano y evaluar parcialmente algunas de las características fenotípicas y genotípicas que presenten.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Consideraciones Éticas**

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación en Bioética del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora (DMCS/CBIDMCS/D-89bis), el Comité de Bioética del Hospital General del Estado de Sonora (SSS/HGE/CI/Dictamen/2017/037), el Comité de Ética en Investigación del Centro Estatal de Oncología (17/marzo/2017) y el Comité de Ética en Investigación del Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez”, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (CEI-032-2017). El consentimiento informado del paciente se obtuvo antes de la recolección de cada muestra.

### **Recolección de Muestras Clínicas**

Se obtuvieron muestras de tejido de cuatro pacientes con cáncer de mama que se sometieron a cirugía sin recibir previamente terapia neoadyuvante. Las piezas quirúrgicas fueron trasladadas del quirófano al laboratorio de patología del Hospital General del Estado de Sonora en un ambiente húmedo, no excediendo más de 30 minutos en el traslado. A partir de éstas se obtuvieron siete muestras distintas provenientes de tejido mamario aparentemente normal, carcinoma primario de mama y ganglio linfático involucrado, todas de tamaño aproximado de 1 cm<sup>3</sup>. Las piezas de tejido se sumergieron por separado en Medio Mínimo Esencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5% y antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 mg / l de estreptomicina) y se transportó al Laboratorio de Inmunología y Biología Celular en la Universidad de Sonora, manteniendo una temperatura baja (~ 4 °C). Cabe señalar que cada una de las muestras fue identificada y proporcionada por un médico patólogo.

### **Generación del Cultivo Celular Primario**

De las muestras de tejido, el área epitelial se separó de los vasos sanguíneos, el tejido adiposo y el tejido conectivo, utilizando un bisturí. El tejido epitelial de cada una de las muestras se cortó en trozos más pequeños para facilitar la digestión enzimática; los tipos de enzimas y los tiempos de incubación fueron distintos en cada una de las muestras, esto con la finalidad de evaluar distintos protocolos reportados por diversos autores. La muestra ID010 se incubó con 1.0 mg/mL de colagenasa toda la noche (Vázquez y col, 2004), las muestras ID012 e ID013 con 2.5 mg/mL de tripsina y 850 U/mL de colagenasa durante 20 minutos (Dran y col, 1995), por último, las muestras ID014 se incubaron con 0.8 mg/mL de colagenasa y 0.05 mg/mL de hialuronidasa durante toda la noche (LaBarge y col, 2013). Todas las muestras fueron incubadas a 37°C en rotación.

La suspensión celular se lavó una vez con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal y antibióticos y se sembró en una placa de 12 pozos (Costar, Corning, EE. UU.). El medio de cultivo se cambió cada 3 días hasta que el cultivo celular alcanzó un 80-90 % de confluencia. Las células se subcultivaron mediante tripsinización (0,25% de tripsina-0,025% de EDTA- ácido etilendiaminotetraacético) y durante la propagación del subcultivo, las células se congelaron en un medio de congelación que contenía 50% de DMEM, 40% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), y criopreservaron a -150 °C en un ultracongelador (Panasonic; Japón).

### **Identificación de Marcadores Tumorales Asociados a Cáncer de Mama**

Con el propósito de conocer el fenotipo de cada una de las líneas celulares se evaluaron marcadores vinculados al origen epitelial como citoqueratinas, específicamente citoqueratina 7, además de vimentina, marcador de células de origen mesenquimal, mediante inmunocitoquímica y tinción por inmunofluorescencia. Cada una de las líneas celulares generadas se incubaron con DMEM suplementado con FBS al 10% y antibióticos, sobre cubreobjetos de vidrio hasta confluencia en una placa de 6 pozos. Posteriormente los portaobjetos se lavaron 2 veces con PBS y las células adheridas se permeabilizaron y fijaron

en etanol absoluto durante 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para las tinciones intracelulares. Se retiró el etanol y se adicionaron 2 mL de PBS para lavar e hidratar las células. Se adicionó nuevamente 2 mL de PBS y se incubó durante 3 min. Se adicionó una solución de bloqueo con albúmina sérica bovina disuelta en PBS (PBA; 0.1%) y se incubó por 15 min. Se retiró la solución de bloqueo y se adicionaron 2 mL de PBS a cada pozo, se descartó el PBS y se le adicionó el anticuerpo anti-citoqueratinas (AE-1/AE-3, BioLegend; EE. UU.), su control de isotipo mouse IgG<sub>1,k</sub> (MG1-45, BioLegend; EE. UU.), anti-vimentina (O91D3, BioLegend; EE. UU.), su control de isotipo mouse IgG<sub>2a</sub> (MOPC-173, BioLegend; EE. UU.), a una concentración  $1\mu\text{g/mL}$  diluidos con PBA. Se incubaron las células por 45 minutos con  $100\mu\text{L}$  de solución de cada anticuerpo en PBA al 0.1%. Se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 2 mL de PBS y se procedió a incubar las células por 30 min del anticuerpo secundario, utilizando anti-ratón IgG-HRP para microscopía óptica y anti-ratón IgG-FITC para microscopía confocal. Se retiró el sobrenadante de IgG-HRP y se lavaron las células dos veces con PBS por 3 min y se incubaron por 3 min con 5% de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro con peróxido (DAKO; Dinamarca). Se lavaron las células con agua destilada y se les adicionó hematoxilina e inmediatamente se lavaron en agua. Finalmente, a las muestras se les colocó entellan (DAKO; Dinamarca) y fueron montadas en un portaobjetos para su análisis en microscopio óptico. Después de retirarles el sobrenadante a las muestras con anti-ratón IgG-FITC, se lavaron dos veces con PBS por 3 min y se incubaron con 300 nM de DAPI por 10 min. Se lavaron con agua y se colocaron en un portaobjetos colocando esmalte de uñas por las orillas del cubreobjetos.

#### **Evaluación *in vitro* de la Sensibilidad de las Líneas Celulares Generadas ante el Efecto Antiproliferativo de 5- Fluorouracilo, Doxorrubicina y CAPE**

Se evaluó la susceptibilidad de las líneas celulares obtenidas a drogas que comúnmente se utilizan en el tratamiento contra el cáncer a través de un ensayo de MTT. Se adicionaron  $30 \times 10^3$  células en  $50\mu\text{L}$  de medio a cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, EE. UU.). Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 24 horas a 5% de  $\text{CO}_2$

para permitir la adhesión celular. Posteriormente se les adicionó 50  $\mu$ L de Doxorubicina (12.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M), 5-fluorouracilo (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) y CAPE (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) y como control se utilizó el disolvente DMSO. Después de una incubación de 44 h con el tratamiento, se le adicionó 10  $\mu$ L de reactivo MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incubó por 4 h. Finalmente se le adicionó 100  $\mu$ L de isopropanol ácido para disolver los cristales formados y la absorbancia se obtuvo mediante un lector de microplacas ThermoLab System, Multiskan Ex a las longitudes de onda 570 nm y 650 nm (Alday y col, 2015).

### **Cuantificación de la Expresión de microRNAs**

La extracción de RNA total se realizó mediante el RNeasy Mini Kit, (QIAGEN) utilizando aproximadamente  $5 \times 10^5$  células de los cultivos ID014-T, ID014-G e ID014-N. Durante el proceso de extracción, se agregó el Spike-In Control (QIAGEN), un miRNA sintético proveniente del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39-3p), utilizado como control para la normalización de los datos.

La concentración y pureza del RNA de todas las muestras fue evaluada con NanoDrop1000 (Thermo Scientific), la concentración se midió por la absorbancia a 260 nm y el índice de pureza se determinó usando la relación  $A_{260}/A_{280}$ .

Posteriormente para la síntesis de cDNA, se utilizó el TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y los iniciadores específicos para los miRNAs en estudio (TaqMan™ MicroRNA Assay- Applied Biosystems), por cada reacción de RT se utilizaron 5 ng. Los tubos de RT se colocaron en termociclador (T100 BIO-RAD)

Los niveles de expresión de miRNAs fueron cuantificados usando el PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems). Se emplearon primers marcados con fluorocromo FAM (emisión a 518 nm) para los miRNAs en estudio, mientras que el primer del Spike-In Control se adquirió marcado con el fluorocromo VIC (emisión a 554 nm). Las reacciones de PCR se realizaron con base en lo descrito por el fabricante, con modificaciones descritas por Vazquez, 2018 y la expresión relativa de los miRNA maduros se calculó mediante el

método del doble delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Schmittgen y Livak, 2008).

### **Análisis Estadístico**

Los resultados de la susceptibilidad de la línea ID014-T hacia los tratamientos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba de comparación entre grupos de Tukey Kramer utilizando el software Prism 5 version 5.01 (GraphPad, Inc., 2007). Diferencias estadísticas encontradas con los tratamientos contra el control con disolvente con un valor  $P < 0.05$  fueron consideradas significativas.

## RESULTADOS

### **Se Generaron Siete Cultivos Primarios a Partir de Tejido Mamario Obtenido de Pacientes Diagnosticadas con Carcinoma Ductal Infiltrante**

Se obtuvieron muestras de tejidos provenientes de cuatro pacientes diagnosticadas con carcinoma ductal infiltrante. La paciente ID010 presentó receptores hormonales y HER2 positivos, más del 14% de la población celular expresó el marcador ki67 (indicador de proliferación y crecimiento celular); la paciente ID012, fue positivo a receptor de estrógeno y HER2. En el caso de las pacientes ID013 e ID014, éstas mostraron positividad a HER2 con la presencia de la proteína ki67 mayor al 14% de la población celular. Estos resultados indican que las primeras dos pacientes tienen un subtipo molecular de cáncer de mama Luminal HER2 y las otras dos con subtipo HER enriquecido (Tabla I).

A partir de estas muestras se lograron establecer cuatro cultivos primarios de tumor primario (ID010-T, ID012-T, ID013-T and ID014-T), uno de tumor secundario localizado en uno de los ganglios (ID014-G) y dos provenientes de tejidos que macroscópicamente aparentaban ser normales (ID013-N y ID014-N) (Tabla II). Cada uno de estos cultivos fue criopreservado a -150 °C.

Se realizaron varios subcultivos de cada una de las muestras provenientes de tejido tumoral hasta obtener un cultivo homogéneo. Las células presentaban una morfología alargada y un patrón de crecimiento adherente a la superficie, además algunas células de esta población expresaban citoqueratinas en su citoesqueleto (Figura 3).

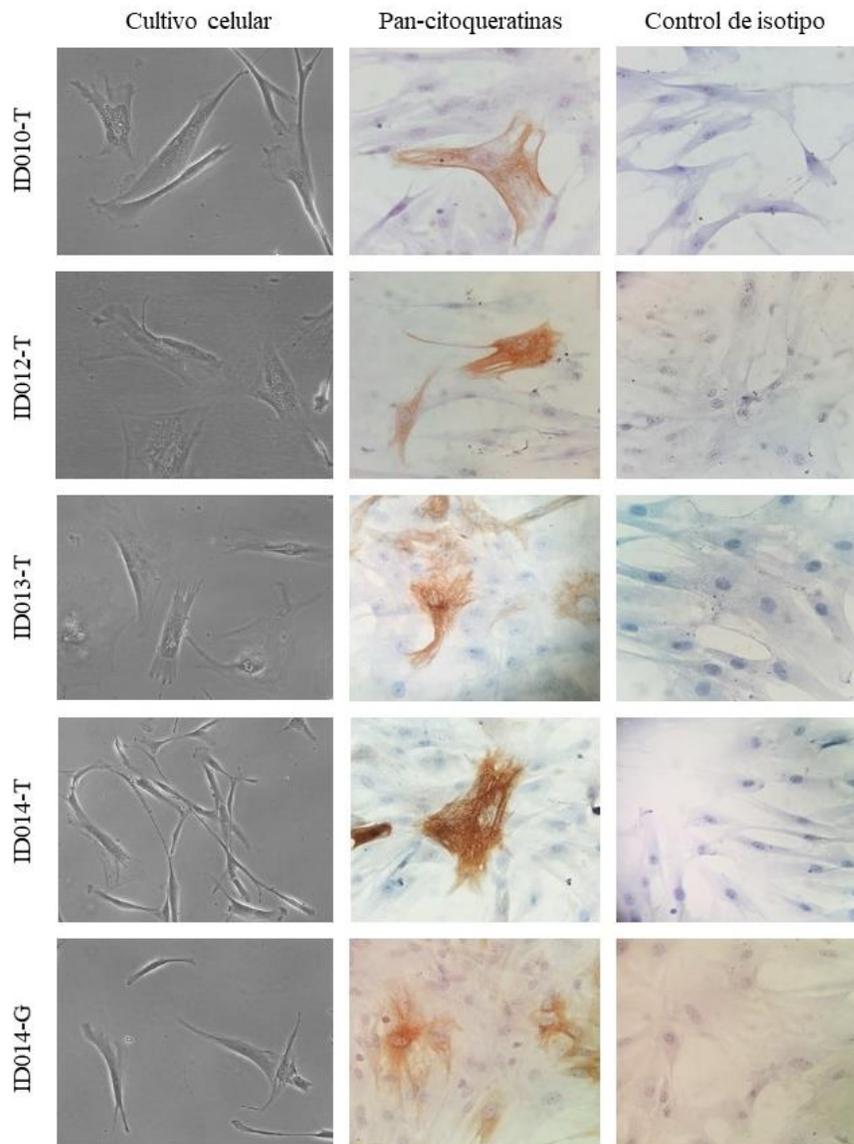
**Tabla I.** Diagnóstico y subtipo molecular de las pacientes

Muestra	Edad	Estadio clínico	Clasificación TNM			Tamaño del tumor	Ganglios involucrados	Tipo histológico	RE	RP	Ki67	HER 2	Subtipo
			T	N	M								
ID010	65	IIA	T2	N0	M0	3	0	CDI	+	+	>14%	+	Luminal HER2
ID012	54	I	pT1b	N0	M0	1	0	CDI	+	-	<14%	+	Luminal HER2
ID013	61	IIB	T2	N3	M0	1.5	13	CDI	-	-	>14%	+	HER2 enriquecido
ID014	40	IIA	T2		M0	4	2	CDI	-	-	>14%	+	HER2 enriquecido

CDI: Carcinoma ductal invasivo, RE: Receptor de estrógeno, RP: Receptor de progesterona, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, Ki67: Marcador pronóstico que indica el incremento de la proliferación celular.

**Tabla II.** Tipo de tejido obtenido para la generación de cultivos primarios

No.	Muestra	Fecha de obtención	Tipo de tejido		
			Tumor primario	Normal	Tumor metastásico
1	ID010	11/07/2017	ID010-T		
2	ID012	08/09/2017	ID012-T		
3	ID013	16/11/2017	ID013-T	ID013-N	
4	ID014	14/12/2017	ID014-T	ID014-N	ID014-G



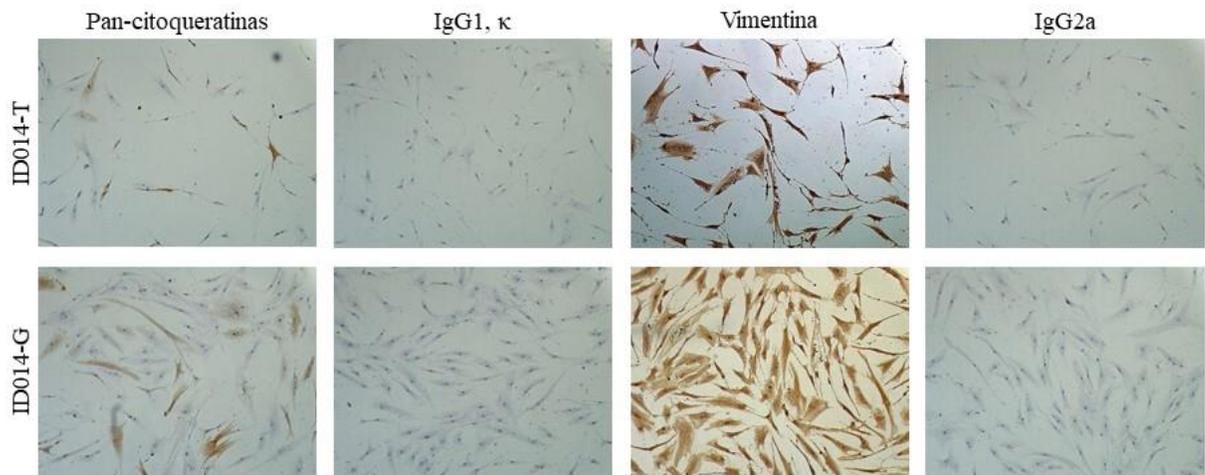
**Figura 3.** Cultivos celulares derivados de tejidos tumorales de mama. Las células del cultivo *in vitro* mostraron morfología alargada con crecimiento adherente a la superficie. En cada uno de los cultivos se encontraron células positivas a distintas citoqueratinas (anticuerpo anti- Pan-citoqueratinas; AE1/AE3), este reconocimiento fue específico mostrando negatividad en el control de isotipo. Las imágenes de cultivo fueron obtenidas en microscopio invertido con magnificación 100x y las de la inmunocitoquímica se obtuvieron de microscopio óptico a 400x.

### **Las Células de las Líneas ID014-T e ID014-G Expresan Características de Células de Origen Epitelial y Mesenquimal**

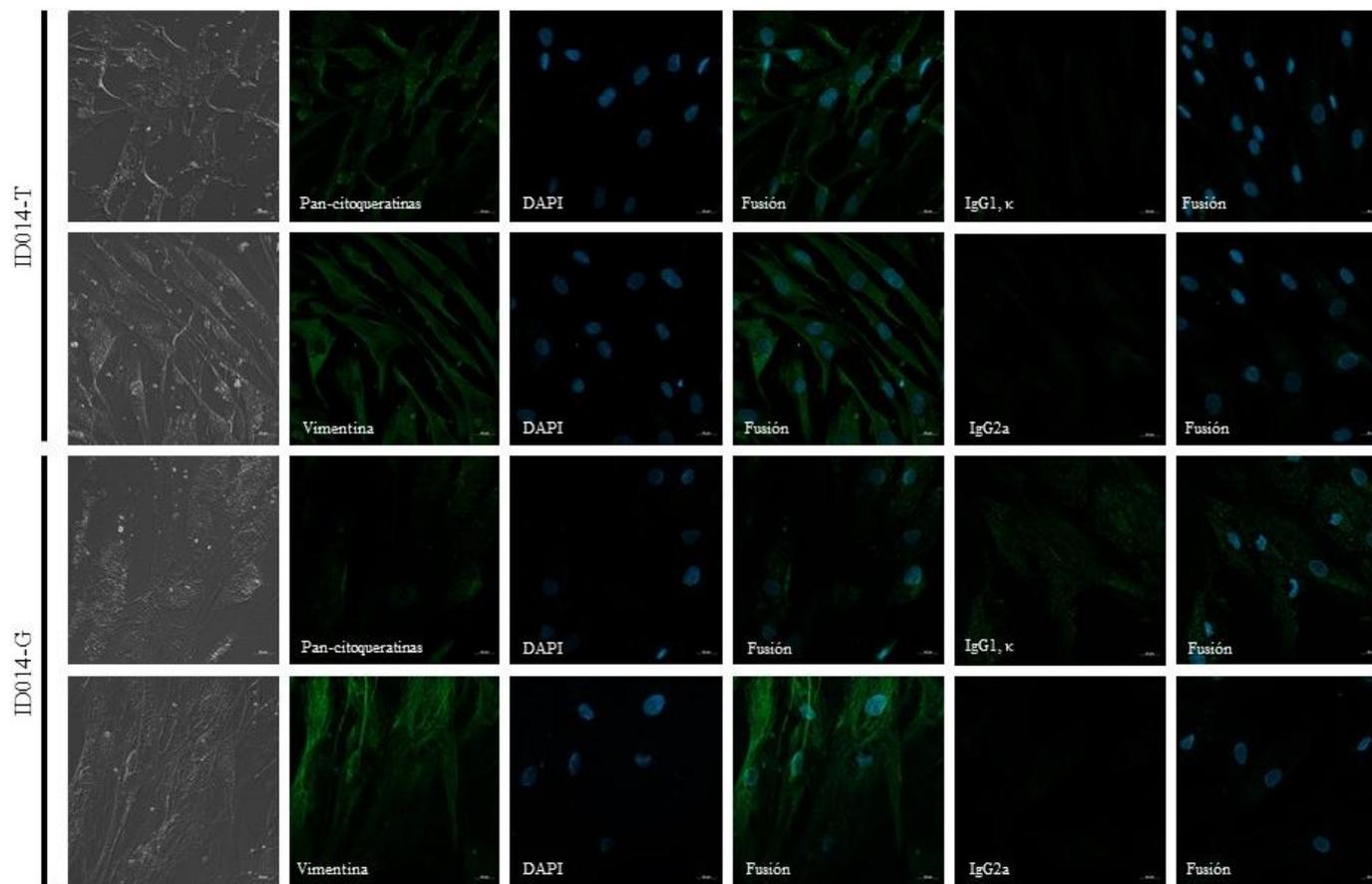
Con el objetivo de determinar el fenotipo de célula presente en las líneas ID014-T e ID014-G se procedió a identificar a células de origen epitelial y mesenquimal, evaluando la presencia de citoqueratinas y vimentina respectivamente. Donde células de las líneas ID014-T e ID014-G presentaron positividad a la presencia de citoqueratinas, siendo reconocidas por un anticuerpo que reconoce determinantes antigénicos de las subfamilias A (56.5, 50, 48 y 40 kD) y B (64, 59, 58, 56 y 52 kD) de las citoqueratinas. Al evaluar la presencia de vimentina se observó que toda la población celular de cada una de las líneas fue reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-vimentina. El control de isotipo de cada uno de los anticuerpos evaluados no reconoció a la población celular.

Nuestro análisis sugirió que toda la población celular de ambas líneas estudiadas, representaban a células de origen mesenquimal y solo un porcentaje de ésta mostraba positividad hacia células epiteliales, sin embargo, en este mismo análisis se observa que la tinción fue gradual en ciertas células (Fig. 4), por lo que se realizó este mismo ensayo utilizando microscopía confocal, tomando en cuenta que este análisis presenta mayor sensibilidad que la inmunocitoquímica.

Los resultados mostraron que toda la población celular de la línea ID014-T fue reconocida por los anticuerpos anti-citoqueratinas y anti-vimentina, a diferencia de la línea ID014-G, cuya población celular mostró en su totalidad positividad solo hacia vimentina y no así hacia citoqueratinas, mostrando este último un reconocimiento inespecífico al compararlo con el control de isotipo (Fig. 5). Estos resultados demuestran que la línea ID014-T presenta de manera homogénea características de células epiteliales y mesenquimales con la presencia de vimentina y citoqueratinas en su citoesqueleto. Con la línea ID014-G se obtuvo positividad en vimentina. La inespecificidad del reconocimiento de citoqueratina podría deberse a errores técnicos durante el ensayo, ya que previamente por inmunocitoquímica esta línea celular presentaba células positivas hacia estas proteínas; resultado que se corrobora en el siguiente ensayo.



**Figura 4.** Las células ID014-T e ID014G provenientes de tejido tumoral mamario expresan características de células de origen epitelial y mesenquimal. Las células ID014-T e ID014G, presentaron células positivas a citoqueratinas (anticuerpo anti-Pan-citoqueratinas; AE1/AE3). Además, toda la población celular fue reconocida por el anticuerpo anti-Vimentina. Los controles de isotipo IgG1 $\kappa$  e IgG2a se incluyeron como control de especificidad (100X, magnificación total).



**Figura 5.** Las células ID014-T expresan de manera homogénea características de células epiteliales y mesenquimales. La población celular de la línea ID014-T fue reconocida por los anticuerpos anti- citoqueratinas y anti- vimentina (verde). En la población celular de la línea ID014-G solo hubo reconocimiento específico del anticuerpo-anti-vimentina. Los controles de isotipo IgG1,  $\kappa$  e IgG2a fueron incluidos como control de especificidad. Las imágenes fueron adquiridas incluyendo el canal de luz transmitida, en combinación con el canal para Alexa 488 y DAPI.

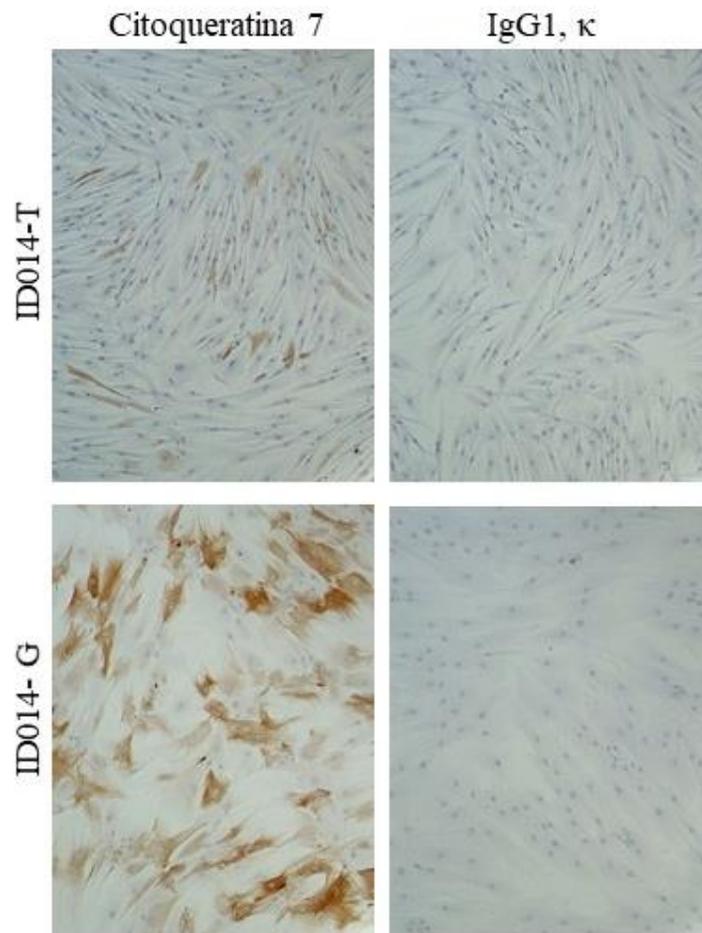
### **Las Líneas Celulares ID014-T e ID014-G Expresan Características de Origen Luminal**

A continuación, se buscó identificar el origen de las células epiteliales, tomando en cuenta que los ductos están compuestos por dos tipos de células de origen epitelial, las células epiteliales lumbinales y las células mioepiteliales. Si tomamos en cuenta las características de ambas células, todo parece indicar que el cultivo está conformado por células mioepiteliales, al presentar filamentos intermedios con vimentina y citoqueratina. Sin embargo, por el tipo de cáncer presentado en la paciente, la célula afectada sería la de origen luminal. Por lo que se procedió a evaluar específicamente citoqueratina 7, marcador diferencial de células epiteliales lumbinales.

Los resultados nos indican que las células de las líneas ID014-T e ID014-G presentaron positividad hacia la citoqueratina 7, mostrando un reconocimiento específico de las células al evaluarlas con su respectivo control de isotipo. Por lo que se podría considerar que las células de estas dos líneas celulares provienen de un origen luminal (Fig. 6).

### **Análisis de cuantificación del nivel de expresión de miRNA 145, 155, 181a y 205 en las líneas ID014-T e ID014-G**

Con el objetivo de caracterizar genóticamente a las líneas celulares generadas, se determinó si presentaban anomalías en la expresión de microRNAs asociados a cáncer de mama. Para ello se extrajo el RNA de las líneas tumorales ID014-T, ID014-G y de las células normales de la misma paciente ID014-N, las cuales se utilizaron como control (Tabla III). A partir de estas muestras se cuantificó la expresión de miR145, 155, 181a y 205 y se determinó que la línea ID014-T mostró una baja expresión en cada uno de ellos al compararlo con las células control (ID014-N), al igual que la línea ID014-G, donde sólo el miR205 no mostró una baja expresión con respecto al control (Tabla IV).



**Figura. 6.** Las células ID014-T e ID014G provenientes de tejido tumoral mamario expresan características de origen luminal. Las líneas celulares ID014-T e ID014 G mostraron la expresión de la citoqueratina 7, lo que sugiere la presencia de células luminales. La especificidad de la tinción se evaluó utilizando el control de isotipo IgG1, κ (100X, magnificación total).

**Tabla III.** Concentración e índice de pureza del ARN total

<b>Muestra</b>	<b>ARN concentración</b>	<b>ARN total</b>	<b>A260/280</b>
ID014-T	1125.8 ng/ $\mu$ L	33.0 $\mu$ g	2.1
ID014-G	89.2 ng/ $\mu$ L	2.6 $\mu$ g	2.1
ID014-N	374.0 ng/ $\mu$ L	11.0 $\mu$ g	2.1

**Tabla IV.** Cálculo del nivel de expresión relativa de miRNA asociados a cáncer

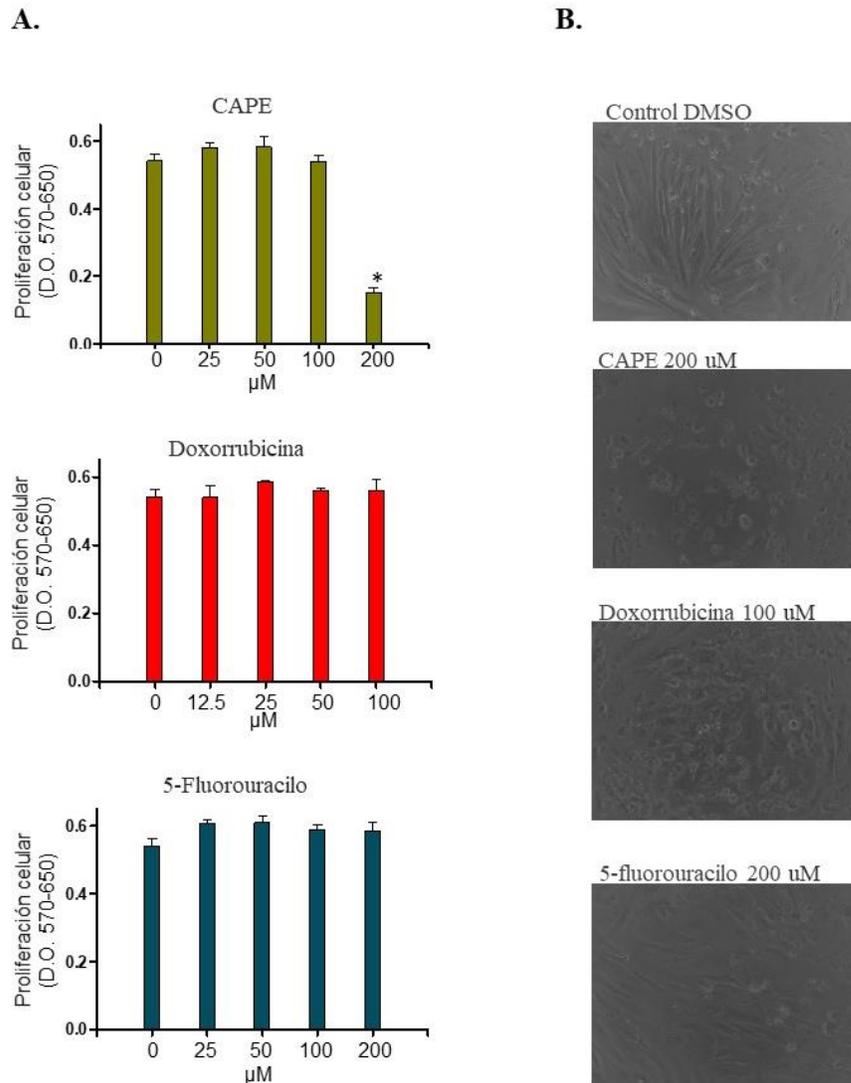
<b>miRNA</b>	<b>Cuantificación relativa*</b>	
	<b>ID014-T</b>	<b>ID014-G</b>
miR-145	0.976	0.953
miR-155	0.973	0.990
miR-181a	0.927	0.963
miR-205	0.963	1.003

\*Valores de expresión relativa del miRNA evaluados en las líneas celulares tumorales con respecto a la línea celular normal.

### **La Línea Celular ID014-T Presenta Susceptibilidad al Tratamiento con CAPE (Éster Fenilico del Ácido Caféico)**

Debido a que estamos generando un modelo de estudio ampliamente utilizado para la evaluación de compuestos con potencial anticancerígeno y fármacos, se decidió evaluar la susceptibilidad de la línea celular ID014-T, ante doxorubicina y 5-fluorouracilo, fármacos que actualmente son utilizados como quimioterapéuticos contra el cáncer de mama. Adicionalmente, se evaluó la susceptibilidad ante CAPE, un compuesto químico presente en ciertos productos naturales, como lo es el propóleo el cual posee distintas actividades biológicas; principalmente se ha observado que tiene un efecto antiproliferativo en diversas células tumorales (Alday y col, 2015).

Las células no mostraron susceptibilidad aparente a doxorubicina y 5-fluorouracilo a las concentraciones evaluadas (12.5-100  $\mu\text{M}$  y 25-200  $\mu\text{M}$ , respectivamente), sin embargo, se observó un efecto inhibitorio de crecimiento con CAPE a 200  $\mu\text{M}$ , mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Fig. 7A). Efecto que es notablemente evidente en el cultivo, donde las células han cambiado su morfología habitual alargada a una forma redonda, incluso se observa que gran parte de la población celular se ha desprendido de la superficie y forman parte ya de un detrito celular (Fig. 7B).



**Figura 7.** Susceptibilidad de la línea ID014-T hacia fármacos antineoplásicos. A. La susceptibilidad de la línea celular ID014-T hacia CAPE, Doxorubicina y 5-Fluorouracilo fue evaluada a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100 y 200 μM), presentando susceptibilidad solo a CAPE a la concentración de 200 μM. La susceptibilidad se evaluó 48 h después de adicionar los fármacos. El asterisco en la barra representa diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. B. Las células mostraron cambios morfológicos evidentes ante CAPE y doxorubicina a las concentraciones más altas. Fotografías tomadas en microscopio óptico invertido (100X, magnificación total).

## DISCUSIÓN

El presente trabajo se enfocó en generar un modelo de estudio representativo de nuestra población, logrando generar cinco líneas celulares tumorales a partir de muestras de pacientes con carcinoma ductal infiltrante. Dos líneas celulares provenientes del tumor primario (ID014-T) y de un ganglio involucrado (ID014-G) de la misma paciente presentaron características de células epiteliales de origen luminal y de células mesenquimales, aparentando estar en una transición epitelial-mesenquimal. Además, las células ID014-T, presentaron susceptibilidad al tratamiento con CAPE y no a doxorubicina y 5-fluorouracilo a las condiciones evaluadas.

El generar una línea celular es considerado un proceso desafiante que implica la disociación de un tejido hasta obtener una suspensión celular que se mantendrá en cultivo *in vitro*. Este paso fue más complicado en la muestra ID010, debido a la dureza del tejido que puede originarse por la presencia predominante de fibroblastos o miofibroblastos y/o colágeno, debido a una respuesta desmoplásica llamada desmoplasia, que se observa en ocasiones en los carcinomas primarios de mama (Walker, 2001). Después de cultivar la suspensión celular de tejido tumoral, se obtuvo una mezcla de varios tipos de células con diferentes morfologías; sin embargo, después de 4 o 5 pases de cada muestra, la morfología de las células en cultivo fue más consistente y homogénea. Este es un comportamiento normal en las etapas primarias, ya que las células se mezclan aleatoriamente en cada transferencia y la presión selectiva en el cultivo tiende a homogeneizar los tipos de células con más capacidades para sobrevivir *in vitro* (Sharma y col, 2010). Esto es necesario cuando se desarrollan líneas celulares, lo que nos permite tener una población axénica.

En este proyecto se generaron tres líneas celulares a partir de los tumores primarios y una a partir de un ganglio linfático axilar, el cual presentaba la presencia de células cancerosas. Sin duda alguna se espera que la obtención de estas líneas celulares nos permita indagar más sobre la biología del cáncer, pero el hecho de obtener dos líneas celulares de la misma paciente, una proveniente de las células cancerosas dentro del tumor primario y la otra de células que ya migraron hacia otro sitio del cuerpo, nos permite tener una

herramienta muy valiosa para estudiar la metástasis, una de las razones principales de la mortalidad en el cáncer de mama (Singh y Mo, 2013).

Una de las primeras etapas de la metástasis es la EMT, que implica el desprendimiento de las células epiteliales de la ECM, la degradación equilibrada de los componentes de la misma y la migración de las células al compartimento estromal (Ackland y col, 2003), implicando en la célula la pérdida de características epiteliales y la ganancia de características mesenquimales, tal es el caso de las células de las líneas celulares ID014-T e ID014-G que además de presentar la presencia de queratinas, característica de células epiteliales, presentaron vimentina, la cual ha sido asociada con una alta invasividad tumoral y quimiorresistencia en cáncer de mama invasivo (Korsching y col, 2005). Si bien la explicación de vimentina en las células epiteliales puede ser explicada por células de origen mioepitelial, la presencia de citoqueratina 7, nos hacen descartar esta teoría y relacionar la presencia de vimentina con la EMT.

A este mismo proceso de transición, se han asociado diversos microRNAs, entre ellos el miR-145, el cual presentó una baja expresión en las líneas celulares ID014-T e ID014-G al compararlas con las células que provenían del tejido normal (ID014-N). Se ha reportado que la baja expresión de este microRNA está asociada a la proliferación, invasión y migración de células cancerosas de mama (Zheng y col, 2016; Ding y col, 2017).

Los microRNAs son reguladores génicos postranscripcionales, que tienen una función en el silenciamiento de genes al degradar el RNA mensajero inhibiendo la traducción de este. Dentro de las moléculas diana de miR-145 se encuentran proteínas asociadas con modificaciones al citoesqueleto de la célula, siendo alguno de sus objetivos ROCK1, una proteína que regula la reorganización del citoesqueleto de actina (Zheng y col, 2015) y FSCN1 (Cui y col, 2014; Zhao y col, 2016; Ye y col, 2018) una proteína que se une a actina y desempeña un papel central en la regulación de la adhesión, la migración y la invasión (Jayo y Parson, 2010) y cuyos niveles de expresión son significativamente más altos en carcinomas ductal invasivo y en el tipo de cáncer triple negativo, al compararlo con el carcinoma *in situ* y los demás subtipos de cáncer respectivamente (Wang y col, 2017b).

Considerando toda esta información, podríamos asociar que los bajos niveles de expresión de miR-145 en las líneas ID014-T e ID014-G podrían favorecer a la EMT, sin embargo, aún faltan muchas pruebas para poder llegar a confirmarlo.

Una de las utilidades de las líneas celulares cancerosas, es como modelos de estudio para la identificación y evaluación de potenciales tratamientos. De tal manera que en el presente trabajo se propuso evaluar la susceptibilidad de la línea ID014-T, ante fármacos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer de mama como doxorrubicina y 5-fluorouracilo, así como la susceptibilidad hacia el éster fenetílico del ácido caféico (CAPE), uno de los principales componentes de los propóleos que posee actividad antiproliferativa. (Sawicka y col, 2012; Motawi y col, 2016); obteniendo como resultado que las células ID014-T presentaron susceptibilidad hacia CAPE a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , sin embargo, no fue así ante doxorrubicina y 5-fluorouracilo a la máxima concentración evaluada (100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Previamente ya se ha observado que la concentración inhibitoria de estos tratamientos ha sido distinta entre diferentes líneas celulares, donde HeLa, una de los principales modelos de estudios y la línea más utilizada a nivel mundial la IC50 de doxorrubicina y 5-fluorouracilo ha sido de  $1.3 \pm 0.1$  y  $>100$   $\mu\text{M}$ , respectivamente (Hernández y col, 2007). Si tomamos en cuenta que en la actualidad la quimioterapia adyuvante varía en la dosis, el esquema de tratamiento y el número de ciclos dependiendo de la enfermedad (Arce y col, 2006) y que la mayoría de estos tratamientos se han evaluado en líneas celulares que provienen de personas de un origen caucásico; el tener líneas celulares que sean representativas de una población en particular podría beneficiarnos al momento de evaluar un tratamiento y tener una visión más objetiva de su posible efecto, para lograr una mayor supervivencia libre de la enfermedad en los pacientes.

Los mecanismos de acción descritos para CAPE son a través de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Sawicka y col, 2012), teniendo un efecto antiproliferativo en las células cancerosas, incluso se ha reportado que CAPE inhibe el crecimiento de células de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA MB 231 tanto *in vitro* como *in vivo* sin tener un gran efecto en las células mamarias normales, teniendo una influencia en la regulación negativa de genes y proteínas implicadas en la proliferación celular, la apoptosis

y la inflamación y una regulación positiva en reguladores del ciclo celular; incluso se observó que CAPE regula a la baja la expresión del gen *mdr-1*, uno de los genes responsable de la resistencia de las células cancerosas a los quimioterapéuticos (Wu y col, 2011).

Doxorrubicina actúa en la célula mediante dos mecanismos: intercalándose en el ADN e interrumpiendo la reparación del ADN mediada por la topoisomerasa-II $\alpha$ , y mediante la generación de radicales libres, dañando a la membrana celular, ADN y proteínas (Thorn y col, 2012). El fármaco 5-FU ejerce sus efectos a través de la inhibición de la timidilato sintasa y la incorporación de sus metabolitos en el ARN y el ADN (Longley y col, 2003). Ambos tratamientos tienen sus principales efectos en la síntesis de ARN, ADN y proteínas, afectando la disponibilidad de estos en la célula, de tal manera que aquellas células con una proliferación acelerada se ven afectadas, y aquellas células que están inactivas o tienen un ciclo lento tienen menos probabilidades de ser susceptibles (Moore y col, 2012), probablemente este sea uno de los motivos por el cual las células cancerosas de ID014-T, llegaron a presentar mayor resistencia a este tipo de tratamientos, ya que en análisis preliminares estas presentaron una proliferación lenta comparándolas con líneas celulares como MDA MB 231 (Anexo 5), sin embargo, aún falta mucho por explorar en este contexto.

Actualmente hay varios modelos de estudio para evaluar la biología del cáncer desde diferentes puntos de vista. Las líneas celulares sin duda han sido pieza clave en el entendimiento de esta patología, sin embargo, mucho se ha cuestionado sobre la relación no tan estrecha que existe entre la línea celular y el tejido tumoral, tomando en cuenta que muchas líneas celulares se han mantenido en cultivo durante décadas, acumulando nuevas aberraciones recurrentes. Un trabajo realizado por Neve y colaboradores (2006) ha demostrado que las líneas celulares de cáncer de mama, a pesar de no reflejar todas las propiedades biológicas y genómicas de los tumores primarios, muestran patrones genómicos y de expresión estables, demostrando ser buenos representantes de los tumores primarios. En este mismo estudio se destaca la importancia de generar líneas celulares que sean derivadas de un cáncer de mama en etapa temprana como las líneas desarrolladas en este estudio, ya que actualmente las líneas celulares con las que se cuenta provienen de

cánceres en etapas tardías o de metástasis en el líquido pleural.

Considerando los datos reportados por Guerrero y col. (2018), realmente existe una necesidad de tener modelos de estudios con orígenes raciales/étnicos más diversos, que representen a distintas poblaciones. Y que los modelos que sean de la población latina, no se agrupen considerando sólo por ser de habla hispana, sino, se consideren sus características raciales y étnicas, ya que somos poblaciones muy diversas (Al-Alem y col (2014). Inclusive nuestro país alberga una gran variación genética que puede resultar en importantes fenotipos biomédicos (Moreno y col, 2014).

El origen geográfico de la población mexicana determina el origen ancestral, las subpoblaciones del norte de México como Sonora tienen la mayor contribución ancestral en Europa (Silva y col, 2009). Y de acuerdo con estudios realizados por Fejerman y col, la ascendencia europea en las mujeres latinas (2008, 2012) y mexicanas (2010) está asociada positivamente con el riesgo de cáncer de mama. Un estudio elaborado por Villarreal y colaboradores (2019) determinó que mujeres más jóvenes, tenían con mayor frecuencia una enfermedad avanzada, así como una mayor proporción de tumores. Además, este tipo de población (jóvenes hispanas), al igual que las mujeres de raza negra, presentan con mayor frecuencia cáncer de mama triple negativo (Parise y Caggiano, 2017).

Toda esta información destaca la importancia de considerar a nuestra población con una gran diversidad genética, vulnerable a presentar factores de riesgos asociados a cáncer de mama; y a la vez nos hace dar cuenta que tenemos una responsabilidad como investigadores en tratar de comprender y estudiar a nuestra población, para que en un futuro se pueda comprender y tratar la enfermedad de una manera más personalizada. Este proyecto no busca solo la generación de líneas celulares, sino, el comienzo de un estudio más específico de nuestra población.

## CONCLUSIONES

- Se establecieron 7 cultivos celulares a partir de tejido mamario de pacientes con cáncer de mama (4 de tejido tumoral, 2 de tejido aparentemente normal y 1 de ganglio linfático con metástasis).
- Se evaluaron características fenotípicas de las líneas ID014-T e ID014-G, demostrando ser células de origen epitelial luminal, las cuales han desarrollado características de células mesenquimales.
- Se evaluó la sensibilidad de la línea celular ID014-T ante diferentes fármacos antineoplásicos, obteniendo que esta línea presentó susceptibilidad al compuesto bioactivo CAPE.

## REFERENCIAS

- Abba, M. L., Patil, N., Leupold, J. H., & Allgayer, H. (2016). MicroRNA Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of clinical medicine*, 5(1), 8. doi:10.3390/jcm5010008
- Ackland, M. L., Newgreen, D. F., Fridman, M., Waltham, M. C., Arvanitis, A., Minichiello, J., Price, J. T., Thompson, E. W. (2003). Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest*, 83(3):435-48
- Al-Alem, U., Rauscher, G., Shah, E., Batai, K., Mahmoud, A., Beisner, E., ... Kittles, R. (2014). Association of genetic ancestry with breast cancer in ethnically diverse women from Chicago. *PloS one*, 9(11), e112916. doi:10.1371/journal.pone.0112916
- Alberts, Bruce. 2008. *Molecular biology of the cell*. [Hauptbd.]. [Hauptbd.]. New York, NY [u.a.]: Garland Science Taylor & Francis.
- Alday, E., Valencia, D., Carreño, A. L., Picerno, P., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., Robles-Zepeda, R., Hernandez, J., Velazquez, C. (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Biol Interact*; 242:35-44. doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.013
- Arce, C., Martínez-Tlahuel, J., Lara, F. U. (2006). Quimioterapia adyuvante en cáncer de mama: Presente y futuro. *Cancerología*; 177-185
- ATCC. Primary cell culture guide. Tips and techniques for culturing primary cells. American Type Culture Collection. 2012
- Butcher, D. T., Alliston, T., Weaver, V.M. 2009. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*; 9(2):108-22. doi: 10.1038/nrc2544
- Baba, A. I., & Cătoi, C. (2007). *Comparative oncology*. Bucharest, The Publishing House of the Romanian Academy

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=componc>.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*; 68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2010). Cancer cell of origin: spotlight on luminal progenitors. *Cell stem cell*, 7(3), 271–272. doi:10.1016/j.stem.2010.08.008
- Cui, S. Y., Wang, R., & Chen, L. B. (2014). MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(10), 1913–1926. doi:10.1111/jcmm.12358
- Ding, Y., Zhang, C., Zhang, J., Zhang, N., Li, T., Fang, J., Zhang, Y., Zuo, F., Tao, Z., Tang, S., Zhu, W., Chen, H., Sun, X. (2017). miR-145 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by directly or indirectly regulating TGF- $\beta$ 1 expression. *International Journal of Oncology*, 50(5):1701-1710. doi: 10.3892/ijo.2017.3945
- Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Montecchia F, Charreau EH, Pasqualini CD, Lanari C. (1995). Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat*; 35(2):173-86
- Eccles, S. A. (2001). The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *Journal of Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6(4):393-406
- Esebua M. Cell and molecular biology of breast cancer. In: Schatten H, editor. *Histopathology and Grading of Breast Cancer*. New York: Springer; 2013. pp. 1–27
- Fejerman, L., Romieu, I., John, E. M., Lazcano-Ponce, E., Huntsman, S., Beckman, K. B., ... Torres-Mejía, G. (2010). European ancestry is positively associated with breast cancer risk in Mexican women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the*

American Society of Preventive Oncology, 19(4), 1074–1082. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1193

Fejerman, L., Chen, G. K., Eng, C., Huntsman, S., Hu, D., Williams, A., ... Ziv, E. (2012). Admixture mapping identifies a locus on 6q25 associated with breast cancer risk in US Latinas. *Human molecular genetics*, 21(8), 1907–1917. doi:10.1093/hmg/ddr617

Fejerman, L., John, E. M., Huntsman, S., Beckman, K., Choudhry, S., Perez-Stable, E., ... Ziv, E. (2008). Genetic ancestry and risk of breast cancer among U.S. Latinas. *Cancer research*, 68(23), 9723–9728. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2039

Ferreira, D., Adegá, F., Chaves, R. (2013). *The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylome Analysis and Anticancer Drugs Testing*. INTECH Open Access Publisher. DOI: 10.5772/53110

Gazdar, A. F., Carney, D. N., Nau, M. M. & Minna, J. D. (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res.* 45, 2924–2930

Gazdar, A. F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H. T., Wistuba, I. I., Tomlinson, G., Tonk, V., Ashfaq, R., Leitch, A. M., Minna, J. D., Shay, J. W. (2008). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer*, 78(6):766-74

Goh, J. N., Loo, S. Y., Datta, A., Siveen, K. S., ... Kumar A. P. (2016). microRNAs in breast cancer: regulatory roles governing the hallmarks of cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc*; 91(2):409-28. doi: 10.1111/brv.12176

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008). "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1". *Nat Cell Biol.*

10 (5): 593–601

Guerrero, S., López-Cortés, A., Indacochea, A., García-Cárdenas, J. M., Zambrano, A. K., Cabrera-Andrade, A., ... Paz-Y-Miño, C. (2018). Analysis of Racial/Ethnic Representation in Select Basic and Applied Cancer Research Studies. *Scientific reports*, 8(1), 13978. doi:10.1038/s41598-018-32264-x

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57–70

Hasegawa Y, Kawaguchi T, Kubo A, Ando M, Shiraishi J, Isa S, et al. Ethnic difference in hematological toxicity in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy: a pooled analysis on Asian versus non-Asian in phase II and III clinical trials. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1881–8

Hernandez J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Dominguez Z, Robles R, Vazquez-Moreno L, Velazquez EF, Astiazaran H, Lugo E, Velazquez C. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med*;73(14):1469-74

Hilton HN, et al. Progesterone stimulates progenitor cells in normal human breast and breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;143:423–433. doi: 10.1007/s10549-013-2817-2

Huang, R. S., Gamazon, E. R., Ziliak, D., Wen, Y., Im, H. K., Zhang, W., ... Dolan, M. E. (2011). Population differences in microRNA expression and biological implications. *RNA biology*, 8(4), 692–701. doi:10.4161/rna.8.4.16029

Hungermann, D., Buerger, H., Oehlschlegel, C., Herbst, H., & Boecker, W. (2005). Adenomyoepithelial tumours and myoepithelial carcinomas of the breast--a spectrum of monophasic and biphasic tumours dominated by immature myoepithelial cells. *BMC cancer*, 5, 92. doi:10.1186/1471-2407-5-92

INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)". Datos

nacionales, Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2017

Jayo A., Parsons M. Fascin: A key regulator of cytoskeletal dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010;42:1614–1617. doi: 10.1016/j.biocel.2010.06.019

Jiao X., Zhao L., Ma M., Bai X., He M., Yan Y., Wang Y., Chen Q., Zhao X., Zhou M. MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(3):717–730. doi: 10.1007/s10549-013-2607-x

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420–1428. doi:10.1172/JCI39104

Khan, H.B.H., Panchanadham, S.T. & Palanivelu, S. *Comp Clin Pathol* (2015) 24: 1439. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2092-1>

Korsching E., Packeisen J., Liedtke C., Hungermann D., Wülfing P., van Diest P.J., Brandt B., Boecker W., Buerger H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: Epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J. Pathol.* 2005;206:451–457. doi: 10.1002/path.1797

Ku, J. L., Shin, Y.K., Kim, D.W....Park, J. G. (2010). Establishment and characterization of 13 human colorectal carcinoma cell lines: mutations of genes and expressions of drug-sensitivity genes and cancer stem cell markers. *Carcinogenesis*; 31(6):1003-9. doi: 10.1093/carcin/bgq043

Labarge, M. A., Garbe, J. C., & Stampfer, M. R. (2013). Processing of human reduction mammoplasty and mastectomy tissues for cell culture. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (71), 50011. doi:10.3791/50011

Langdon, S. P. *Cancer cell culture: Methods and protocols.* 2004, Totowa, N.J: Humana Press

Langlois, A. J., Holder, W. D. Jr., Iglehart, J. D., Nelson-Rees, W. A., Wells, S. A. Jr.,

- Bolognesi, D. P. (1979). Morphological and biochemical properties of a new human breast cancer cell line. *Cancer Res* ;39(7 Pt 1):2604-13
- Leehy, K. A., Truong, T. H., Mauro, L. J., & Lange, C. A. (2017). Progesterone receptors (PR) mediate STAT actions: PR and prolactin receptor signaling crosstalk in breast cancer models. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 176, 88–93. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.04.011
- Li, Jiang, Chen, and Zheng. 2015. "Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review)". *Molecular Medicine Reports*. 11 (3): 1566-1572
- Liu, y., Huang, W., Yang, H., & Luo, Y. (2015) Expression and function of miR-155 in breast cancer, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29:5, 840-843, DOI: 10.1080/13102818.2015.1043946
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.1, Tumor Cells and the Onset of Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21590/>
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*; 3(5):330-8
- Lv, J., Xia, K., Xu, P., Sun, E., Ma, J., Gao, S., Zhou, Q., Zhang, M., Wang, F., Chen, F., Zhou, P., Fu, Z., Xie, H., miRNA expression patterns in chemoresistant breast cancer tissues. *Biomed. Pharmacother.*, 68 (2014), pp. 935-942
- Makki J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical medicine insights. Pathology*, 8, 23–31. doi:10.4137/CPath.S31563
- Maletzki, C., Gock, M., Randow, M., Klar, E., Huehns, M., Prall, F., & Linnebacher, M. (2015). Establishment and characterization of cell lines from chromosomal instable colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 21(1), 164–176. doi:10.3748/wjg.v21.i1.164
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... Weinberg,

- R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- Mattiske, S., Suetani, R. J., Neilsen, P. M., Callen, D. F. (2012). The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 21(8):1236-43. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0173
- Mitra A; Mishra L; Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(6): 347–354
- Moore, N., Houghton, J., & Lyle, S. (2011). Slow-cycling therapy-resistant cancer cells. *Stem cells and development*, 21(10), 1822–1830. doi:10.1089/scd.2011.0477
- Moreno-Estrada, A., Gignoux, C. R., Fernández-López, J. C., Zakharia, F., Sikora, M., Contreras, A. V., ... Bustamante, C. D. (2014). Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science* (New York, N.Y.), 344(6189), 1280–1285. doi:10.1126/science.1251688
- Motawi TK, Abdelazim SA, Darwish HA, Elbaz EM, Shouman SA. (2016). Could Caffeic Acid Phenethyl Ester Expand the Antitumor Effect of Tamoxifen in Breast Carcinoma?. *Nutr Cancer*; 68(3):435-45. doi: 10.1080/01635581.2016.1153669
- Thummel K.E. & Lin Y.S. (2014). Sources of interindividual variability. *Methods Mol. Biol.* 1113, 363–415
- Nassar, F.J.; Talhouk, R.; Zgheib, N.K.; Tfayli, A.; El Sabban, M.; El Saghier, N.S.; Boulos, F.; Jabbour, M.N.; Chalala, C.; Boustany, R.-M. (2017). microRNA Expression in Ethnic Specific Early Stage Breast Cancer: An Integration and Comparative Analysis. *Sci. Rep.* 2017, 7, 16829
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., ... Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 10(6), 515–527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
- O'Donnell, P. H., & Dolan, M. E. (2009). Cancer pharmacoethnicity: ethnic differences in

- susceptibility to the effects of chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(15), 4806–4814. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0344
- Oakman C, Moretti E, Galardi F, Santarpia L, Di Leo A. (2009). The role of topoisomerase IIalpha and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients. *Cancer Treat Rev*; 35(8):662-7. doi: 10.1016/j.ctrv.2009.08.006
- Ouyang M, Li Y, Ye S, Ma J, Lu L, et al. (2014) MicroRNA Profiling Implies New Markers of Chemoresistance of Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS ONE* 9(5): e96228. doi:10.1371/journal.pone.0096228
- Racial Differences in Cancer Susceptibility and Survival: More Than the Color of the Skin?. *Trends in cancer*, 3(3), 181–197. doi:10.1016/j.trecan.2017.02.002
- Pabón-Martínez, Y. Vladimir. (2011). MicroARNs: una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(3), 289-297. Retrieved May 03, 2019, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-08072011000300010&lng=en&tlng=](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000300010&lng=en&tlng=)
- Parise, C.A. & Caggiano, V. *Breast Cancer Res Treat* (2017) 163: 151. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4159-y>
- Pechoux C, Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. (1999). Human mammary luminal cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol* 206: 88-99
- Petrovic N, Kolakovic A, Stankovic A, Lukic S, Rami A, Ivkovic M, Mandusic V. MiR-155 expression level changes might be associated with initial phases of breast cancer pathogenesis and lymph-node metastasis. *Cancer Biomark*. 2016;16:385–394
- Phan VH, et al. Ethnic differences in drug metabolism and toxicity from chemotherapy. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol*. 2009;5:243–257. doi: 10.1517/17425250902800153
- Porter PL, Lund MJ, Lin MG, Yuan X, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, Eley JW. (2004).

- Racial differences in the expression of cell cycle-regulatory proteins in breast carcinoma. *Cancer*. 2004 Jun 15;100(12):2533-42
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), 1423–1437. doi:10.1038/nm.3394
- Rezaei, N., *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context*, Springer, Berlin, Germany, 2015
- Ryan, J. L., Bole, C., Hickok, J. T., Figueroa-Moseley, C., Colman, L., Khanna, R. C., ... Morrow, G. R. (2007). Post-treatment skin reactions reported by cancer patients differ by race, not by treatment or expectations. *British journal of cancer*, 97(1), 14–21. doi:10.1038/sj.bjc.6603842
- Sawicka D, H Car, MH Borawska, and J Nikliński. 2012. "The anticancer activity of propolis". *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 50 (1): 25-37
- Schmittgen TD, Livak KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*; 3(6):1101-8
- Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:241–253
- Shen, C., Gu, M., Liang, D., Miao, L., Hu, L., Zheng, C., & Chen, J. (2009). Establishment and characterization of three new human breast cancer cell lines derived from Chinese breast cancer tissues. *Cancer cell international*, 9, 2. doi:10.1186/1475-2867-9-2
- Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A... Jimenez-Sanchez, G. (2009) Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8611–8616. DOI: 10.1073/pnas.0903045106
- Singh, R., & Mo, Y. Y. (2013). Role of microRNAs in breast cancer. *Cancer biology & therapy*, 14(3), 201–212. doi:10.4161/cbt.23296
- Smith HS, Zoli W, Volpi A, Miller A, Lippman M, Swain S, Mayall B, Dollbaum C,

- Hackett AJ, Amadori D: Preliminary correlations of clinical outcome within vitro chemosensitivity of second passage human breast cancer cells. *Cancer Res* 50: 2943–2948, 1990
- Speirs V, Green AR, Walton DS, Kerin MJ, Fox JN, Carleton PJ, Desai SB, Atkin SL. (1998). Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours. *Br J Cancer*, 78: 1421-1429
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. doi:10.1038/nature07943
- Taylor, M. A., Sossey-Alaoui, K., Thompson, C. L., Danielpour, D., & Schieman, W. P. (2012). TGF- $\beta$  upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 123(1), 150–163. doi:10.1172/JCI64946
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), 440–446. doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
- Vazquez SM, Mladovan A, Garbovesky C, Baldi A, Luthy IA (2004) Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. *J Cell Physiol* 199:460–469
- Vazquez, A. (2018). Cuantificación de miRNAs en suero de mujeres con cáncer de mama y su relación con características clínico-patológicas. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora
- Vilardell, F., Novell, A., Martin, J., Santacana, M., Velasco, A., Díez-Castro, M. J., ... Matias-Guiu, X. (2012). Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 460(6):569–575. doi:10.1007/s00428-012-1241-z

- Villarreal-Garza, C., Lopez-Martinez, E. A., Muñoz-Lozano, J. F., & Unger-Saldaña, K. (2019). Locally advanced breast cancer in young women in Latin America. *Ecancermedicalscience*, 13, 894. doi:10.3332/ecancer.2019.894
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*; 28(10):1684-91. doi: 10.1200/JCO.2009.24.9284
- Walker R. A. (2001). The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast cancer research : BCR*, 3(3), 143–145. doi:10.1186/bcr287
- Wang, H., Huang, S., Shou, J., Su, E. W., Onyia, J. E., Liao, B., & Li, S. (2006). Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data. *BMC genomics*, 7, 166. doi:10.1186/1471-2164-7-166
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., ... Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773. doi:10.7150/jca.17648
- Wang CQ, Li Y, Huang BF, Zhao YM, Yuan H, Guo D. et al. EGFR conjunct FSCN1 as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Scientific reports*. 2017;7:15654
- Wiencke, J. K. (2004) Impact of race/ethnicity on molecular pathways in human cancer. *Nat Rev Cancer* ;4(1):79-84. doi: 10.1038/nrc1257
- Wu, H., Zhu, S., & Mo, Y. Y. (2009). Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell research*, 19(4), 439–448. doi:10.1038/cr.2009.18
- Wu, J., Omene, C., Karkoszka, J., Bosland, M., Eckard, J., Klein, C. B., & Frenkel, K. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer letters*, 308(1), 43–53. doi:10.1016/j.canlet.2011.04.012
- Yasuda, S. U., Zhang, L., Huang, S. M. (2008). The role of ethnicity in variability in

response to drugs: focus on clinical pharmacology studies. *Clin Pharmacol Ther*, 84(3):417-23. doi: 10.1038/clpt.2008.141

Ye, P., Shi, Y., An, N., Zhou, Q., Guo, J., Long, X. (2018). miR-145 overexpression triggers alteration of the whole transcriptome and inhibits breast cancer development. *Biomed Pharmacother*, 100:72-82. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.167

Zhao, H., Kang, X., Xia, X., Wo, L., Gu, X., Hu, Y., ... Shen, X. (2016). miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *American journal of translational research*, 8(7), 3106–3114

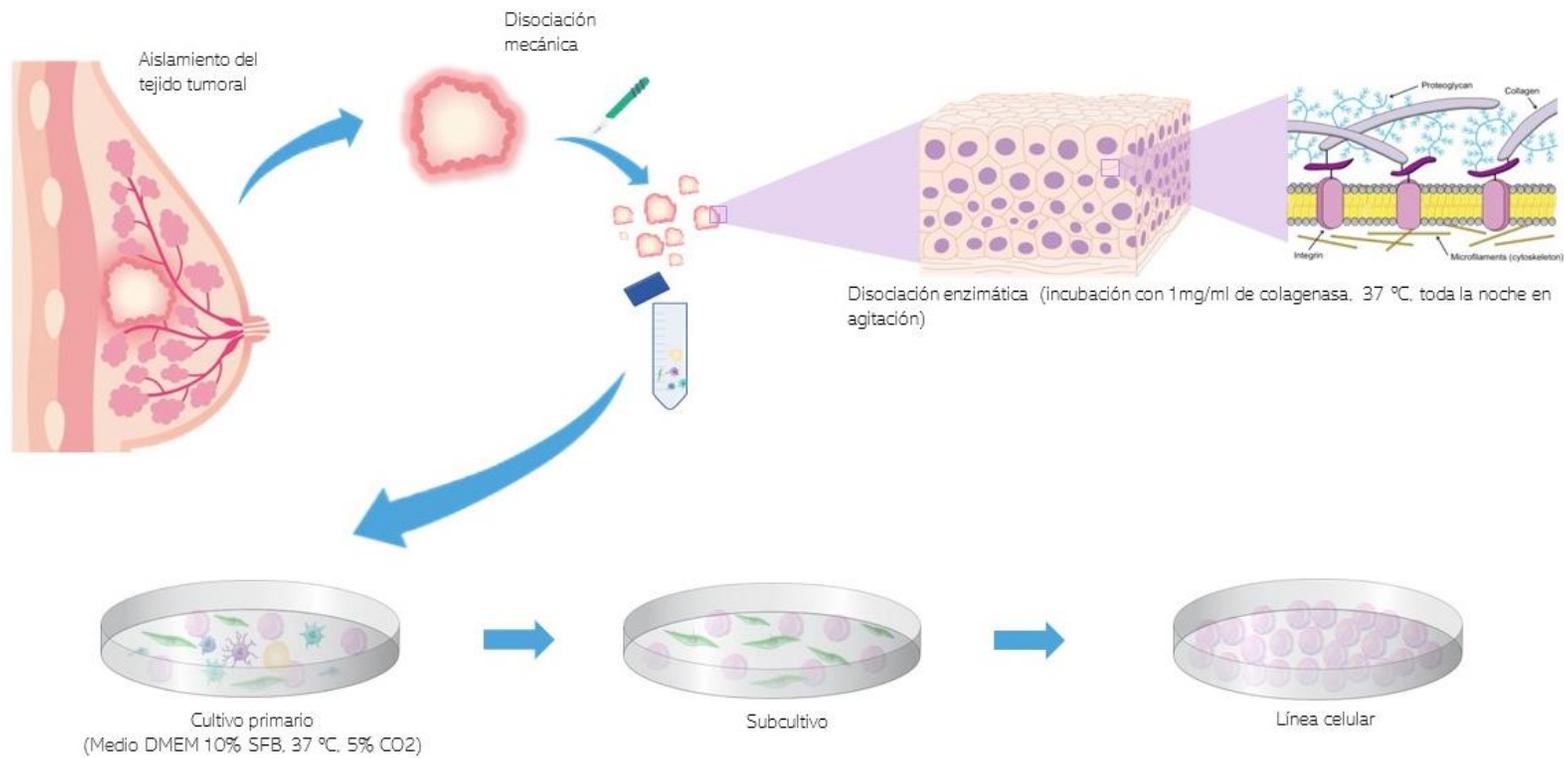
Zheng, C., Sun, Y. H., Ye, X. L., Chen, H. Q., Ji, H. B. (2011). Establishment and characterization of primary lung cancer cell lines from Chinese population. *Acta Pharmacol Sin*; 32(3):385-92. doi: 10.1038/aps.2010.214

Zheng, M., Sun, X., Li, Y., Zuo, W. (2016). MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. *Tumour Biol* ;37(6):8189-96. doi: 10.1007/s13277-015-4722-2

## ANEXOS

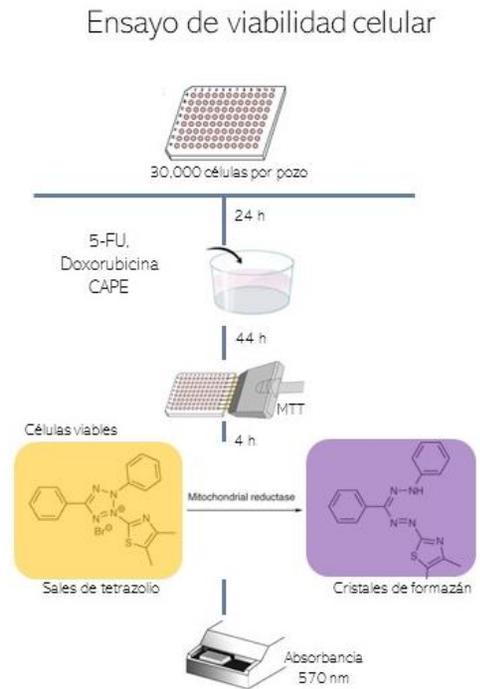
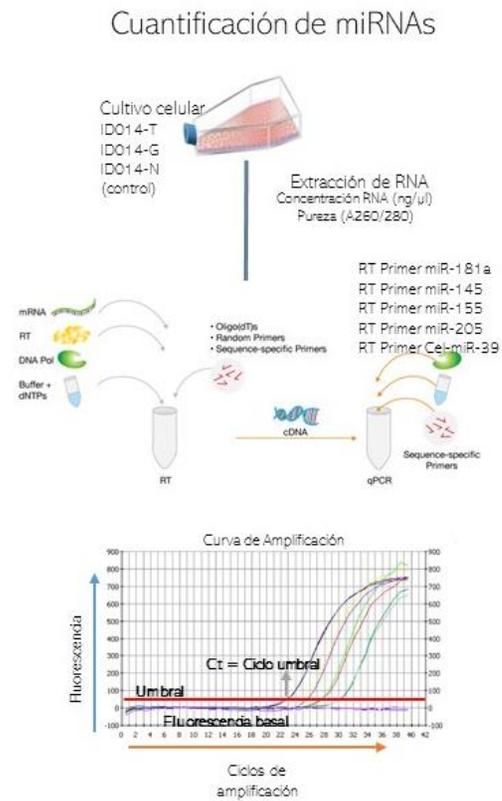
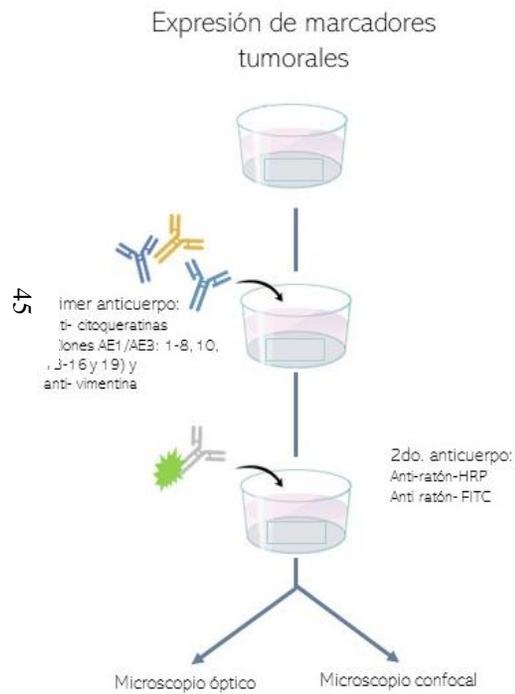
### Anexo 1

#### Esquema General de Trabajo: Obtención y Generación de la Línea Celular.



## Anexo 2

### Esquema General de Trabajo: Caracterización Parcial de las Líneas Celulares.



### **Anexo 3**

#### **Protocolo Inmunocitoquímica**

1. Colocar un cubreobjetos estéril en un pozo (placa de 6 pozos) e incubar con  $1 \times 10^5$  células con 1 mL de D5F, hasta confluencia a 37 °C.
2. Descartar el sobrenadante y adicionarle 1 mL de PBS, para retirar los restos de medio que hayan quedado (2 veces).
3. Fijar y permeabilizar las células con 1 mL de EtOH absoluto a -20 °C, durante 20 min.
4. Descartar el sobrenadante y adicionar 2 mL de PBS durante 3 min.
5. Incubar las células con 100  $\mu$ L PBS-BSA 0.1% durante 15 min.
6. Retirar el sobrenadante y adicionar 2 mL de PBS 1X.
7. Descartar el sobrenadante e incubar durante 45 min cada muestra con el anticuerpo primario a una concentración de 1 $\mu$ g/mL .
8. Retirar el sobrenadante y adicionar 2 mL de PBS 1X durante 3 minutos en agitación (Repetir 3 veces).
9. Incubar 30 min con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP.
10. Retirar el sobrenadante de IgG-HRP y lavar las células con PBS por 3 min (3 veces)
11. Incubar por 3 min con 5% de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro con peróxido (DAKO; Dinamarca).
12. Lavar las células con agua destilada y adicionar hematoxilina por 10 seg. e inmediatamente lavar con agua destilada.
13. Colocar entellan (DAKO; Dinamarca) y montar en un portaobjetos para su análisis en microscopio óptico.

## Anexo 4

### **Protocolo Microscopía Confocal**

1. Colocar un cubreobjetos estéril en un pozo (placa de 6 pozos) e incubar con  $1 \times 10^5$  células con 1 mL de D5F, hasta confluencia a 37 °C.
2. Descartar el sobrenadante y adicionarle 1 mL de PBS, para retirar los restos de medio que hayan quedado (2 veces).
3. Fijar y permeabilizar las células con 1 mL de EtOH absoluto a -20 °C, durante 20 min.
4. Descartar el sobrenadante y adicionar 2 mL de PBS durante 3 min.
5. Incubar las células con 100  $\mu$ L PBS-BSA 0.1% durante 15 min.
6. Retirar el sobrenadante y adicionar 2 mL de PBS 1X.
7. Descartar el sobrenadante e incubar durante 45 min cada muestra con el anticuerpo primario a una concentración de 1 $\mu$ g/mL .
8. Retirar el sobrenadante y adicionar 2 mL de PBS 1X durante 3 minutos en agitación (Repetir 3 veces).
9. Incubar 30 min con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG-FITC (1:1000).
10. Descargar el sobrenadante y lavar 3 veces con 2 mL de PBS por 3 min.
11. Incubar con 300 nM de DAPI por 10 min.
12. Lavar con agua y colocar el cubreobjetos en el portaobjeto y sellarlo con esmalte de uñas.

## **Anexo 5**

### **Curva de Crecimiento Mediante MTT**

1. Colocar 10 placas de 96 pozos fondo plano con 5000 células en 100  $\mu$ L de DMEM suplementado al 10% con SFB.
2. Después de incubar durante 20 h y a una de las cajas se le adiciona 10  $\mu$ L de solución de MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incuba por 4 h.
3. Posteriormente adicionar 100  $\mu$ L de isopropanol ácido a cada pozo para disolver los cristales formados
4. Determinar la absorbancia mediante un lector de microplacas (ThermoLab System, EE. UU.) a las longitudes de onda 570 nm y 650 nm (Alday y col, 2015).
5. Repetir el ensayo cada 24 h hasta el día 10.

## Anexo 6

### Secuencia de iniciadores Utilizados para la Evaluación de microRNAs

Información de iniciadores empleados.

MicroRNA (Sonda FAM)	Número de Acceso en miRBase	Secuencia
hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	5'ACCACUGACCGUUGACUGUACC3'
hsa-miR-145-3p	MIMAT0004601	5'GGAUUCCUGGAAAACUGUUCU3'
hsa-miR-155-3p	MIMAT0004658	5'CUCCUACAUAUUAGCAUUAACA3'
hsa-miR-205-3p	MIMAT0009197	5'GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC3'
Primer control (Sonda VIC)	Número de Acceso en miRBase	Secuencia
cel-miR-39	MIMAT0000010	5'UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG3'

miRBase: Base de datos para secuencias de miRNAs publicadas (<http://www.mirbase.org/>)

## Anexo 7

### Cálculo de la Expresión Relativa de miRNAs

La expresión relativa de los miRNA maduros se calculó mediante el método del doble delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). El Ct se define como el ciclo de PCR en el cual la señal de fluorescencia del colorante reportero cruza un umbral de amplificación. Los datos de Ct se colectan en la fase exponencial de la amplificación de PCR. El valor numérico del Ct es inversamente relacionado a la cantidad de amplicón en la reacción.

A continuación, se describen los pasos realizados para el cálculo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ :

1. Normalización de los datos

A cada valor de Ct de cada miRNA se le resta el Ct del miRNA control (cel-miR-39), siguiendo la fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del control interno})$$

2. Cálculo del  $\Delta\Delta CT$

Posteriormente se resta el  $\Delta Ct$  de la línea celular normal a los  $\Delta Ct$  de las líneas celulares tumorales, el resultado de dicha resta corresponde al  $\Delta\Delta Ct$ , al cual se aplica la exponencial  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . El valor resultante representa el nivel de expresión relativa del miRNA.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del control interno})_{\text{paciente con cáncer de mama}}}{(Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del control interno})_{\text{paciente sana}}}$$

Los resultados obtenidos a partir de la fórmula se interpretan como la expresión relativa del miRNA de interés de las líneas celulares tumorales con respecto a la línea celular normal.