

UCH-FC  
Biotecnología  
F465  
C-1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



## “INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS Y CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**FERNANDO ANTONIO FIERRO BECKER**

**Director de Memoria de Título**

Dr. José Minguell Uribe

**Co-Director**

Dr. Walter Sierralta

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Marco Tulio Nuñez González  
Presidente Comisión

Dr. Juan Fernández Hidalgo



Santiago de Chile, 10 de noviembre 2003

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INSTITUTO DE NUTRICIÓN EN  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS Y  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Fernando Antonio Fierro Becker

Septiembre, 2003.

Santiago - Chile



Director de Tesis: Dr. José Minguell Uribe  
Co-director de tesis: Dr. Walter Sierralta

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, que han hecho tan grata y fructífera mi estadía en el INTA.

Gracias Dr. Erices y Dra. Rojas por tantos consejos acertados y la excelente asistencia técnica.

Mil gracias Dr. Minguell por el constante apoyo y preocupación. En especial le agradezco el haberme mantenido cerca del área clínica, para siempre recordar a toda esa gente que tiene sus esperanzas depositadas en los avances de la ciencia.

Muchas gracias Dr. Sierralta por su infaltable apoyo y por mostrarme como cada célula es un universo completo.





## INDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVOS.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
RESULTADOS.....	21
1. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) de cambios ultraestructurales en células tumorales MCF-7 al co-cultivarlas con células troncales mesenquimáticas (MSC) o al incubarlas con medios condicionados por MSC.....	21
1.1. Alteraciones en la ultraestructura de MCF-7 inducidas al co-cultivarse con MSC....	21
1.2. Alteraciones en la ultraestructura de MCF-7 al cultivarlas con MSC en sistemas bicamerales.....	22
2. Proliferación de células epiteliales (MCF-7 y MCF-10): efecto de contactos con MSC o de cultivos con medios condicionados por MSC.....	24
2.1. Proliferación de células MCF-7 y MCF-10 en co-cultivos con MSC.....	24
2.1. Efecto de medios condicionados por MSC en la proliferación de células MCF-7 y MCF-10.....	26
3. Modulación de contactos celulares entre células MCF-7, al ser co-cultivadas con células MSC o al cultivarlas en presencia de medios condicionados por MSC. ....	28

3.1. Modalidad de crecimiento (formación de clusters vs. crecimiento aislado) de MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC.....	29
3.2. Expresión de e-cadherina en MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC.....	29
3.3. Efecto de medios condicionados por MSC en la expresión de e-cadherina en MCF-7.....	30
3.4. Análisis por western blot, de la expresión de e-cadherina en MCF-7 cultivadas con medio condicionado por MSC.....	31
3.5. Estudio por microscopía electrónica de transmisión de contactos entre MCF-7 co-cultivadas con MSC en sistemas bicamerales.....	31
4. Efecto de bFGF y VEGF en la proliferación de MCF-7 y MCF-10 y efecto de bFGF en la expresión de e-cadherina en MCF-7.....	33
4.1. Efecto de bFGF y VEGF en la proliferación de MCF-7 y MCF-10.....	33
4.2. Efecto de bFGF en la modulación de contactos celulares y la expresión de e-cadherina en MCF-7. ....	34
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN Y SIGNIFICADO.....	56
REFERENCIAS.....	58





## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema de bi-cámaras.....	14
Figura 2. Esquema del procedimiento para determinación de células epiteliales (CK18 <sup>+</sup> ) en co-cultivo con MSC.....	16
Figura 3. Análisis por MET de MSC y de células MCF-7 en diferentes condiciones de cultivo.....	36
Figura 4. Efecto del co-cultivo con MSC sobre la proliferación de células MCF-7.....	37
Figura 5. Efecto en el tiempo del co-cultivo de células MCF-7 sobre una monocapa de MSC.....	38
Figura 6a. Efectos sobre la proliferación de MCF-7 de medios condicionados ("exógenos") por MSC.....	39
Figura 6b. Efecto de medios condicionados ("exógenos") por MSC sobre la proliferación de MCF-10.....	40
Figura 7. Efectos sobre la proliferación de MCF-7 y MCF-10 cultivadas en sistemas bicamerales en presencia de MSC.....	41
Figura 8. Observación por microscopia óptica de la modalidad de crecimiento de MCF-7 al ser cultivadas sobre una monocapa de MSC o plástico.....	42
Figura 9. Observación por epifluorescencia para CK18, de la modalidad de crecimiento de MCF-7 al ser cultivadas sobre una monocapa de MSC o plástico.....	43
Figura 10. Expresión de e-cadherina en células MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC....	44
Figura 11. Efecto de medio condicionado ("exógeno") por MSC sobre la expresión de e-cadherina en células MCF-7.....	45
Figura 12. Efecto del medio condicionado ("exógeno") por MSC sobre la expresión de e-cadherina en MCF-7. Análisis por western blot.....	46
Figura 13. Co-cultivo de MCF-7 con MSC en sistemas bicamerales: efecto en la expresión de e-cadherina.....	47

Figura 14. Inspección de contactos entre células MCF-7, co-cultivadas en sistemas bicamerales con MSC.....	48
Figura 15. Efecto de 20ng/ml bFGF en proliferación de MCF-7 cultivadas en concentraciones variables de suero fetal.....	49
Figura 16. Efecto de 10ng/ml VEGF con concentraciones variables de suero fetal en la proliferación de MCF-7.....	49
Figura 17. Expresión de e-cadherina en MCF-7, cultivadas en presencia de bFGF.....	50

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.....	11
Tabla 2. Efectos del co-cultivo o en sistemas bicamerales con MSC sobre el tamaño de las células MCF-7 y su núcleo.....	36
Tabla 3. Efectos del co-cultivo o en sistemas bicamerales con MSC sobre el número y estado metabólico de las mitocondrias de células MCF-7.....	36



## ABREVIATURAS

- $\alpha$ -MEM: medio mínimo esencial tipo  $\alpha$
- bFGF : Factor de crecimiento de fibroblastos básico
- BSA : Albúmina sérica de bovino
- CK : Citoqueratina
- CM : Células micrometastásicas
- D-MEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco
- EGF : Factor de crecimiento epidermal
- HS : Suero de caballo
- IB : Insulina de bovino
- MEM-E: Medio mínimo esencial tipo Eagle
- MET : Microscopía electrónica de transmisión
- MSC : Células troncales mesenquimáticas
- PBS : Tampón fosfato salino
- SF : Suero fetal bovino
- VEGF : Factor de crecimiento de endotelio vascular

## RESUMEN

En etapas aún tempranas de desarrollo de un cáncer de mama, ocurre frecuentemente la migración de células tumorales hacia la médula ósea, evento que se ha denominado micrometástasis. Estas células se alojan y persisten en el estroma de la médula ósea en un estado de dormancia (equilibrio entre proliferación y apoptosis) y no migratorio. Sin embargo, ocurren recaídas clínicas por proliferación y migración de estas células, lo que sugiere que la actividad biológica de las células micrometastásicas (CM) estaría controlada por el microambiente en el que se alojan. Un importante componente celular de este microambiente en la médula ósea es la célula troncal mesenquimática (MSC). En esta tesis se analizó usando modelos celulares y diferentes metodías, la interacción entre CM y MSC, en un intento por definir un cambio de la CM de una situación de dormancia a una de alta proliferación.

Los experimentos realizados en esta tesis señalan que las MSC generan cambios a nivel de la ultraestructura en las CM consistentes en un incremento del cociente de diámetros núcleo/célula, predominante eucromatina y más mitocondrias de matriz pálida. Estas observaciones han sido interpretadas como mayor actividad transcripcional y metabólica, lo que se confirmó por la mayor proliferación de las CM en presencia de MSC. A su vez, las MSC inducen cambios en la modalidad de crecimiento de las CM, desde un tipo de crecimiento en clusters a uno de células aisladas. Este cambio, que se asoció con una inhibición de la expresión de E-cadherina (Hombauer y Minguell 2000) ha sido atribuido a factores solubles producidos y liberados por MSC.

## ABSTRACT

During early stages of breast cancer development, some cancer cells may migrate into distal organs, like lungs and bone marrow (micrometastases). In the case of the bone marrow, these micrometastatic cells (MC) interact with cellular and extracellular matrix components (microenvironment) in the bone marrow stroma and attain a condition of dormancy (equilibrium between cell proliferation and apoptosis). Nevertheless, under circumstances not fully understood, MC may acquire a proliferative and migratory condition which results in tumour relapse. Data have suggest that the biological behavior of MC is under the control of components of the bone marrow microenvironment. Since an important cellular component of this microenvironment are mesenchymal stem cells (MSC), in this thesis we studied the interaction between MC and MSC in an attempt to elucidate changes in MC from a dormant into a fully proliferative status. The results of this work show that upon interaction between MC and MSC, several ultrastructural changes (chromatin and mitochondrion structure) occur in MC, which are suggestive of an increased transcriptional and metabolic activity. In addition, the interactions of MC either with MSC or with a MSC-conditioned medium result in enhancement of tumour cell proliferation and in a modification in their growth pattern (from cluster into single cell type). Thus, we assume that changes in MC are directed by soluble factors produced and released by MSC. These factors, which were not characterized in this work, may contribute to the transition of the tumoral micrometastatic cells from a dormant into a proliferative condition.

## INTRODUCCIÓN

Entre el 25 y 60 % de los pacientes con cáncer de mama que aún no ha desarrollado metástasis, presentan células tumorales individuales en la médula ósea y nodos linfáticos (Pantel y von Knebel 2000); a esta condición se le ha denominado micrometástasis. Las células micrometastásicas (CM) persisten tras tratamientos tradicionales contra el cáncer, como lo son la quimioterapia (Kasimir-Bauer y col. 2001), la cirugía y la radioterapia y constituyen en muchos casos un factor de mal pronóstico y recaída (Braun y col. 2000). La presencia de células micrometastásicas (CM) es habitualmente detectable por técnicas inmunocitoquímicas, que reconocen antígenos propios de células epiteliales como citoqueratinas (CK), el antígeno de membrana epitelial (EMA) y varias mucinas (Pantel y von Knebel 2000), (Braun y Harbeck 2001).

Se han encontrado CM en la médula ósea de pacientes con cáncer mamario, incluso habiendo sido tratados 15 años antes (Mansi y cols. 1999), lo cual indica una alta capacidad de estas células para persistir. Esto sugiere, que las CM pueden permanecer en un estado de equilibrio entre eventos de proliferación y de muerte celular ("dormancia"), generando un número estable de células. Sin embargo, en alrededor de un 25 % de los casos se ha detectado recaída por la proliferación, movilización y metástasis de estas células hacia nuevos tejidos (Braun y col. 2000). Este evento es especialmente común en pacientes con micrometástasis dentro de los primeros 5 años tras el desarrollo del tumor primario.

En la condición de dormancia (estado silente) es importante además que las CM no invadan otros tejidos. Esto se asocia con una capacidad de migrar de la célula cancerígena epitelial. La capacidad migratoria de la CM depende principalmente de cambios en la expresión y localización de e-cadherina (también llamada uvomorulina), como también de otras moléculas de adhesión célula-célula, usualmente concentradas en

los cinturones de adhesión homotípica de células epiteliales maduras. Un primer efecto de la inhibición de e-cadherina en líneas celulares usadas como modelo de células cancerígenas, es el predominante crecimiento aislado de estas células, que reemplaza la habitual formación de *clusters* o grupos conformados por células fuertemente adheridas entre sí (Ásgeirsson y cols 1998). Así, la pérdida de adhesión celular mediada por e-cadherina es una etapa limitante para la progresión de adenomas a carcinomas (Perl y cols 1998). El fenómeno de crecimiento en clusters vs. el crecimiento celular aislado, será denominado a lo largo de esta tesis como modalidad de crecimiento.

La capacidad de las CM de salir del descrito estado de dormancia para proliferar e invadir nuevos tejidos, hace suponer que se trata de un proceso determinado por el microambiente en que se alojan, el cual es el estroma de la médula ósea. Este está formado por varios tipos celulares y sus productos, entre otros, citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular.

Entre las células del estroma de la médula ósea, existe un subtipo de células no hematopoiéticas denominadas células troncales mesenquimáticas (MSC) o células progenitoras mesenquimáticas, las cuales son multipotentes y diferenciables tanto *in vivo* como *in vitro* a tipos celulares que formaran hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo, células del llamado estroma hematopoiético de la médula ósea y probablemente células neurales (Jiang y cols 2002).

Existen antecedentes que sugieren que las MSC, al interactuar con CM, regulan la proliferación y capacidad de migración de estas últimas. Entre los principales antecedentes están:

- Trabajos previos de este laboratorio han demostrado una inhibición de contactos homotípicos en células tumorales de la línea MCF-7 (como modelo de cáncer de mama) al ser co-cultivadas con MSC humanas; esta inhibición ha sido atribuida a la disminución

de la expresión de e-cadherina y del antígeno específico de superficie (ESA) (Hombauer y Minguell 2000).

- Se ha descrito que un gran número de citoquinas que causan diversos efectos sobre MCF-7. Por ejemplo, interleuquina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) inhibe la expresión del receptor de insulina en MCF-7 inhibiendo la proliferación de las células (Costantino y cols 1996). IL-6 inhibe la expresión de e-cadherina en MCF-7, induciendo el crecimiento aislado de las células (Ásgeirsson y cols. 1998). Las MSC humanas producen citoquinas (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 y SCF) (Prockop, 1997), (Pittenger y cols 1999) y otros factores como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, FGF-2) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Benavente y cols. 2003).

En consecuencia, el estudio de las interacciones entre células tumorales y una población de células progenitoras mesenquimáticas del estroma de la médula ósea, como lo son las MSC, constituye un tema central para lograr comprender el rol de algunos factores involucrados en la regulación de la micrometástasis en la médula ósea.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar cambios en la estructura, proliferación y modalidad de crecimiento (formación de clusters vs. crecimiento aislado de células), relacionándola con la expresión de e-cadherina en CM, que ocurren en contacto directo con MSC o con factores solubles producidos y liberados al medio por estas últimas. También fue parte de esta tesis evaluar el efecto de bFGF y VEGF en la proliferación y modalidad de crecimiento de las CM.

Empleando como modelo de CM la línea MCF-7, se co-cultivó estas células sobre monocapas de MSC. En estas condiciones, se evaluaron parámetros ultraestructurales de MCF-7 que dieran cuenta de cambios en su actividad celular. Estas alteraciones fueron relacionadas con los efectos medidos a nivel de proliferación y modalidad de crecimiento de MCF-7.

Para determinar si los efectos observados tanto a nivel de ultraestructura, como proliferación, modalidad de crecimiento y expresión de e-cadherina en MCF-7 co-cultivadas con MSC, se deben o no a factores solubles producidos por estas últimas, se siguieron dos aproximaciones:

- Usando medios condicionados por MSC (por previa incubación de MSC con el debido medio de cultivo).
- Usando sistemas bicamerales, los que permiten el permanente intercambio de factores entre las células, pero evitando el contacto directo entre ambos tipos celulares.

Como control no maligno de célula epitelial mamaria se utilizó la línea MCF-10.

## **HIPÓTESIS**

Las células troncales mesenquimáticas participan en el control de la actividad que adoptan células micrometastásicas en la médula ósea.

## **OBJETIVO CENTRAL**

Analizar cambios en la ultraestructura, proliferación, modalidad de crecimiento y moléculas de adhesión en células tumorales, que ocurren por su contacto directo y/o con factores producidos por MSC.

## **OBJETIVOS ADICIONALES**

Establecer un modelo celular que permita estudiar el efecto del conjunto de factores solubles producidos por las MSC, sobre la proliferación y sobre su modalidad de crecimiento de las células tumorales. En particular, estudiar el efecto de los factores bFGF y VEGF sobre la proliferación y modalidad de crecimiento de las células tumorales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Anticuerpos

- Anti-citokeratina 18 (CK-18), ratón IgG1, Santa Cruz Biotechnology, SC-6259
- Anti-e-cadherina, ratón IgG, Santa Cruz Biotechnology, SC-8426
- Anti-IgG de rata, molécula completa, conjugado a FITC, Sigma, F6258
- Anti-IgG de ratón, molécula completa, conjugado a FITC, Santa Cruz Biotechnology, SC-2010
- Anti-IgG de ratón, molécula completa, conjugado a FITC, Sigma, F-3008
- Anti-IgG de ratón, EM grade adsorbido a partículas de oro de 10nm, Aurion, 25148
- Anti-Uvomorulina (e-cadherina), rata IgG1, Sigma U-3254
- Anti-IgG ratón, molécula completa, conjugado a peroxidasa, Amersham Life Science NIF 825.

### 2. Factores y hormonas

- bFGF, recombinante humano, Sigma F-0291
- Factor de crecimiento epidermal (EGF), Sigma E-4127
- Hidrocortisona, Sigma H-0888
- Insulina de páncreas de bovino (IB), Sigma I-6634
- Toxina del cólera, Sigma C-9903
- VEGF, recombinante humano, Sigma V-7259

### 3. Reactivos para cultivo celular

- Albúmina sérica de bovino (BSA), fracción V, Sigma A-2153
- Estreptomicina, Laboratorio Bestpharma 20001105
- Penicilina G. Sódica, Laboratorio Chile 22866
- Suero de Caballo (HS), Gibco 288476
- Suero Fetal Bovino (SF), Gibco BRL 1600-044
- Suero Fetal Bovino (SF), Hyclone SH 30070-03

#### 4. Medios

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), Gibco BRL 12800-058
- F-12 Ham, Sigma N-6760
- Minimum Essential Medium Alpha ( $\alpha$ -MEM), Gibco BRL 12000-022
- Minimum Essential Medium Eagle (MEM-E), Sigma M-3024

#### 5. Enzimas

- Ribonucleasa A (EC 3.1.27.5), Sigma R-2153
- Tripsina de páncreas de bovino 1:250 (EC 3.4.21.4), Sigma T-0646

#### 6. Tampones biológicos

- PBS: 15mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 81mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,4M NaCl, 27mM KCl, pH 7,4.
- TBS: 0,14 M NaCl, 2,68mM KCl, 25mM Tris base, pH 8.

#### 7. Reactivos Químicos

- Acetato de Uranilo, p. a. Merck, 8473
- Acetona p. a., Merck, 100014
- Ácido clorhídrico fumante 37% p. a., Merck 113386

- Acrilamida, Sigma A-9099
- Azida de Sodio, Sigma S 8032
- Azul de bromofenol, USB, US12370
- Azul Tripán, tinción 0,4%, Sigma T-6154
- Bis-benzamida (Hoechst 33342) Trihydrochloride, Sigma B-2261
- Citrato de Plomo, Eastman 11534
- Cloruro de magnesio, Merck 5833
- Cloruro de sodio (NaCl), Merck 101540
- DTT, USBiological, Cat. D8070
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma D-5879
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Calbiochem, Cat. 428023
- Etanol absoluto, p. a. Merck 1.00983
- Etilendiamino tetraacético disódico dihidratado (EDTA), Sigma E-4884
- Formaldehído 37%, Merck 6404
- Glicina, Sigma G-7126
- Glutaraldehído, 25% Sigma G-5882
- Hidróxido de Potasio (KOH), Merck 105021
- Hidróxido de Sodio (NaOH), p. a., 106495
- Histopaque-1077, Sigma, 1077-1
- Ioduro de Propidio (PI), Sigma P-4170
- Leupeptina, USBiological, Cat. L2050
- L-glutamina, Sigma G-3126
- LR-Gold, London Resin Company Ltd 14371
- Marcadores de P. M. de proteínas preteñidos, Amersham RPN800
- Medio de Montaje, IMMCO Diagnostics, 2505
- 2-Mercaptoetanol, Merck 15433

- Metanol, TCL
- p-formaldehído, Merck 104005
- Pepstatina A, USBiological, Cat. P3280.
- Peróxido de benzoilo, Sigma B-5907
- Piruvato, sal de sodio, Sigma P-2256
- Spurr. Resina compuesta por:
  - 4-vinylcyclohexene dioxido (ERL 4206) 20g
  - resina epichlorohydrin-polyglycol epoxy (DER 736) 12g
  - anhídrido 2-nonen-1-yl-succínico (NSA) 52g
  - 2-dimetilaminoetanol (DMAE) 0,8g
- Tetróxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ ), Electron Microscopy Sciences, PA 19034
- Tris (Trizma), Sigma, T-1503
- Tween 20, Sigma P-8492
- Western Blot, kit de detección. Amersham RPN2109.

## 8. Otros:

- PDVF, membranas para immunoblot, BioRad, Cat. 162-0176
- Insertos bicamerales Transwell, Costar MC 3460.

## 1. Cultivos celulares

### 1.1 Los tipos celulares

Células troncales mesenquimáticas MSC.

Se obtienen a partir de remanentes de aspirados de médula ósea (donantes normales para trasplantes alogeneicos de médula ósea, Laboratorio de Criopreservación,

Clínica Las Condes). Las MSC se preparan según protocolo (Conget y Minguell 1999), que en términos generales contempla separar células mononucleadas, sembrarlas en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM con 20% suero fetal y cultivar hasta generación de una monocapa adherente. Después de 3–4 subcultivos, esta capa adherente queda formada por células homogéneas con características morfológicas, inmunofenotípicas y funcionales de células troncales mesenquimáticas (Minguell y cols 2001).

### **MCF-7**

Es una línea celular de cáncer de mama que mantiene las características del epitelio diferenciado original incluyendo su capacidad de unir estradiol a través de receptores intracelulares de estrógeno (Brooks y cols 1973) (Levenson y Jordan 1997). Reaccionan en inmunocitoquímica e inmunohistoquímica con anticuerpos de citoqueratina (CK) 17, 18 y 19, mucina y el antígeno específico de superficie (ESA). Fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC).

### **MCF-10A**

MCF-10 es una línea celular humana no cancerígena, obtenida del epitelio de mama contenido en muestras de una mastectomía efectuada por enfermedad fibrocística de un paciente. En inmunocitoquímica se ha demostrado que estas células reaccionan con anticuerpos de sialomucinas epiteliales (MC-5 y EMA), de queratinas (KA-4, AE1/AE3) y citoqueratinas (17, 18 y 19), (Tait y cols 1990). También fue adquirida de ATCC.

## 1.2. Condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado para cada tipo celular se indica en la Tabla 1. Las células son sembradas a densidades variables (entre 5.000 y 30.000 células/cm<sup>2</sup>), como se indica en cada caso y según el experimento realizado.

El medio de cultivo se cambia cada 3 días, previo 2 lavados con PBS. Las células son cultivadas en incubador a 37°C, con atmósfera controlada conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.

Tipo celular	Medio base	% y origen de Suero	Otros suplementos*	Características generales de las células
MCF-7	MEM-E	10 % suero fetal bovino (SF) Gybco	Insulina de bovino (IB) 10µg/ml, piruvato 1mM, glutamina 2mM.	Forma redonda, crecimiento en clusters. ~40 µm de diámetro.
MCF-10	D-MEM + HAM	5% suero de caballo (HS)	IB 10µg/ml, hidrocortizona 0,5 µg/ml, toxina del cólera 100ng/ml, factor de crecimiento epidermal (EGF) 20ng/ml.	Forma fibroblastoide Crecimiento aislado ~20 µm de diámetro.
MSC	α-MEM	10% SF Hyclone		Forma alargada o triangular, crecimiento aislado ~100 µm de diámetro.

\* Todos los medios son suplementados con penicilina y estreptomina 0,1% v/v

## 1.3. Subcultivo de células

Para subcultivar células que han alcanzado niveles cercano a confluencia, las células se liberan de la placa mediante un tratamiento suave (por 7 a 10 minutos a 37° C) con una solución de tripsina-EDTA en PBS (0.25% tripsina, 70mM EDTA). El efecto de tripsina-EDTA se bloquea por adición de dos volúmenes de medio de cultivo completo. Tras centrifugar a 500x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el pellet se

resuspende en el medio correspondiente y las células se siembran a las densidades indicadas en cada caso.

#### **1.4. Criopreservación**

La suspensión de células se centrifuga a 500x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el pellet se resuspende en una solución de criopreservación fría, a una densidad de  $10^6$  células/ml. En cada criotubo se distribuye 1 ml de la suspensión celular y se la congela mediante un descenso gradual de temperatura desde temperatura ambiente hasta  $-196^{\circ}\text{C}$ , utilizando un ascensor (Taylor-Wharton); finalmente las células se almacenan en  $\text{N}_2$  líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Las soluciones de criopreservación para las MCF-7 y MCF-10 están constituidas por 85% medio base, 10% SF y 5% DMSO. Para MSC se usa 80% medio base, 10% SF, 10% DMSO.

#### **1.5. Recuento y viabilidad celular**

El número de células se determina mediante recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer). Las células son teñidas con azul tripán, lo que permite reconocer células vivas (refringentes) de células muertas (teñidas de azul).

### **2. Co-cultivos celulares**

Células MSC suspendidas en su medio de cultivo habitual ( $\alpha$ -MEM con 10% SF), son sembradas en pozos de 2,0, 3,8 ó 9,6  $\text{cm}^2$  en densidades que van de 15.000 a 20.000 células/ $\text{cm}^2$ , según el experimento y se incuban por 24 horas con el fin de generar una

monocapa confluyente de células. Luego de lavar dos veces con PBS, se siembran sobre ellas células MCF-7 ó MCF-10 suspendidas en medio  $\alpha$ -MEM con 10% SF. Cada co-cultivo se realiza por el período de tiempo señalado en la leyenda de las figuras respectivas. En experimentos de co-cultivos menores a 4 días de duración, sólo se cambió el medio 24 horas después de sembradas las células; en estudios de más de 4 días, los cambios de medio se efectuaron cada 2 días.

### **3. Generación de medios condicionados por MSC**

La obtención de medio condicionado "exógeno" se realiza, cultivando células MSC en alta densidad (aprox. 20.000 MSC/cm<sup>2</sup>) por 24 horas en  $\alpha$ -MEM con 1% SF. El medio de incubación (medio condicionado "exógeno") se retira, se filtra y se preserva por un máximo de 6 días a -80 °C.

### **4. Cultivos de células MCF-7 ó MCF-10 en presencia de medios condicionados por MSC**

Las células MCF-7 ó MCF-10 son sembradas en baja densidad (aprox. 7000 células/cm<sup>2</sup>) usando su medio de cultivo habitual. Tras 24 horas, se determina el porcentaje de células adheridas, a través del conteo de células de pozos (tiempo 0) y comparándose con el número inicial de células sembrado. Los cultivos se lavan con PBS y se agrega una solución de medio condicionado por MSC con  $\alpha$ -MEM 1% SF fresco en diferentes diluciones. De no indicarse otra cosa, el medio condicionado por MSC administrado es 50%  $\alpha$ -MEM 1% SF y 50% medio condicionado por MSC.

## 5. Cultivos mixtos en sistemas bicamerales

Este sistema se compone básicamente de un pozo inferior de poliestireno y un pozo interior o inserto, cuyo fondo es una membrana porosa de policarbonato (poros de diámetro de entre 0,4 y 12 $\mu$ m), los cuales permiten el libre movimiento de partículas tanto desde el inserto hacia el pozo inferior, como viceversa. Las células MSC son sembradas en el pozo inferior a una alta concentración (sobre 16.500 células/cm<sup>2</sup>). De manera paralela, se siembran en el inserto las células MCF-7 o MCF-10, a una concentración de 5.000 a 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Al cabo de 24 horas tras sembrado, se colocan el inserto sobre su pozo inferior respectivo. El medio de cultivo común para ambos pozos es  $\alpha$ -MEM 5% SF. Se cultiva por tiempos variables (se indica en la leyenda de cada figura), realizando cambios de medio cada 2 días.

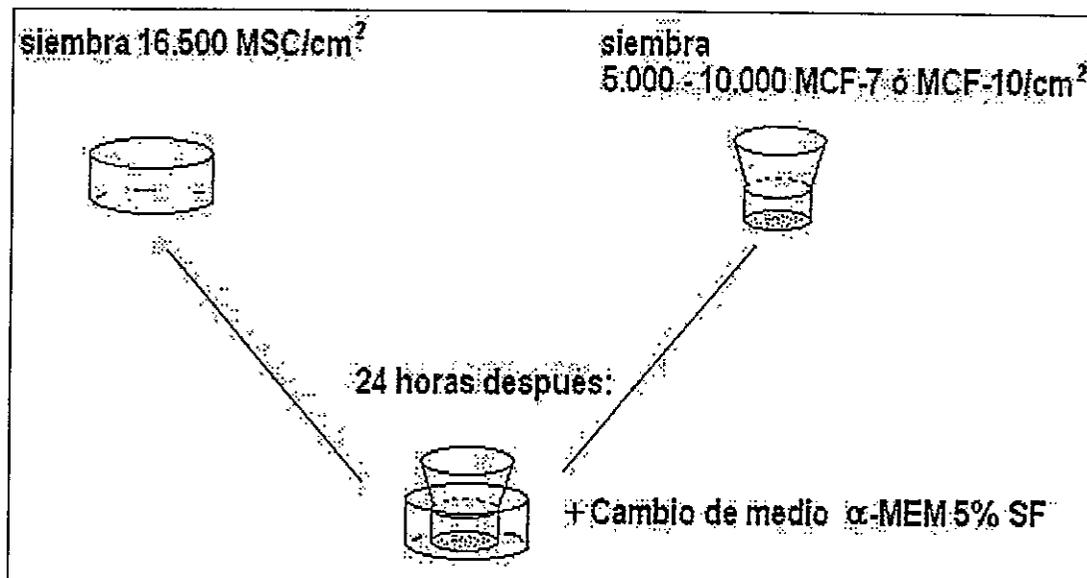


Figura 1. Esquema del sistema de bi-cámaras.

## 6. Inmunocitoquímica

### 6.1. Estudios de inmunocitoquímica mediante microscopía de epifluorescencia

Las células que han sido cultivadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 2 cm<sup>2</sup>, se lavan dos veces con PBS y se fijan con formaldehído al 0,5% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de dos lavados de 5 minutos con PBS, las células se permeabilizan con etanol 70% frío durante 10 minutos a 0-4°C. Luego de bloquear, lavando dos veces por 10 minutos con PBS 2% SF, se incuba con el primer anticuerpo (anti-citokeratina 18 diluida 1:100 por 1 hora a temperatura ambiente; anti-e-cadherina, diluida 1:100 por toda la noche a 4°C). Tras 2 lavados de 10 minutos con PBS 2% SF, se incuba con el segundo anticuerpo (anti IgG de ratón conjugado a FITC 1:100) por 1 hora a 4°C. A continuación se lava una vez con PBS 2% SF. De modo optativo, se pueden teñir los núcleos con bis-benzamida 1µg/ml por 3 minutos a temperatura ambiente, seguido por lavados con PBS 2% SF, PBS y agua destilada. Finalmente, los cubreobjetos con las células inmunomarcadas se depositan sobre portaobjetos usando medio de montaje con retardador de desvanecimiento de la fluorescencia y se analizan en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop.

La intensidad de fluorescencia fue semi-cuantificada usando el programa Adobe Photoshop versión 6.0. Se evaluó en fotografías digitales de epifluorescencia la intensidad de color verde de al menos 20 píxeles diferentes, calculándose luego un promedio de ellos. Este valor fue comparado entre las diferentes condiciones, siempre y cuando el valor de intensidad de fluorescencia del fondo (regiones sin células) fuese igual entre las fotografías a comparar.

## 6.2. Estudios de inmunofluorescencia mediante citometría de flujo

Esta técnica fue empleada para reconocer células CK18<sup>+</sup> (MCF-7 o MCF-10) en co-cultivos con MSC. Para ello, las células del co-cultivo en suspensión son contadas en hemocitómetro, determinando el porcentaje de células vivas totales. Luego de dos lavados con PBS y centrifugación (5 min. a 600 g), las células se fijan y permeabilizan con 70% etanol a 0-4°C por 10 min, seguido de lavados con PBS 2% SF. Las células se incuban por una hora con el anticuerpo primario (anti CK-18) a temperatura ambiente. Luego de lavar dos veces con PBS 2% SF, se incuban por 1 hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (anti IgG de ratón, conjugado a FITC). Por último se lava una vez con PBS 2% SF. Se analiza por citometría de flujo, usando el programa Facscalibur.

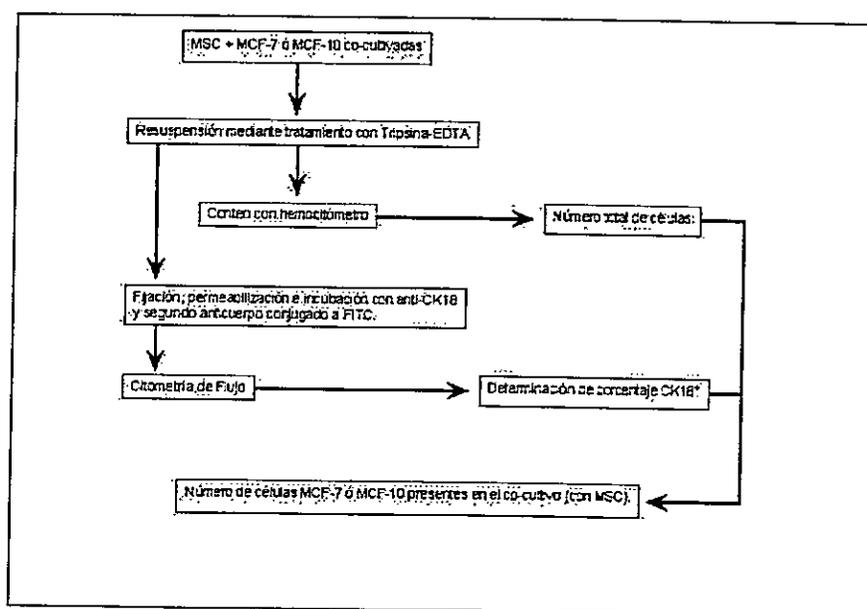


Figura 2. Esquema del procedimiento para determinación de células epiteliales (CK18<sup>+</sup>) en cocultivo con MSC.

## 7. Expresión de e-cadherina por Western Blot

La extracción de proteínas se realizó lavando las células con PBS y agregando buffer de lisis (50mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glicerol, 1% Tritón X-100, 2mM PMSF, 1µg/ml peptidasa, 1µg/ml leupeptina y 1µg/ml aprotinina, pH 7,9) e incubando por 20 min. a 0-4°C. El sobrenadante es centrifugado a 12.000 x g por 30 min. a 4°C. La concentración de proteínas se determinó en alícuotas del extracto, usando el método de Lowry.

Los extractos proteicos fueron tratados bajo condiciones reductoras. Para esto, se calentaron las muestras por 5 min. a 100°C en tampón simple (240mM tris-HCl, 8% SDS, 40% Glicerol, 0,001 % indicador azul de bromofenol, 5% v/v β-mercaptoetanol). Se cargaron 30 µg de proteínas por carril en geles de acrilamida al 8%.

La transferencia electroforética a una membrana de PDVF se realizó a 50mA por toda la noche a 4°C en tampón 50mM Tris, 190mM glicina, 20% metanol, 0,1% SDS.

Luego de bloquear con una solución 3% BSA, 0,5% Tween 20 en TBS por una hora a temperatura ambiente, se lava 3 veces con TBS-Tween (5 min. cada vez) y se incuba con el primer anticuerpo (anti-e-cadherina) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se vuelve a lavar con TBS-Tween (10 min. cada vez), se incuba con el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón, conjugado a peroxidasa) y se lava 3 veces con TBS-Tween (5 min. cada vez). La membrana fue revelada usando un kit de quimioluminiscencia ECL, exponiendo a un film fotográfico por 1 a 5 min.

## 8. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para la obtención de material observable en microscopio electrónico de transmisión (MET), es necesario el desarrollo de las siguientes etapas: Fijación e inclusión

del material en resina lo que permitirá obtener y teñir cortes ultradelgados, los que son inspeccionados y fotografiados en el MET.

a. Fijación e inclusión de muestras biológicas.

Esta etapa se desarrolló según dos protocolos diferentes, dependiendo del origen de la muestra biológica a estudiar:

- Procesamiento de células crecidas sobre termanox

En caso de cultivos simples y co-cultivos (MCF-7 con MSC), estos pueden realizarse creciendo las células sobre discos Termanox. Luego de fijar por 30 min. con glutaraldehído al 2,5% en buffer 0,1M fosfato, pH 7,4, se lava tres veces por 2 min. cada una con PBS. Se post-fijan con  $\text{OsO}_4$  al 1% en PBS, para luego lavar tres veces con PBS. A continuación se deshidrata el material por pasajes, de 20 min. cada uno, por soluciones al 10, 30, 50 y 70% de acetona en 0,14M NaCl. Luego se pasa a 80 y 90% acetona/agua destilada. Finalmente se hacen dos tratamientos con acetona libre de agua de 20 min. cada uno. La inclusión se realiza pasando de una mezcla Spurr/acetona 1:2 (20 min.) a una mezcla Spurr/acetona 1:1 (20 min.) y finalmente a una mezcla Spurr/acetona 2:1 (20 min.). A continuación se pasa a Spurr puro (tres veces; 30, 20 y 20 min. respectivamente). Se deja polimerizando en moldes adecuados en una estufa a 65°C durante 14hs.

- Procedimiento para células cultivadas en sistemas bicamarales.

El procedimiento de fijar y post-fijar es idéntico al usado en células crecidas en discos termanox. Sin embargo la deshidratación de la muestra se realiza por pasajes (10 min. cada vez) en etanol 35, 50, 70, 95 y dos veces 100%. Luego de cortar el fondo del pozo interno (membrana de policarbonato), se incluye pasando por mezclas de Etanol/LR Gold 2:1 (15 min.), Etanol/LR Gold 1:1 (15 min.), y Etanol/LR Gold 1:2 (15 min.). Se pasa a LR Gold puro (dos veces, 15 min. cada uno) y por último, se incluye en cápsulas de

gelatina conteniendo LR Gold con peróxido de benzoilo (0,8%) y se deja polimerizar a temperatura ambiente durante la noche.

b. Obtención y tinción de cortes ultradelgados

Una vez terminada la inclusión en Spurr o LR Gold, se remueve el exceso de plástico con una hoja de afeitar o un dispositivo para devastar (como el trimmer Reichert TM60). El propósito de esta operación es obtener una pirámide con bordes paralelos, procurando dejar la muestra en el centro. Una mayor precisión se obtiene emparejando con un cuchillo de vidrio en el ultramicrotomo Reichert Jung Ultracut. A continuación se procede a obtener cortes semidelgados de 500nm y ultradelgados de 70 a 80 nm, respectivamente) usando una cuchilla de diamante. En los cortes semidelgados es reconocible la presencia de material biológico a través de la tinción con 1% azul de toluidina o azul de metileno en buffer borato. Los cortes ultradelgados se colocan sobre grillas de oro o cobre que pueden estar recubiertas de pioloformo y que poseen mesh definidos (100, 200 ó 300).

Las células en el corte ya contendrán una leve tinción inicial si fueron postfijadas con  $\text{OsO}_4$ . El proceso de post-tinción consiste esencialmente en el tratamiento secuencial con sales de metales pesados como los son el acetato de uranilo y el citrato de plomo. Si bien esta tinción es inespecífica ya que se debe a reacciones tanto con ácidos nucleicos como con lípidos y proteínas, favorece enormemente el contraste final en el MET. Para la tinción con acetato de uranilo, se deben depositar gotas de este sobre un trozo de parafilm limpio. Sobre las gotas se flotan las grillas, dejándose las en la oscuridad por 30 min. a temperatura ambiente. Luego los especímenes se lavan por inmersión en abundante agua destilada y se los deja secando. A continuación se procede a la tinción con plomo, la cual utiliza una solución citrato de plomo 2M en KOH 1M. Previo a su uso, la solución se centrifuga por 5 min. a 1800x g. Del sobrenadante resultante, se depositan

gotas sobre una superficie limpia y luego se flotan sobre ellas las grillas. La incubación se realiza a temperatura ambiente durante 4 min, manteniendo una atmósfera libre de  $\text{CO}_2$ . Luego se lava abundantemente con KOH 50mM y agua destilada. Se deja secando las grillas por al menos una hora antes de inspeccionarlas bajo el MET.

#### c. Observación y Fotografiado en TEM

Las muestras fueron inspeccionadas en un Microscopio electrónico de transmisión Phillips CEM 100 trabajando a 60 u 80 kV de aceleración.

Las fotografías se obtuvieron a partir de negativos Kodak 4489 expuestos en forma automática en el microscopio, los negativos son revelados y copiados siguiendo procedimientos habituales para fotografía en blanco y negro.

## RESULTADOS

### 1. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) de cambios ultraestructurales en células tumorales MCF-7 al co-cultivarlas con células troncales mesenquimáticas (MSC) o al incubarlas con medios condicionados por MSC.

El objetivo central de esta serie de experimentos, fue evaluar cambios de ultraestructura que puedan sugerir alteraciones en la actividad de células MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC (cultivo directo célula-célula) o al cultivarlas con células MSC en sistemas bicamerales, en los cuales factores solubles producidos y liberados por MSC condicionan el medio de las células MCF-7 (cultivo indirecto célula-célula).

#### 1.1. Alteraciones en la ultraestructura de MCF-7 inducidas al co-cultivarse con MSC.

Al examinar por MET células MCF-7 o MSC en sus respectivas condiciones de cultivo (Figura 3), se observan las siguientes características:

- Las células MSC (Figura 3a) poseen forma alargada, similar a la fibroblastos, con prolongaciones. El núcleo celular contiene de 2 a 3 nucleolos. El citoplasma contiene numerosos organelos. Los contornos son muy regulares y lisos.
- Las células MCF-7 (Figura 3b) presentan contornos predominantemente redondeados, prácticamente no poseen prolongaciones, pero los bordes son bastante irregulares. El núcleo es grande y contiene varios nucléolos (de 4 a 5). El citoplasma también contiene numerosos organelos.

Al evaluar por MET secciones correspondientes a cerca de 20 diferentes células MCF-7 co-cultivadas con MSC, se observó que entre las células MCF-7 controles (cultivadas sin MSC) (Figura 3b) y MCF-7 co-cultivadas con MSC (Figura 3c) aparentemente hay una serie de diferencias. Las más relevantes son:

- La razón de diámetros de núcleo/célula para las MCF-7 co-cultivadas con MSC es mayor (aprox. un 50%) que en las MCF-7 cultivadas sin MSC. Además se observó una predominante cromatina decondensada (eucromatina) en MCF-7 en co-cultivo con MSC, en tanto que en MCF-7 cultivadas sin MSC, predomina cromatina condensada.
- Las mitocondrias de MCF-7 co-cultivadas con MSC, están en mayor proporción con una matriz pálida. Es decir, están más dilatadas y se pueden distinguir las crestas mitocondriales fácilmente a aumentos bajos. En cambio, MCF-7 controles (sin MSC) poseen mitocondrias en un estado de matriz más densa (oscura) y sus crestas son mucho menos distinguibles.

Mitocondrias de morfología relajada sugieren un mayor stress oxidativo (Dvorakova y cols 2001). O sea, probablemente hay una mayor actividad metabólica en células MCF-7 co-cultivadas con MSC que en las MCF-7 controles. Las diferencias entre MCF-7 co-cultivadas con MSC o controles, se han resumido en la **tabla 2 y 3**.

Las características a nivel de ultraestructura de células MSC cultivadas solas o con MCF-7, son similares (datos no mostrados). Es probable que en estas condiciones experimentales no se observen diferencias debido a que en el modelo de co-cultivo, el número de células MCF-7 es sólo un 10% de las células MSC.

## 1.2. Alteraciones en la ultraestructura de MCF-7 al cultivarlas con MSC en sistemas bicamerales.

Factores producidos y liberados al medio condicionado por MSC y su efecto sobre la ultraestructura de MCF-7, fue estudiado usando sistemas bicamerales, como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 3 se presentan microfotografías representativas tras 4 días de cultivo de células MCF-7 en sistemas bicamerales en ausencia (controles) (Figura 3b) o en presencia de MSC (Figura 3d). Las diferencias observadas más importantes fueron las siguientes:

- MCF-7 cultivadas en insertos con MSC, presentan una razón de diámetro núcleo/célula mayor (aprox. un 35%) que las células controles (sin MSC).
- De manera similar al caso de los co-cultivos, las células MCF-7 cultivadas en sistemas bicamerales en presencia de MSC, presentan predominantemente núcleos con eucromatina.
- Al contar el número de mitocondrias en secciones correspondientes a unas 15 células MCF-7 diferentes, llamó la atención el mayor número de mitocondrias en MCF-7 cultivadas en sistemas bicamerales en presencia de MSC. Este aumento fue muy interesante en cuanto a mitocondrias de matriz pálida, consecuente con las observaciones realizadas en MCF-7 en co-cultivo con MSC.
- En muchas células MCF-7, no se lograron visualizar fibras de stress (haces de microfilamentos, fibras de actina). Sin embargo, en los casos en que se visualiza este tipo de formación, se observó un mayor número de fibras en MCF-7 cultivadas en presencia de MSC.

Estos resultados sugieren que las células MCF-7 en sistemas bicamerales en presencia de MSC (y por lo tanto en contacto con factores solubles producidos por estas)

presentan una mayor actividad metabólica, sugerida por una predominancia de cromatina descondensada y un mayor número de mitocondrias (en particular, mitocondrias de matriz pálida). El mayor número de fibras de actina, sugiere que las células MCF-7 en presencia de MSC están expuestas a alguna condición de stress.

Las principales características de MCF-7 tanto en co-cultivo como en sistemas bicamerales con MSC son presentadas en las Tablas 2 y 3.

## **2. Proliferación de células epiteliales (MCF-7 y MCF-10): efecto de contactos con MSC o de cultivos con medios condicionados por MSC.**

En los resultados anteriores (1.1 y 1.2) se describió como células MCF-7 en co-cultivo con MSC o en cultivo con medio condicionado por MSC, comparadas con MCF-7 controles, presentan cambios en la ultraestructura que sugieren mayor actividad transcripcional (al predominar eucromatina) y mayor respiración celular (dado por un incremento del número relativo de mitocondrias relajadas). Estas observaciones sugieren una mayor proliferación de células MCF-7. Por consiguiente, el siguiente objetivo fue estudiar si habían cambios en la proliferación de células MCF-7 al co-cultivarlas con MSC o al cultivarlas con medio condicionado por MSC.

En un intento por definir la especificidad de los efectos de MSC sobre células tumorales (MCF-7), se realizaron estudios similares utilizando la línea celular epitelial no tumoral MCF-10.

### **2.1. Proliferación de células MCF-7 y MCF-10 en co-cultivos con MSC.**

Para evaluar como contactos directos entre células MCF-7 y MSC afectan la proliferación de MCF-7, se sembró un número fijo de MCF-7 sobre concentraciones

variables de MSC. Los co-cultivos se incubaron por 3 días. Como se observa en la Figura 4, el número de MCF-7 en todas las condiciones de co-cultivo, aumentó con respecto a la condición control (MCF-7/MS = 1/0). Sin embargo, la magnitud del efecto proliferativo fue mayor en aquellos casos en que las MCF-7 fueron sembradas sobre monocapas no confluentes de MSC (Figura 4, barras con rayas vs. barras con puntos). Además estos resultados sugieren que el número de subcultivos de MSC (como referente de la edad de las células) también afecta la magnitud del efecto proliferativo sobre MCF-7. Así, MSC de pocos pasajes (SC nº 6 (Figura 4, barra 1/4) ejercen un mayor efecto proliferativo en MCF-7 que subcultivos mayores (SC nº 12 (Figura 4, barra 1/3). En la condición de MSC confluentes, ni la relación MCF-7/MS (Figura 4, barras con puntos) ni el número de subcultivos de las MSC (no mostrado) afectan la magnitud del efecto proliferativo, que sin embargo es significativamente mayor ( $P = 0,049$  en test de U-Mann Whitney) que MCF-7 controles.

En experimentos similares, pero usando cultivos de MCF-10 sobre una monocapa de MSC, se observó que MCF-10 en co-cultivo con MSC (en relación 1/10), proliferaron  $1,5 \pm 0,3$  veces más, tras 6 días de cultivo.

Cuando se estudió la capacidad en el tiempo de monocapas confluentes de MSC de estimular la proliferación de MCF-7, se observó que tanto a 2, 4 y 6 días de co-cultivo, las MCF-7 se mantienen viables y proliferativas, al igual que cuando son crecidas sobre plástico. Sin embargo, la magnitud de la proliferación de MCF-7 co-cultivadas con MSC, desde el día 4 es mayor que cuando son cultivadas por el mismo tiempo, pero en ausencia de MSC (Figura 5).

De este modo, los resultados de esta sección, sobre efecto de MSC sobre la proliferación de MCF-7 y MCF-10, demuestran que:

- Las células epiteliales MCF-7 y MCF-10 proliferan más al crecer sobre monocapas de MSC, que al crecer sobre plástico.

- Pareciera que el efecto proliferativo de las MSC es mayor en MCF-7 que en MCF-10, pues en tan sólo 3 días de co-cultivo, el incremento en MCF-7 es de un 40% mayor con respecto a MCF-7 crecidas sobre plástico. Esto representa un aumento en el tiempo de duplicación de 1,5 veces. En cambio, en MCF-10 se alcanza un incremento similar sólo al cabo de 6 días de cultivo, lo que equivale a 6 veces el tiempo de duplicación para esta línea.
- Monocapas semi-confluentes de MSC inducen una mayor proliferación de MCF-7 que monocapas confluentes de MSC.
- El efecto proliferativo de MSC sobre MCF-7 depende del tiempo de co-cultivo. Tiempos de co-cultivo mayores a 6 días no se estudiaron pues la monocapa de MSC, empieza a retraerse y soltarse.

## **2.2. Efecto de medios condicionados por MSC en la proliferación de células MCF-7 y MCF-10.**

Los resultados anteriores no dejan en claro si el efecto de MSC sobre cambios en la proliferación de MCF-7 y/o MCF-10 se deben a contactos celulares directos y/o a factores solubles producidos y liberados por las células MSC. Para dilucidar lo anterior, se hicieron experimentos donde se establecieron dos tipos de estudios: en el primer estudio se midió el efecto de medio condicionado por MSC ("exógeno") en la proliferación de MCF-7. En el segundo, se usaron sistemas bicamerales de MCF-7 ó MCF-10 con MSC (medio condicionado por MSC "endógeno").

El medio condicionado "exógeno" fue obtenido por el cultivo de células MSC por 24 horas en  $\alpha$ -MEM 1% SF. Para estudiar el efecto de este medio condicionado en la proliferación de MCF-7, diferentes volúmenes de este medio condicionado fueron mezclados con  $\alpha$ -MEM 1% SF fresco. En la Figuras 6a, se observa que el medio

condicionado por MSC estimula la proliferación de células MCF-7, de una manera que es proporcional a la concentración de medio condicionado. El uso de medio condicionado sin diluir (100%) también favorece el crecimiento de MCF-7 (no mostrado), pero este efecto es más modesto, probablemente debido al agotamiento de algunos nutrientes durante el proceso de preincubación de células MSC, para la preparación del medio condicionado "exógeno".

Similares experimentos demuestran que medio condicionado por MSC no estimula la proliferación de MCF-10 (Figura 6b).

El segundo estudio para determinar el efecto de factores solubles producidos por MSC en la proliferación de MCF-7, se usó el sistema de cultivo en bicámaras. Este permite liberación de factores producidos por un tipo celular (MSC) y la constante exposición a ellos de un segundo tipo celular (MCF-7). Con este sistema se evitan los efectos negativos sobre la proliferación por agotamiento de nutrientes, como fue observado al usar 100% medio condicionado "exógeno". Como se aprecia en la Figura 7, las MCF-7 cultivadas en el sistema bicameral proliferan cerca de un 50% más cuando en el otro compartimiento hay MSC.

A su vez, cuando se realizaron estudios similares con células MCF-10, se observó que estas proliferan un 40% menos en presencia de MSC, que en ausencia de ellas (control) (Figura 7).

Los resultados de esta serie de experimentos, sugieren que:

- Las células MSC producen y exportan factores solubles, los cuales estimulan la proliferación de las células epiteliales MCF-7.
- Estos factores tienen un efecto diferente según sea el tipo de las células expuestas, puesto que en MCF-7 se observa un incremento en la proliferación, mientras que en MCF-10 se produce una inhibición de la proliferación.

- Los factores producidos por las MSC no son tóxicos o dañinos para las células MCF-7 y MCF-10, ya que la viabilidad de estas, no se vio afectada durante los 3 días de estudio.

**3. Modulación de contactos celulares entre células MCF-7, al ser co-cultivadas con células MSC o al cultivarlas en presencia de medios condicionados por MSC.**

Como se ha demostrado anteriormente, al co-cultivar células MCF-7 con MSC se observan diferencias a nivel de ultraestructura y en proliferación de células MCF-7, con respecto al cultivo de MCF-7 en ausencia de MSC. Estos efectos han sido atribuidos a factores solubles producidos y liberados por MSC. Existe además, un tercer aspecto en el que las células MCF-7 alteran su patrón morfogénico por efecto de MSC y este es el contacto de las células MCF-7 entre sí. Datos anteriores de este laboratorio han mostrado que disminuye cuando las MCF-7 cultivadas sobre una monocapa confluyente de MSC, mientras que en MCF-7 cultivadas sobre plástico o sobre una monocapa de fibroblastos 3T3 predomina el crecimiento en grupos o clusters celulares (Hombauer y Minguell 2000). Esta observación se relaciona con una disminución en la expresión de e-cadherina, que es la principal proteína involucrada en el proceso de adhesión entre células epiteliales.

Con los siguientes experimentos se caracterizó la naturaleza de los contactos entre células MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC y/o al cultivarlas en presencia de medios condicionados por MSC. Este análisis se realizó a nivel celular y subcelular (por MET) y se usó microscopía óptica para cuantificar la relación entre células aisladas vs. formación de clusters. Además, se estudió la expresión de e-cadherina en MCF-7, por ensayos de inmunofluorescencia y western blot.

### **3.1. Modalidad de crecimiento (formación de clusters vs. crecimiento aislado) de MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC.**

En la Figura 8, se observan fotografías de células MCF-7 que fueron sembradas sobre plástico o sobre una monocapa confluyente de MSC. En co-cultivo, las MCF-7 se distinguen con bastante claridad de las MSC por diferencias morfológicas previamente mencionadas (ver 1.1). En la Figura 8 se observa que, MCF-7 cultivadas sobre una monocapa de MSC crecen de manera predominantemente aislada y no en grupos o "clusters", como es el caso de los respectivos controles. Este cambio en la modalidad de crecimiento empieza a notarse al cabo de 3 días de cultivo, alcanzando un máximo al cabo de 6 días.

Es más exacto el reconocimiento de MCF-7 en co-cultivo, a través del marcaje de citoqueratina 18 (CK18), la cual es una proteína específica para tipos celulares epiteliales y no se expresa en células MSC. En la Figura 9, se ve como ha cambiado la modalidad de crecimiento: MCF-7 co-cultivadas con MSC crecen en un 80% aisladas entre si. Los clusters (20% restante) se componen por 6 a 12 células. En cambio, MCF-7 cultivadas sin MSC (control) crecen en un 90% con fuertes adhesiones entre si, formando clusters que se componen de 8 a 24 células.

### **3.2. Expresión de e-cadherina en MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC.**

Al realizar experimentos similares de MCF-7 cultivadas en ausencia o presencia de MSC, pero analizando la expresión de e-cadherina por inmunofluorescencia se observa una importante disminución en la expresión de e-cadherina en células MCF-7 cultivadas sobre una monocapa de MSC (Figura 10). Al cuantificar la intensidad de la fluorescencia

(ver Materiales y Métodos), se observa una disminución en la expresión de e-cadherina de aprox. un 50% en MCF-7 cultivadas sobre una monocapa de MSC en comparación a MCF-7 controles (sin MSC). Además se marcaron los núcleos con bis-benzamida, lo que permite reconocer el total de células y por lo tanto evaluar si la expresión de e-cadherina es variable entre ellas. Además, la marcación nuclear permite determinar mejor la distribución de e-cadherina en la célula, evaluando si está presente en la superficie de la célula (sólo el borde externo) o el citoplasma.

### **3.3. Efecto de medios condicionados por MSC en la expresión de e-cadherina en MCF-7.**

Para determinar si la disminución de la expresión de e-cadherina en MCF-7 observada en co-cultivos de MCF-7 con MSC, es modulada por factores solubles producidos por MSC, se realizaron cultivos de MCF-7 con medios condicionados ("exógenos") producidos por MSC. Además, se evaluó el efecto de medio condicionado "endógeno" a través del sistema de co-cultivos de MCF-7 con MSC en sistemas bicamerales (previamente descrito).

En las Figuras 11 y 13 se observa una disminución en la formación de clusters celulares cuando MCF-7 son cultivadas en presencia de medio condicionado por MSC "exógeno" y "endógeno" respectivamente. Además, se observa una disminución en la expresión de e-cadherina (aprox. un 70%) en MCF-7 cultivadas con medio condicionado por MSC "exógeno" (Figura 11). Cuando MCF-7 fueron co-cultivadas en sistemas bicamerales con MSC (medio condicionado "endógeno") la disminución en la expresión de e-cadherina fue de aprox. un 40% (Figura 13).

### **3.4. Análisis por western blot, de la expresión de e-cadherina en MCF-7 cultivadas con medio condicionado por MSC.**

La menor expresión de e-cadherina en MCF-7 cultivadas con medio condicionado por MSC con respecto a MCF-7 cultivadas en ausencia de medio condicionado, fue confirmada por ensayos de western blot (Figura 12) en los cuales sólo se ve la debida banda inmunomarcada en extractos proteicos de MCF-7 cultivadas en ausencia de medio condicionado por MSC (controles).

### **3.5. Estudio por microscopía electrónica de transmisión de contactos entre MCF-7 co-cultivadas con MSC en sistemas bicamerales.**

Al utilizar el sistema de cultivo en bicámaras, se observó con MET que células MCF-7 en presencia de MSC crecen generalmente aisladas entre sí. Al comparar algunos de aquellos eventos poco comunes en que células MCF-7 permanecen muy próximas entre sí, con MCF-7 controles (cultivadas en ausencia de MSC) (Figura 14), no se observaron mayores diferencias. En ambas condiciones las uniones estrechas entre las células representan una estructura poco frecuente. No se observaron interdigitaciones, ni formación de desmosomas. El intercambio de moléculas, podría ser mediante caveolas, debido a que se observó la formación de vesículas con la forma típica de aquellas formadas por caveolinas. En la Figura 17, flechas indican este tipo de vesículas (Figura 17 a y b) y la apariencia de una unión estrecha (Figura 17b).

De los experimentos relacionados a la expresión de e-cadherina en MCF-7 y de la modalidad de crecimiento de células aisladas vs. formación de clusters, se concluye lo siguiente:

- MCF-7 en co-cultivo con MSC o en presencia de factores solubles producidos por MSC, tienden a crecer de manera aislada. Esto no es lo que ocurre en MCF-7 cultivadas en ausencia de MSC y en ausencia de medios condicionados por MSC. Esta observación es más notoria en el caso de co-cultivos de MCF-7 con MSC, que al usar medios condicionados por MSC. Esto sugiere que la formación de contactos celulares de MCF-7 es inhibida por factores solubles producidos por las MSC pero también depende del contacto directo de MSC con MCF-7. La predominancia de MCF-7 aisladas entre si, también puede ser favorecida por elementos de matriz extracelular de MSC. Por último, esta observación puede deberse a que el efecto de los factores producidos por MSC no están siendo estudiados en las concentraciones debidas.

- El crecimiento aislado de células MCF-7 en co-cultivo con MSC o en MCF-7 cultivadas con medios condicionados por MSC, empieza a notarse después de 3 días de cultivo. Sin embargo, sólo al cabo de 6 días de cultivo se alcanza el máximo de la inhibición de la formación de clusters.

- MCF-7 en co-cultivo con MSC o en presencia de factores solubles producidos por MSC, expresan menores niveles de e-cadherina. Esta observación también es más notoria en el caso de co-cultivos de MCF-7 con MSC, que al usar medios condicionados por MSC. Esto se relaciona a lo observado en cuanto a la modalidad de crecimiento de MCF-7.

- Las células MCF-7 crecen habitualmente muy próximas entre si, siendo estas uniones principalmente mediadas por e-cadherina. Se observaron vesículas que sugieren un intercambio de moléculas entre las células vía caveolinas. Uniones estrechas, desmosomas y hemidesmosomas son poco comunes.

#### **4. Efecto de bFGF y VEGF en la proliferación de MCF-7 y MCF-10 y efecto de bFGF en la expresión de e-cadherina en MCF-7.**

El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), son importantes factores producidos por MSC. Es posible que contribuyan al efecto observado por medios condicionados producidos por MSC sobre la proliferación, modalidad de crecimiento y expresión de e-cadherina en MCF-7. Por esto, se analizó el efecto de ambos factores sobre estos parámetros.

##### **4.1. Efecto de bFGF y VEGF en la proliferación de MCF-7 y MCF-10**

Dado que el suero fetal (SF), contiene bFGF y VEGF, los experimentos se realizaron buscando la mínima concentración de suero fetal, que permita evaluar el efecto de los factores de crecimiento.

En primer lugar, se analizó el efecto de bFGF sobre la proliferación de MCF-7 cultivadas por 4 días en medio de cultivo conteniendo 5% ó 1% SF. Como se observa en la Figura 15, tanto en 5% como 1% SF, las células proliferaron (comparando al número de células sembradas iniciales). Sin embargo, se observó que con respecto a la condición 10% SF (condición óptima de crecimiento, Figura 15, barra blanca), las células en 5% y 1% SF proliferaron un 17% y un 57% menos, respectivamente. Al adicionar bFGF (20ng/ml) al medio de cultivo (5% ó 1% SF), se observó una inhibición aún mayor en la proliferación (49 y 35% comparadas con las condiciones sin bFGF respectivas). Resalta la completa inhibición de proliferación, cuando las células son cultivadas en presencia de bFGF en medio de cultivo conteniendo 1% SF. El efecto negativo de bFGF en la proliferación de MCF-7 se observó a concentraciones mayores a 10 ng/ml, con un efecto máximo a 20 ng/ml (datos no mostrados).

Al cultivar células MCF-10 por 3 días con medio de cultivo con 2% BSA y 20ng/ml de bFGF, también se observa que MCF-10 proliferan menos (21%), que en ausencia de bFGF.

Al analizar el efecto de VEGF sobre la proliferación de MCF-7 cultivadas por 4 días en medio de cultivo conteniendo 5% ó 1% SF (Figura 16), se observó que tanto en 5% como en 1% SF, las células proliferaron, pues el número de células contado fue mayor al número de células sembradas. Pero esta proliferación fue menor que en la condición 10% SF (condición óptima de crecimiento, Figura 16, barra blanca). Al adicionar VEGF (10 ng/ml) a los medios de cultivo conteniendo 5% ó 1% SF se observó un estímulo en la proliferación (de un 10% y 46%, comparado con las respectivas condiciones sin VEGF).

De estos experimentos, se concluye lo siguiente:

- bFGF disminuye la proliferación de las células MCF-7 y MCF-10.
- bFGF no afectó la viabilidad de las células.
- VEGF es un agente mitogénico para MCF-7.

#### **4.2. Efecto de bFGF en la modulación de contactos celulares y la expresión de e-cadherina en MCF-7.**

Se estudió el efecto de bFGF sobre la expresión de e-cadherina en células MCF-7. Como se observa en la Figura 17, las células MCF-7 no cambian su patrón de crecimiento en clusters, ni presentan una inhibición de la expresión e-cadherina por efecto de bFGF.

No se han hecho cultivos de MCF-7 con VEGF, evaluando su efecto en la modalidad de crecimiento ni en la expresión de e-cadherina.

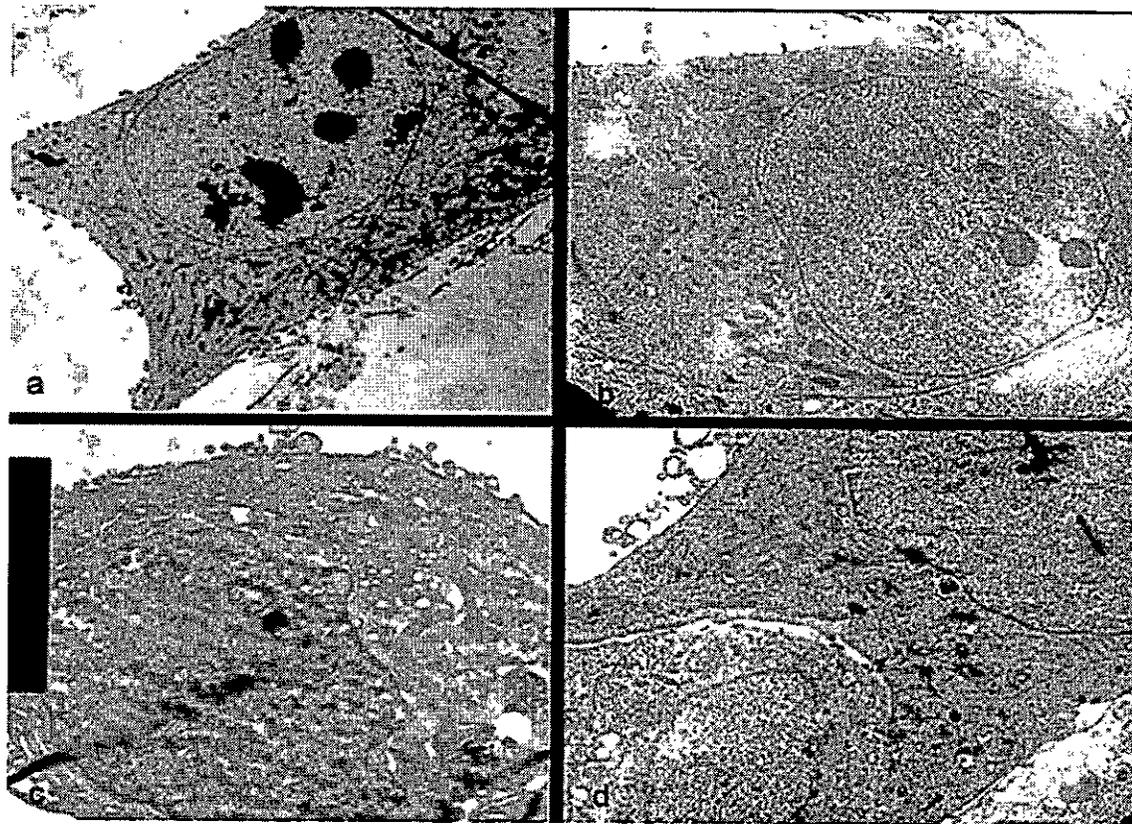


Figura 3. Análisis por MET de MSC y de células MCF-7 en diferentes condiciones de cultivo.

- (a) Célula MSC pertenecientes a un cultivo de 8.000 células/cm<sup>2</sup> sembradas sobre termanox y cultivadas por 4 días. x 2.200.
- (b) Células MCF-7 pertenecientes a un cultivo de 1.000 células/cm<sup>2</sup> fueron sembradas sobre termanox y cultivadas por 4 días. x 3.900.
- (c) MCF-7 co-cultivadas con MSC. Se sembraron 3.000 MCF-7/cm<sup>2</sup> en pozos que contenían 7.500 MSC/cm<sup>2</sup> y se cultivaron por 5 días. x 6.600.
- (d) MCF-7 cultivadas en sistemas bicamerales en presencia de MSC. 15.000 MCF-7/cm<sup>2</sup> fueron cultivadas en sistemas bicamerales, en presencia de 15.000 MSC/cm<sup>2</sup> en los pozos inferiores. Se cultivó por 4 días en estas condiciones. X 3.900.

Todas las muestras fueron procesadas para MET, según se indica en Materiales y Métodos.

Tabla 2. Efectos del co-cultivo o de sistemas bicamerales con MSC sobre el tamaño de las células MCF-7 y su núcleo.

Condición	tamaño célula (µm)		tamaño núcleo (µm)		relación núcleo/célula	
	promedio	desv stand	promedio	desv stand	promedio	desv stand
MCF-7 control	29,57	6,56	13,76	4,94	<b>0,46</b>	0,09
MCF-7 en co-cultivo con MSC	18,80	7,39	13,90	5,80	<b>0,72</b>	0,18
MCF-7 en sistemas bicamerales con MSC	35,38	9,97	22,05	7,93	<b>0,62</b>	0,16

Las células MCF-7 fueron cultivadas según se indica en Figuras 2 y 3. Con una escala incorporada al microscopio electrónico, se midieron el diámetro de núcleo y soma de secciones correspondientes a aprox. 20 células MCF-7 en cada una de las condiciones descritas.

Tabla 3. Efectos del co-cultivo o de sistemas bicamerales con MSC sobre el número y morfología de las mitocondrias de células MCF-7.

Condición	mitocondrias de matriz densa	mitocondrias de matriz pálida	n° total de mitocondrias	Cuociente mitocond. mat. pálida/m. densa
MCF-7 control	9	2	11	<b>0,22</b>
MCF-7 en co-cultivo con MSC	7	3	10	<b>0,42</b>
MCF-7 en sist. bicamerales con MSC	12	4	17	<b>0,33</b>

Células MCF-7 fueron cultivadas según se indica en Figuras 3. A través de MET, fue contado el número de mitocondrias/sección y evaluada su morfología, la que se catalogó como relajada o condensada. Se analizaron aprox. 15 células MCF-7 para cada condición. Es importante destacar que los valores no son el número de mitocondrias/célula, sino que son número de mitocondrias presentes en una sección, lo que corresponde a un corte ultradelgado (aprox. 70 nm) de una célula.

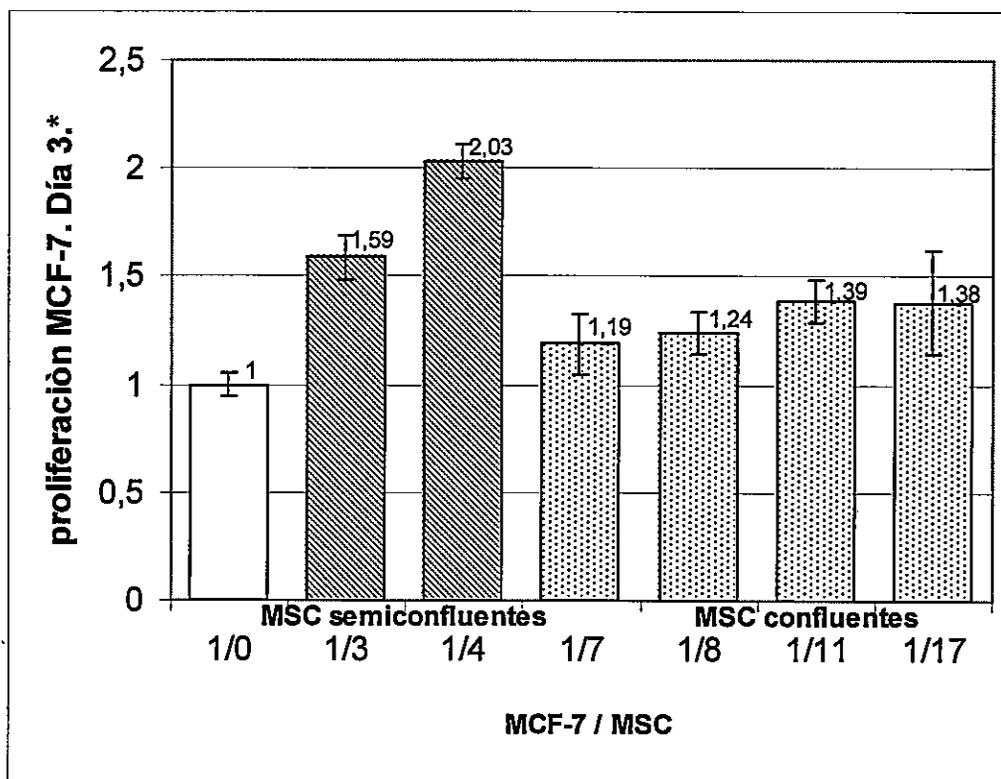


Figura 4. Efecto del co-cultivo con MSC sobre la proliferación de células MCF-7.

Se sembraron 1.800 MCF-7/cm<sup>2</sup> en pozos que contenían densidades variables de MSC, según se indica por la razón MCF-7/MSC. Los co-cultivos se incubaron durante 3 días. El número de MCF-7 en los co-cultivos se determinó como porcentaje de células CK18<sup>+</sup>, según se indica en Materiales y Métodos.

\*Los valores de proliferación relativos se calcularon respecto a la condición control (MCF-7/MSC = 1/0) al día 3, valor (=3.700 MCF-7/cm<sup>2</sup>), que se consideró igual a 1.

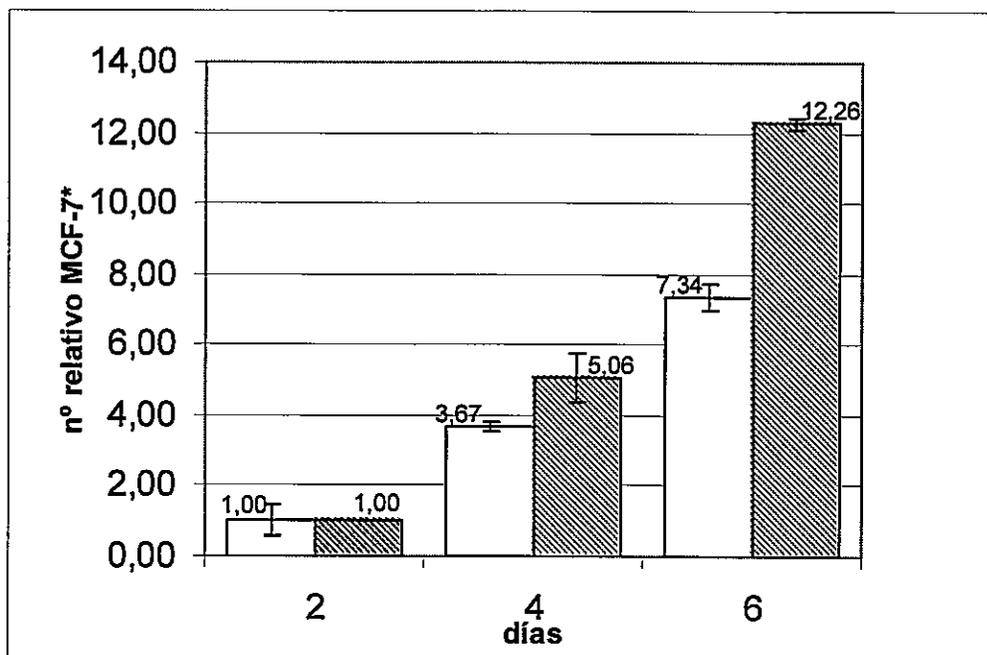


Figura 5. Efecto en la proliferación en células MCF-7 en co-cultivo con MSC a diferentes tiempos.

Se sembraron MCF-7 en pozos que contenían una monocapa confluyente de MSC (15.500 células/cm<sup>2</sup>) y se co-cultivaron hasta 6 días. Como control, se usaron células MCF-7 cultivadas ausencia de MSC (barras blancas).

\* Los valores de proliferación relativos para cada condición se calcularon tomando como referencia el día 2, cuyo valor (=3.700 MCF-7/cm<sup>2</sup>) se consideró igual a 1.

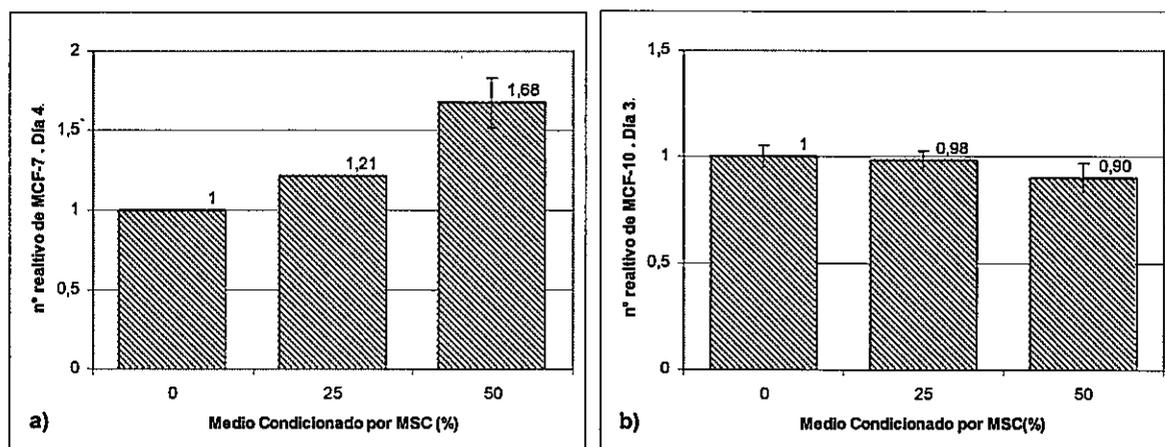


Figura 6a. Efectos sobre la proliferación de MCF-7 de medios condicionados ("exógenos") por MSC

10.500 MFC-7 adheridas por pozo fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de medio "exógeno" condicionado por MSC (ver materiales y métodos). El número de MCF-7 después de 4 días de cultivo, se determinó por recuento en hemocitómetro. Las barras representan los valores relativos al número de MCF-7 cultivadas en medio no condicionado, cuyo valor (38.000 MCF-7/pozo) se igualó a 1.

Figura 6b. Efecto de medios condicionados ("exógenos") por MSC sobre la proliferación de MCF-10.

Se cultivaron 2.800 MCF-10 adheridas/pozo, en presencia de diferentes concentraciones de medio condicionado por MSC (ver Materiales y Métodos). Al cabo de 3 días de cultivo, el número de MCF- 10 se determinó con un hemocitómetro y se expresó relativo al número inicial (21.000 MCF-10/pozo), valor que se igualó a 1.

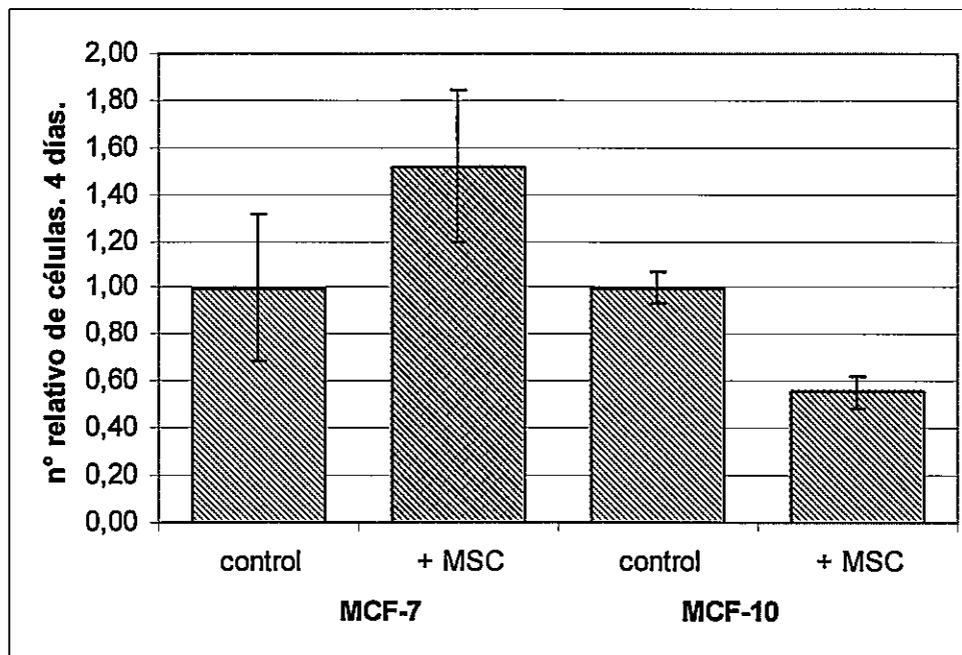


Figura 7. Efecto sobre la proliferación de MCF-7 y MCF-10 cultivadas en sistemas bicamerales en presencia de MSC.

Estos estudios se realizaron en sistemas bicamerales (ver Materiales y Métodos) en los cuales en el pozo inferior no habían células (control) o había una monocapa confluyente de MSC ( $13.100/\text{cm}^2$ ) y en el inserto se sembraron MCF-7 ó MCF-10 ( $13.600/\text{cm}^2$ ). Los sistemas bicamerales se incubaron por 4 días y el número de células se determinó con un hemocitómetro. Los valores se expresan relativos al número de células en la respectiva condición control, cuyos valores ( $12.200 \text{ MCF-7}/\text{cm}^2$  y  $69.900 \text{ MCF-10}/\text{cm}^2$ , respectivamente) se igualaron a 1.

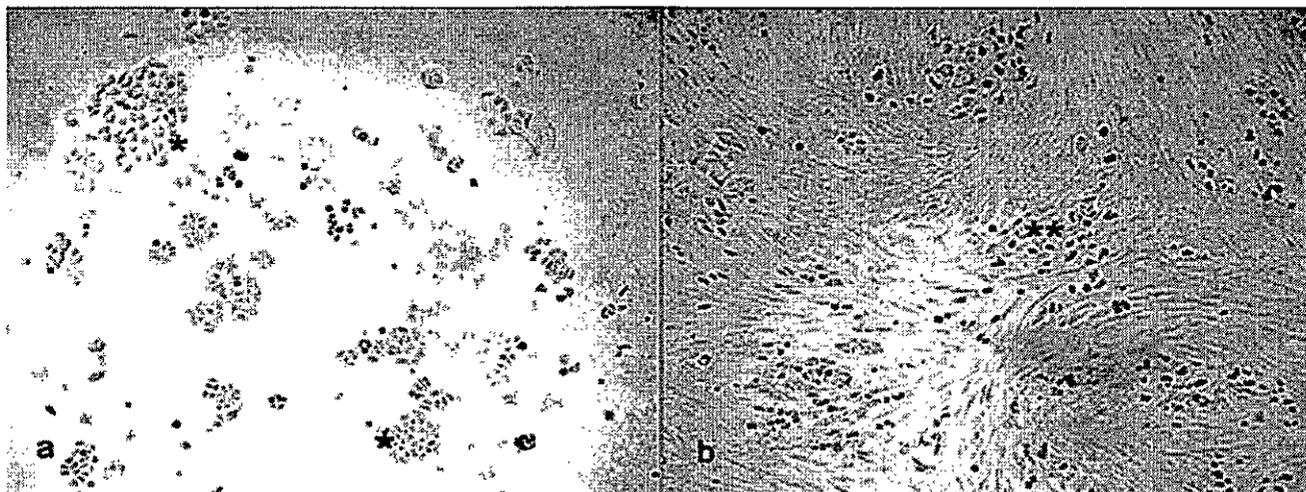


Figura 8. Observación por microscopía óptica de la modalidad de crecimiento de MCF-7 al ser cultivadas sobre una monocapa de MSC.

Se sembraron  $1.800 \text{ MCF-7/cm}^2$  en pozos sin MSC o sobre una monocapa confluyente ( $31.500 \text{ MSC/cm}^2$ ) de MSC. Se cultivaron por 3 días en estas condiciones y se fotografió directamente. (a) MCF-7 solas. (b) MCF-7 co-cultivadas con MSC. x 50.

Nótese que en a) la mayoría de las células crecen agrupadas (destacados con un asterisco). Y en b) la mayoría de las células MCF-7 crecen en forma aislada (destacado con dos asteriscos).

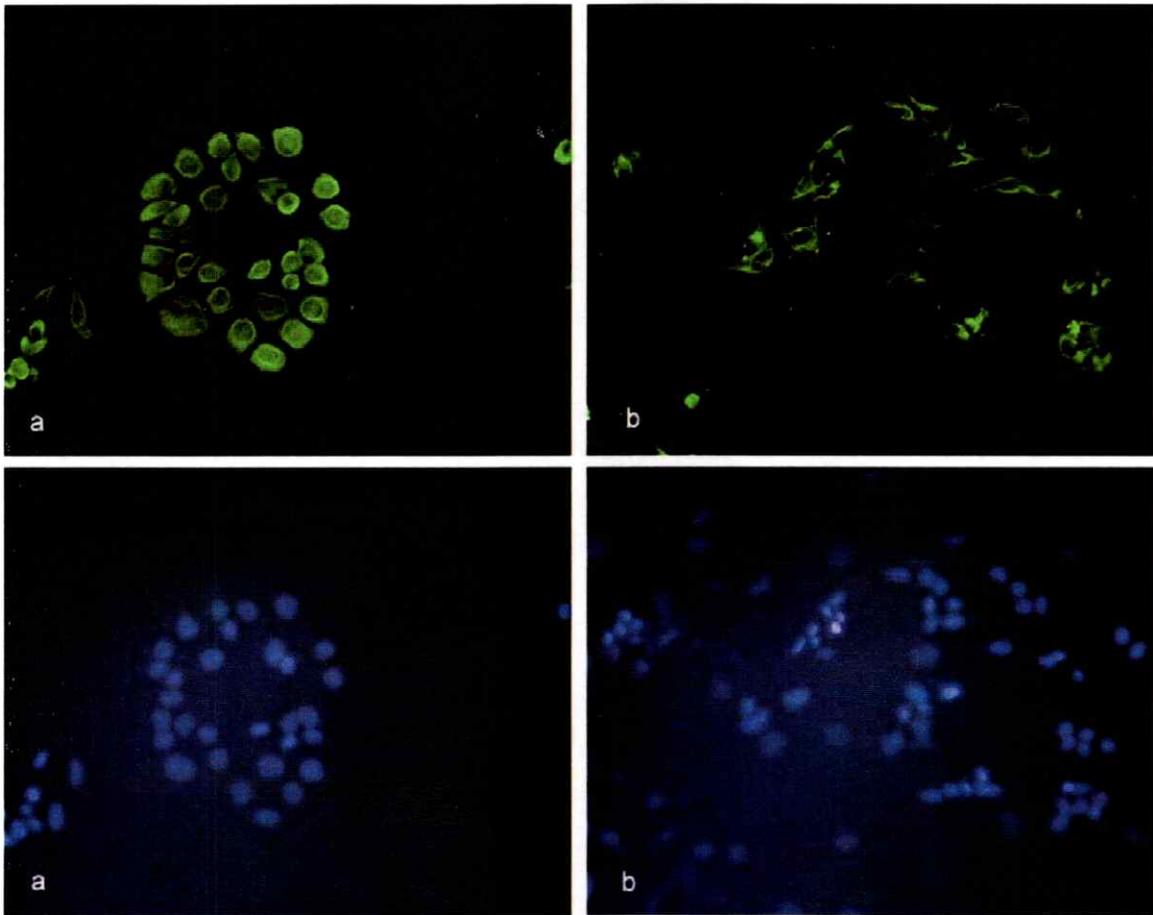


Figura 9. Observación por epifluorescencia de células CK18, que muestra la modalidad de crecimiento de MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC. 7.900 MCF-7/cm<sup>2</sup>, fueron sembradas sobre vidrio o sobre una monocapa de MSC. Los cultivos se incubaron por 6 días. CK18 se ve con fluorescencia verde, mientras los núcleos fueron teñidos con bis-benzamida (azul) (a) MCF-7 cultivadas sobre vidrio. (b) MCF-7 co-cultivadas sobre MSC. x 200.

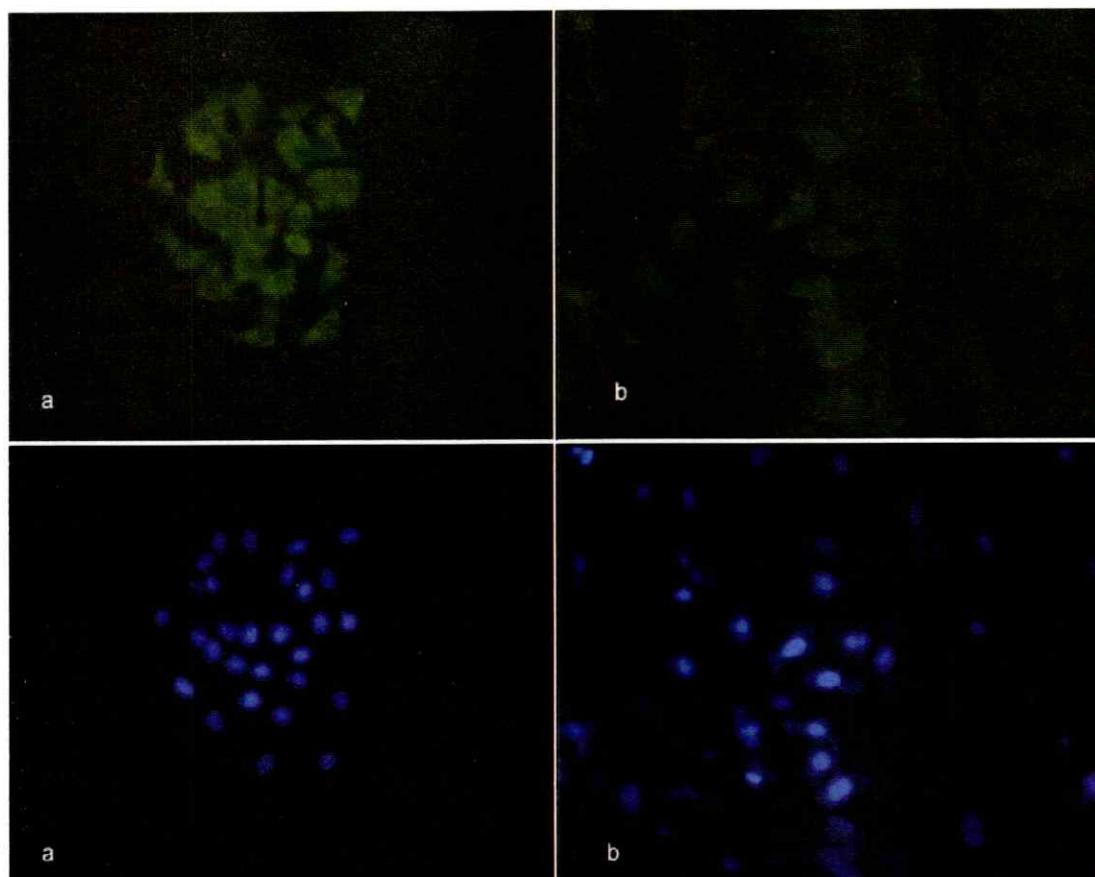


Figura 10. Expresión de e-cadherina en células MCF-7 al ser co-cultivadas con MSC. Se sembraron 4.000 MCF-7/cm<sup>2</sup>, sobre vidrio o sobre una monocapa confluyente de MSC y se cultivaron en estas condiciones durante 6 días. Las muestras fueron fijadas e incubadas con anti-e-cadherina, como se indica en Materiales y Métodos. E-cadherina se distingue por la fluorescencia verde y los núcleos por la azul.

(a) MCF-7 crecidas sobre vidrio. (b) MCF-7 en co-cultivo con MSC. x 200.

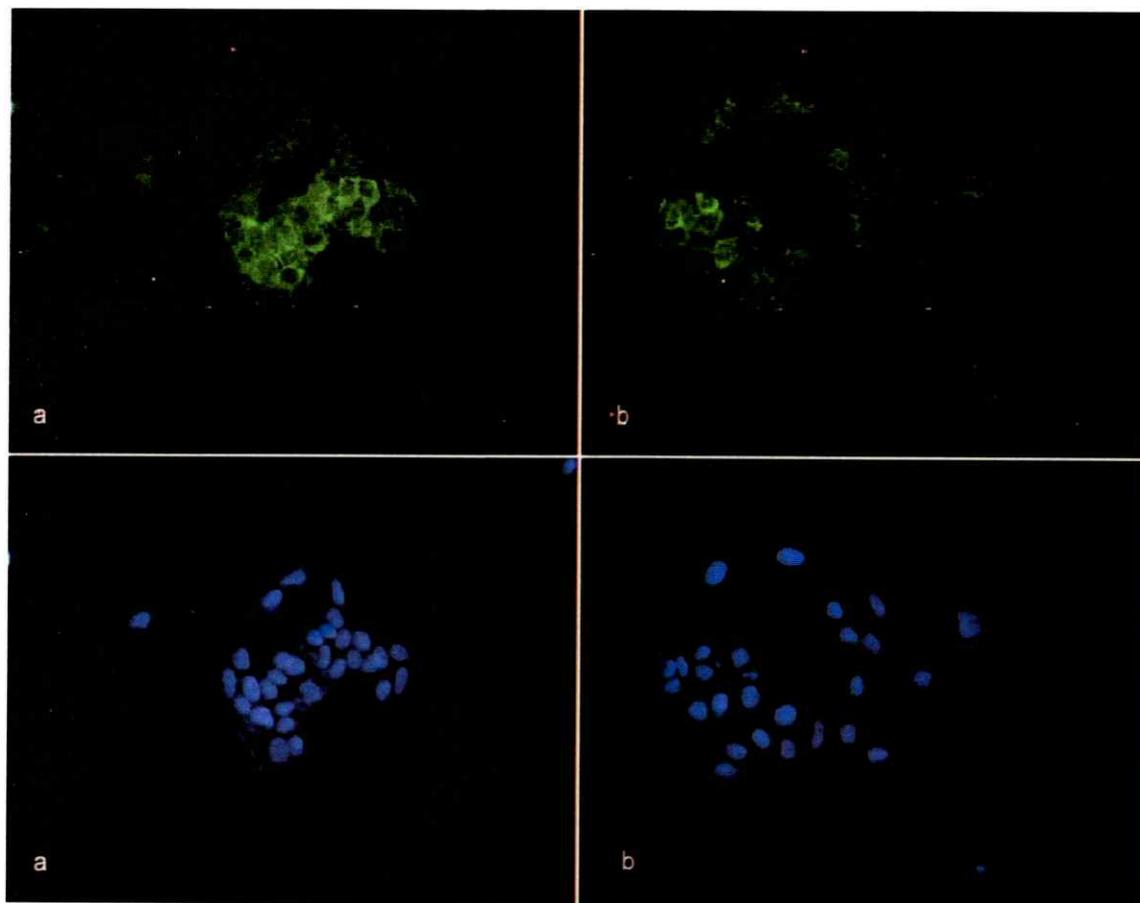


Figura 11. Efecto de medio condicionado ("exógeno") por MSC sobre la expresión de e-cadherina en células MCF-7. 15.000 MCF-7/cm<sup>2</sup> fueron sembradas sobre vidrio y cultivadas con o sin medio condicionado ("exógeno") por MSC (ver Materiales y Métodos). Después de 6 días de cultivo, las muestras fueron fijadas e incubadas con anti-e-cadherina, como se indica en materiales y métodos. La fluorescencia verde muestra E-cadherina y la azul, los núcleos. (a) MCF-7 cultivadas en 1% SF (sin medio condicionado), (b) MCF-7 cultivadas en medio constituido en un 50% por medio condicionado por MSC ("exógeno"). x 200.



Figura 12. Efecto del medio condicionado ("exógeno") por MSC sobre la expresión de e-cadherina en MCF-7. Análisis por Western blot. MCF-7 en una densidad de 2.500 células/cm<sup>2</sup>, fueron sembradas en placas y cultivadas sin o con 50% de medio condicionado por MSC ("exógeno"), 5 días. La extracción de proteínas y Western blot se realizaron según se indica en Materiales y Métodos. La marca señala el peso molecular de 130kDa, el cual corresponde al peso molecular de e-cadherina. Control: MCF-7 cultivadas en  $\alpha$ -MEM con 1% SF. +MC: MCF-7 cultivadas con medio condicionado ("exógeno") producido por MSC.

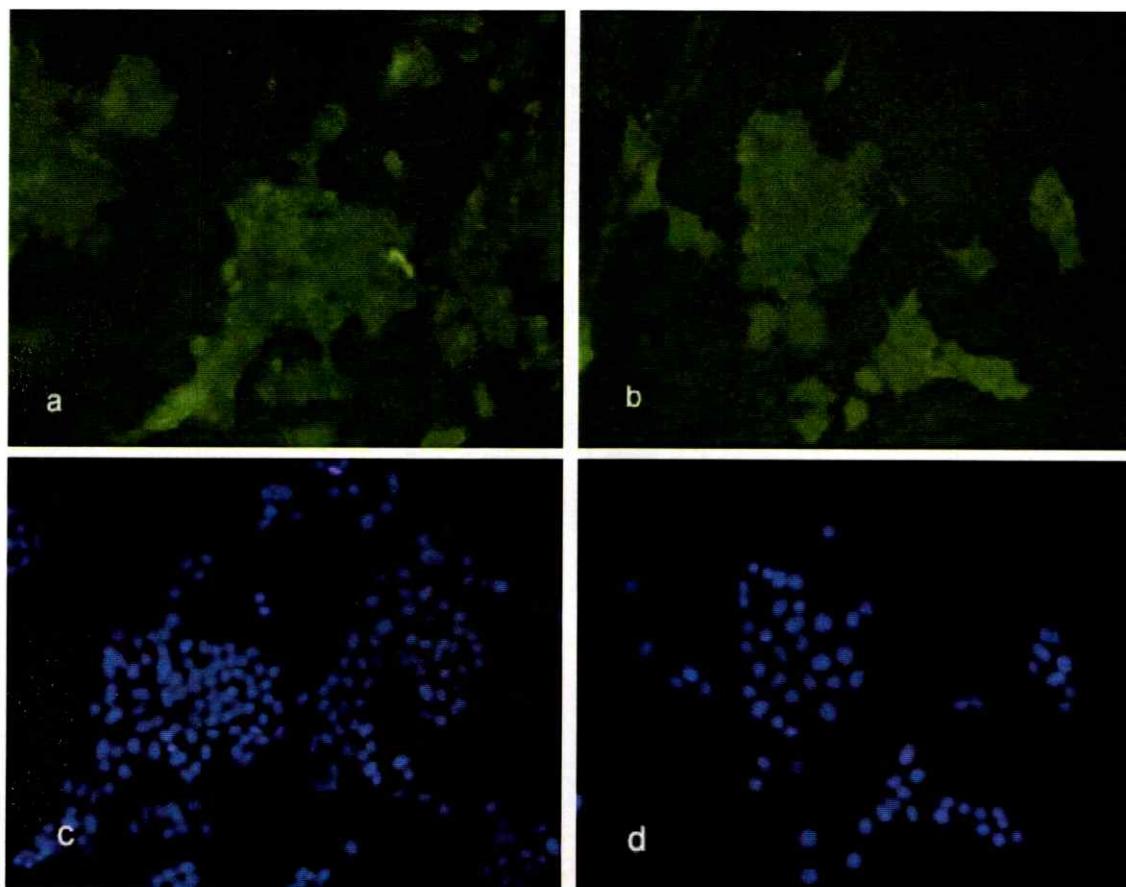


Figura 13. Co-cultivo de MCF-7 con MSC en sistemas bicamerales: efecto en la expresión de e-cadherina. Estudios realizados en sistemas bicamerales en los cuales en el pozo inferior no se sembraron MSC (control) o se sembraron MSC generando una monocapa confluyente. En el inserto bicameral se sembraron 3.800 MCF-7/cm<sup>2</sup>. Los sistemas bicamerales se incubaron por 5 días. Las células se fijaron e incubaron con anti-e-cadherina, según se indica en Materiales y Métodos. La fluorescencia verde muestra E-cadherina y los núcleos se tiñen azul. (a) MCF-7 cultivadas sin MSC en pozo inferior. (b) MCF-7 cultivadas con una monocapa confluyente de MSC en el pozo inferior. x 200.

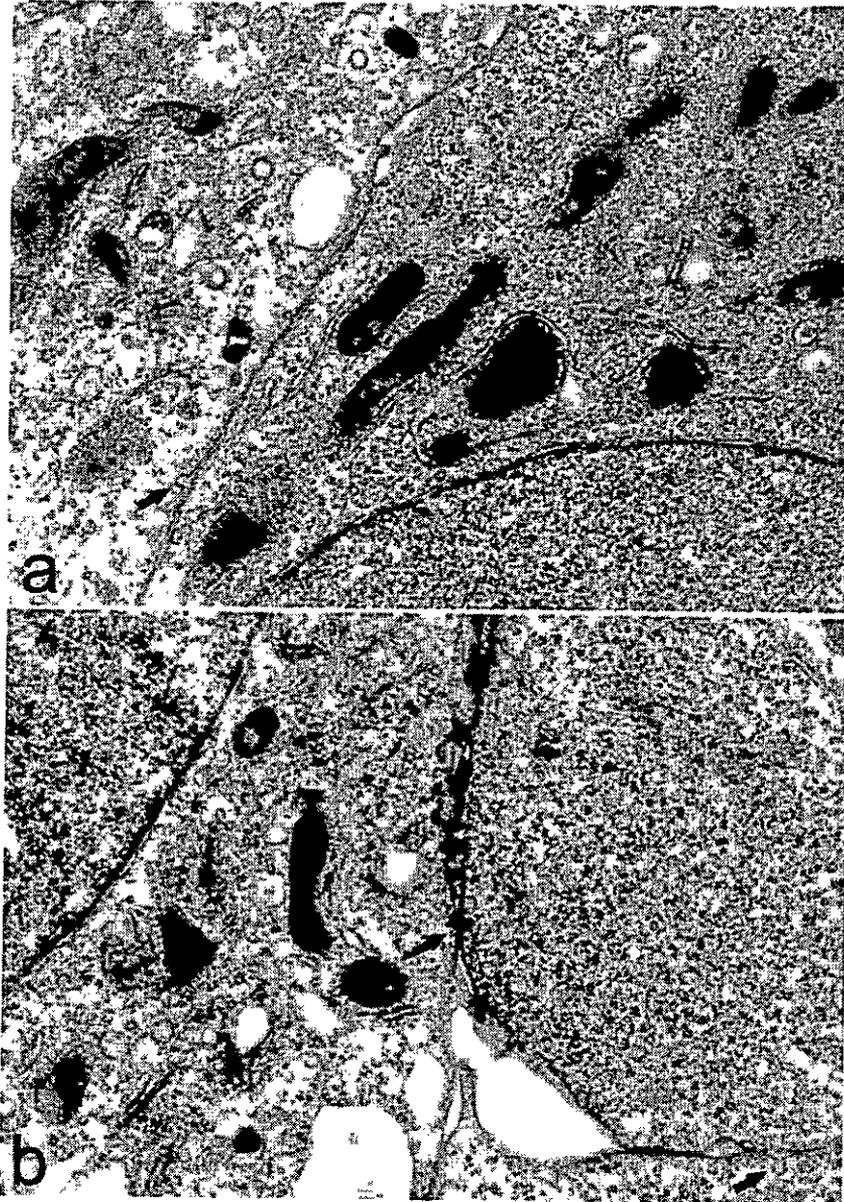


Figura 14. Inspección de contactos entre células MCF-7, co-cultivadas en sistemas bicamerales con MSC. Las MCF-7 fueron cultivadas en sistemas bicamerales, en que se sembró 0 ó 15.000 MSC/cm<sup>2</sup> en los pozos inferiores. En los insertos se sembraron 15.000 MCF-7/cm<sup>2</sup>. Se cultivaron por 4 días en estas condiciones, tras lo cual se procesaron las muestras según se indica en Materiales y Métodos. (a) MCF-7 cultivadas sin MSC en pozo inferior. (b) MCF-7 cultivadas con una monocapa de MSC en el pozo inferior.

x 11.500. Flechas indican vesículas (a y b) y una unión estrecha (b)

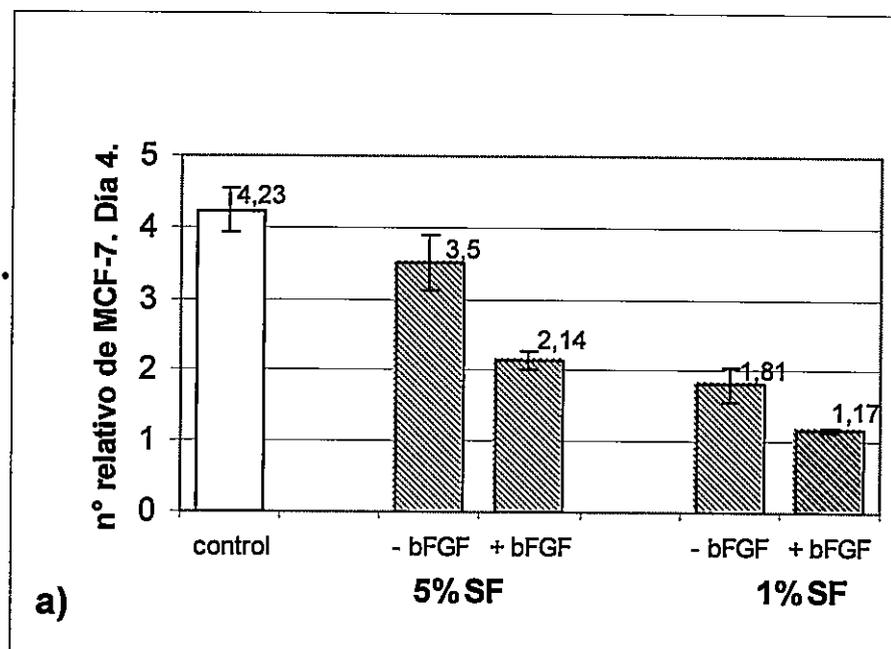


Figura 15. Efecto de 20ng/ml bFGF en proliferación de MCF-7 cultivadas en concentraciones variables de suero fetal. Se cultivó durante 4 días en condiciones variables de suero fetal en presencia o ausencia de 20ng/ml bFGF. El número de MCF-7, se determinó por recuento con un hemocitómetro y se expresó con respecto al número inicial (12.400 MCF-7/cm<sup>2</sup>), valor que se igualó a 1.

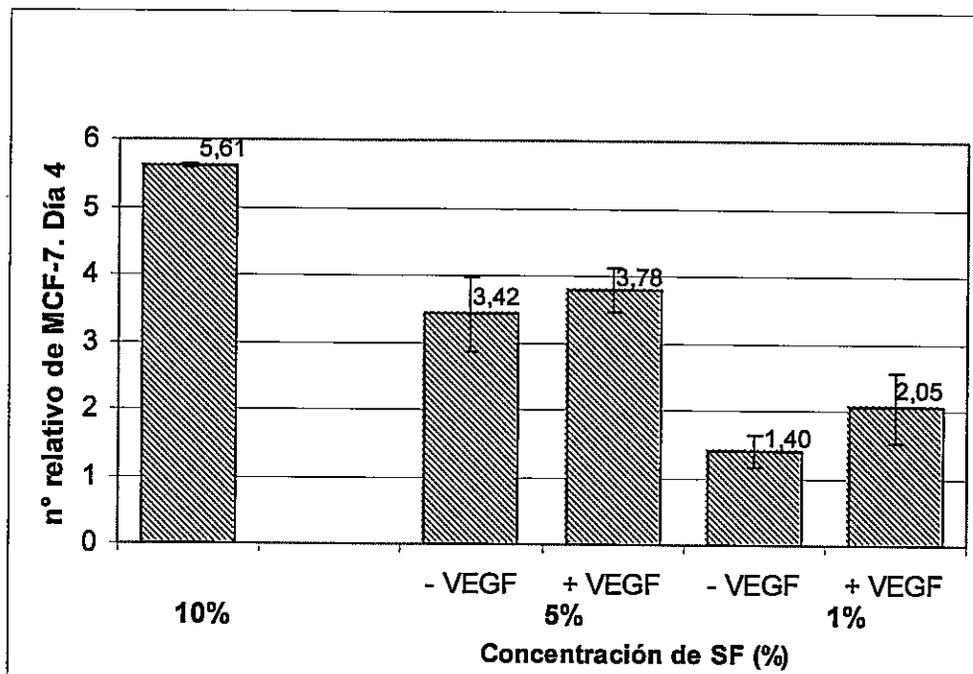


Figura 16. Efecto de 10ng/ml VEGF con concentraciones variables de suero fetal en la proliferación de MCF-7. Se cultivaron 20.000 MCF-7/cm<sup>2</sup> durante 4 días. Se contaron en hemocitómetro y los resultados se expresaron relativos al número inicial del cultivo (20.000 MCF-7 /cm<sup>2</sup>), valor que se asignó como 1.

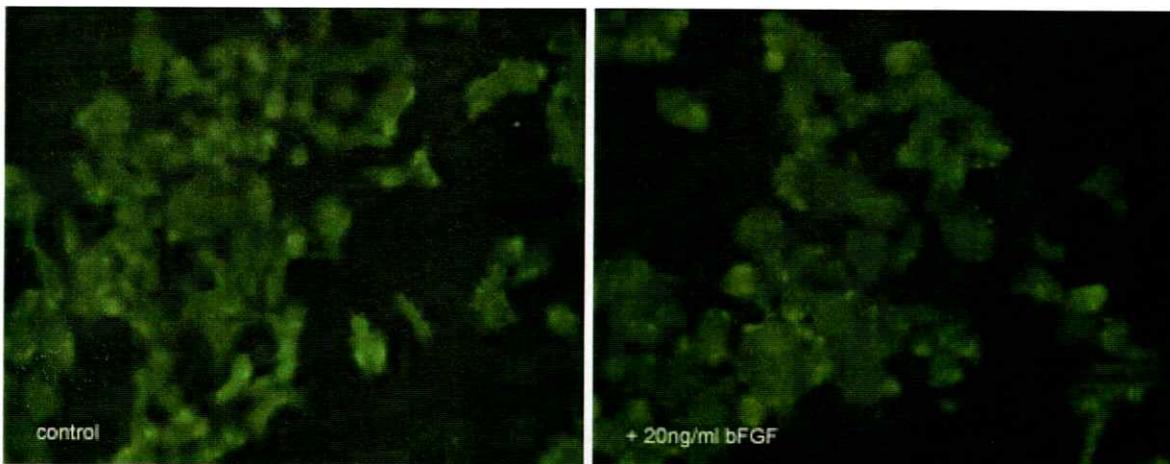


Figura 17. Expresión de e-cadherina en células MCF-7 cultivadas en presencia de bFGF. Se sembraron 12.000 MCF-7/cm<sup>2</sup> sobre vidrio, en presencia o ausencia de 20ng/ml bFGF. Se cultivaron por 6 días y se marcó e-cadherina según se indica en Materiales y Métodos. Control: células MCF-7 cultivadas sin bFGF exógeno. x 200.

## DISCUSIÓN

Se realizaron observaciones con un microscopio electrónico de transmisión (MET) a células MCF-7 cultivadas tanto sobre una monocapa de MSC (contacto directo) como sobre plástico (control). En estas condiciones de estudio y su análisis, las células MCF-7 en co-cultivo, en comparación con MCF-7 en la condición control, sufre cambios en el diámetro celular y nuclear que implican un incremento de la razón núcleo/célula. Además, en estas condiciones de co-cultivo las células MCF-7 exhiben predominantemente cromatina descondensada (eucromatina). Un aumento en la razón núcleo/célula en células tumorales, se ha asociado con un incremento transcripcional (Sato y cols 1994) y con el paso de un tumor benigno a uno maligno (Perl y cols 1998; Tan y cols 2001). Por otro lado, cromatina descondensada se relaciona con una mayor actividad transcripcional (Vanderbilt y cols. 1982). Por otra parte, usando MET se observó que células MCF-7 co-cultivadas con células MSC, aparentemente aumentan el cuociente de mitocondrias de matriz pálida frente a mitocondrias de matriz densa. Aumentos en este cuociente han sido asociados con stress oxidativo en otros sistemas (Dvorakova y cols 2001), el cual es probable que sea consecuencia de un aumento en la actividad metabólica de las células (Genova y cols. 2003).

Los cambios estructurales descritos en MCF-7 co-cultivadas con MSC, pueden ser la resultante de contactos célula-célula (MCF-7/MSC), de factores solubles producidos por MSC o de ambos. Esta interrogante pudo ser en parte resuelta, mediante el uso de sistemas bicamerales. Así, al analizar por MET secciones de células MCF-7 cultivadas en sistemas bicamerales con MSC, se determinó en MCF-7 en presencia de MSC un aumento en la razón de diámetros núcleo/célula, un predominio de células con cromatina descondensada y un aumento del cuociente de mitocondrias de matriz pálida / mitocondrias de matriz densa con respecto a la condición control (sin MSC). Dado que

estos cambios son muy similares a los detectados en el sistema de co-cultivo (en los cuales hay contacto célula-célula), he concluido que son factores solubles producidos y liberados por MSC los que producen los cambios estructurales descritos en la célula tumoral. Esto a su vez sugiere fuertemente que dichos cambios, no requieren del contacto directo entre ambos tipos celulares.

Dado que las células MCF-7 en contacto con putativos factores provenientes de MSC aparentemente presentan cambios en la estructura propios de células con mayor actividad transcripcional y metabólica, estudiamos la conducta proliferativa de células MCF-7 tanto en condiciones de contacto directo (co-cultivos) como indirecto (sistemas bicamerales o medios condicionados por MSC). La aseveración anterior demostró ser válida, pues la proliferación de células MCF-7 aumentó en presencia de MSC. Este resultado, nuevamente apoya la conclusión de que las células MSC producen algún(os) factor(es) que modula(n) la proliferación de las células tumorales. Además, lo anterior se reafirma con la observación de que los cambios en el crecimiento de células MCF-7 fueron dependientes del estado proliferativo de MSC (cultivos semiconfluentes vs. confluentes, Figura 4). La mayor actividad de MSC semiconfluentes en el crecimiento de MCF-7, se podría deber a que en esa condición las células mesenquimáticas producen más factores mitogénicos (bFGF y VEGF) que en la situación de confluencia (Benavente y cols. 2003). El o los factores mitogénicos producidos por MSC resultaron ser específicos para células tumorales MCF-7, debido a que las células no tumorales MCF-10 (Tait y cols 1990) en similares condiciones de cultivo indirecto con MSC no aumentaron su proliferación.

Los factores producidos y liberados por MSC no sólo inciden en las características de estructura y de proliferación de MCF-7 descritas, sino que además modulan la modalidad de crecimiento de estas células tumorales. Así, al estudiar la modalidad de crecimiento de células MCF-7 (formación de "clusters" vs. crecimiento aislado), se

observó que estas en tanto en cultivos bicamerales, como en presencia de medio condicionado por MSC, dejan de crecer formando grupos o "clusters" y tienden a crecer en forma de células aisladas. Debido a que estas observaciones en cultivos indirectos, también fueron detectadas en cultivos directos con MSC, nuevamente se concluye que son factores solubles producidos y liberados por MSC los que generan dichos cambios en las células MCF-7.

Àsgeirsson y cols (1998) y Wong y Gumbiner (2003) entre otros, han demostrado que la modalidad de crecimiento en forma aislada de células tumorales se relaciona con una disminución en la expresión de e-cadherina, una de las principales proteínas involucradas en adhesiones homotípicas en células epiteliales (revisado por Perez-Moreno y cols 2003). Esto fue confirmado en células MCF-7 las que en cultivo indirecto con MSC experimentan una inhibición de la expresión de e-cadherina en MCF-7, evaluados por inmunofluorescencia y ensayos de Western blot. Como se ha descrito en condiciones experimentales anteriores, la disminución en la expresión de e-cadherina en MCF-7 también se detectó en sistemas de co-cultivo con MSC.

La disminución de adhesiones mediadas por e-cadherina constituyen una etapa limitante para la progresión de un tumor definido como adenoma a uno tipo carcinoma (Peri y cols 1998). Lo anterior, debido a que una célula aislada en comparación con una célula perteneciente a un cluster, tiene mayor capacidad de migrar y por ende de invadir nuevos tejidos.

Usando diferentes condiciones de cultivo, en esta tesis se ha propuesto que factores solubles producidos y liberados por MSC generan en las células tumorales MCF-7, cambios en su estructura (sugerentes de un aumento de la actividad transcripcional y metabólica), aumentos en su actividad proliferativa y una inhibición de la expresión de e-cadherina. Así, la célula tumoral adquiriría un fenotipo descrito como propio de una célula tumoral más agresiva.

En estas tesis no se abordó en detalle la identificación de los factores solubles producidos y liberados por las células MSC que tendrían efecto en células MCF-7. Muchos son los factores de crecimiento y citoquinas producidos por las células MSC (Prockop 1997, Majumdar y cols 1998). Para varios de ellos ya se ha determinado un efecto en la proliferación de células MCF-7. Así, GM-CSF, LIF e IL-6 han sido descritos como factores mitogénicos (Honma S y cols. 2002, Kamohara H y cols. 1997), en cambio IL- $\beta$ , IL-3, IL-4 y TNF- $\alpha$ , han sido descritos como inhibidores de la proliferación (Shen y cols. 2002, Gooch y cols. 1998). En tanto, sólo IL-6 ha sido descrita como una citoquina que inhibe la expresión de e-cadherina en células MCF-7.

Estudios recientes en este laboratorio han indicado que las células MSC producen además factores angiogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Benavente y cols 2003). En esta tesis se analizó tanto el potencial mitogénico como el efecto en la modalidad de crecimiento que estos factores podrían tener en las células MCF-7.

VEGF demostró favorecer la proliferación de las células MCF-7, resultado concordante con lo descrito por otros grupos (Borgstrom y cols 1999). Por otro lado, VEGF no cambió la modalidad de crecimiento de MCF-7 y como se era de esperar no inhibió la expresión de e-cadherina (datos no mostrados). Por lo tanto, VEGF exógeno parece contribuir con alguno de los cambios descritos en MCF-7, sin embargo la interpretación de los efectos de VEGF exógeno es difícil, dado que VEGF es producido por las propias células MCF-7 y ejerce funciones tanto autocrinas como paracrinas (Ruohola y cols. 1999).

Por otro lado, en esta tesis se demostró que bFGF exógeno produce una leve disminución en el número de células MCF-7, las que no cambian la modalidad de crecimiento ni la expresión de e-cadherina. Estos resultados, que son concordantes a los obtenidos por otros grupos (Fenig y cols. 1997; Wang y cols. 1998), plantean que en las

condiciones de cultivo indirecto usadas en esta tesis, bFGF no es uno de los factores que promueven los cambios descritos en células MCF-7. Dado que las células MSC producen y liberan bFGF (Benavente y cols. 2003), este hallazgo es contradictorio, pero se explicaría porque el efecto de MSC, vía la producción y liberación de factores de crecimiento y citoquinas, es un evento multifactorial. Es probable que las señales de bFGF sean encubiertas por señales producidas por otros factores.

Por último, citoquinas de la familia de la IL-6 se convierten en candidatos a ser factores producidos por MSC que son al menos responsables de los cambios en la modalidad de crecimiento de células MCF-7. Experimentos de neutralización de IL-6 (vía unión al ligando, o bloqueando el respectivo receptor) deben ser realizados para verificar esta propuesta.

## CONCLUSIÓN Y SIGNIFICADO

Usando la línea celular MCF-7 como modelo de célula tumoral mamaria y cultivos de células MSC como modelo de progenitores mesenquimáticos derivados del estroma de médula ósea humana, se estudiaron las interacciones entre ambos tipos de células en un intento por reproducir *in vitro* alguno de los eventos que ocurren durante la micrometástasis de células tumorales mamarias en la médula ósea. Los resultados obtenidos, sugieren lo siguiente:

En condiciones de estado estable, las células MSC en la médula ósea permanecen en estado quiescente ( $G_0$ ) (Cognet y cols 2001), el cual puede cambiar por acción de determinados factores a una condición de ciclo con el consiguiente compromiso de diferenciación hacia un determinado linaje (Prockop 1997). En la situación de quiescencia, las células MSC no producen ni liberan factores (tales como bFGF, VEGF y posiblemente otros) (Benavente y cols 2003).

Si en esta condición de quiescencia, llegan células tumorales (CT) al microambiente (estroma) de la médula ósea (micrometástasis) e interactúan con MSC (Hombauer y Minguell 2000), se estarán exponiendo a un microambiente "pobre" en factores de crecimiento y citoquinas (Benavente y cols 2003). Así, las CM se mantendrán en un estado de "dormancia" donde la ausencia de señales favorecería un "equilibrio" entre proliferación y apoptosis. Desde el punto de vista clínico, lo anterior resulta en una condición donde la masa tumoral no aumenta (Guba y cols 2001).

Las MSC, al recibir señales mitogénicas y de diferenciación (probablemente para la reparación de tejido mesenquimático) dejan la condición de  $G_0$  para entrar a ciclo y pueden migrar y diferenciarse (Prockop 1997). Este nuevo estado, es similar al logrado *ex vivo* con los cultivos de MSC usados en esta tesis. En esta condición, las células MSC producen factores de crecimiento (Benavente y cols 2003) que se liberan al medio, los

que gatillarían la salida de la CT de un estado de dormancia a uno de alta proliferación, cambiando su modalidad de crecimiento. Estos cambios son propios de una célula tumoral maligna y resultarán en un aumento de la masa tumoral (Guba y cols 2001).

## REFERENCIAS

- Ásgeirsson K, Jónasson J, Tryggvadóttir L, Ólafsdóttir K, Sigurgeirsdóttir JR, Ingvarson S, Ögmundsdóttir H. 2000. Altered expression on e-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer* 36: 1098-1106.
- Ásgeirsson K, Ólafsdóttir K, Jónasson J, Ögmundsdóttir H. 1998. The effect of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 10(9): 720-728.
- Benavente C, Sierralta W, Cognet P, Minguell J. 2003. Subcellular Distribution and Mitogenic Effect of Basic Fibroblast Growth Factor in Mesenchymal Uncommitted Stem Cells. *Growth Factors*, (en prensa).
- Borgstrom P, Gold DP, Hillan KJ, Ferrara N. 1999. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res* 19(5B):4203-14.
- Braun S, Harbeck N. 2001. Recent advances in technologies for the detection of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 3(5):285-8.
- Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich C, Gastroph S, Wischnick A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. 2000. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III Breast Cancer. *N Engl J* 342:525-33.
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD. 1973. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem*. 248(17):6251-3.
- Conget P, Allers C, Minguell J. 2001. Identification of a Discrete Population of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells Exhibiting Properties of Uncommitted Progenitors. *J. Hem. Stem Cell Res*. 10:749-758.
- Conget P, Minguell JJ. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 181(1):67-73.
- Dvorakova K, Waltmire C, Payne CM, Tome ME, Briehl MM, Dorr RT. 2001. Induction of mitochondrial changes in myeloma cells by imexon. *Blood* 97:3544-51.
- Fenig E, Wieder R, Paglin S, Wang H, Persaud R, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Yahalom J. 1997. Basic fibroblast growth factor confers growth inhibition and mitogen-activated protein kinase activation in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 3(1):135-42.
- Fibbe WE. 2002. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 61(2): 29-31.

- Garnier M, Giamarchi C, Delrieu I, Rio MC, Chinesta P, Bayard F, Poirot M, Faye JC. 2003. Insulin and estrogen receptor ligand influence the FGF-2 activities in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Pharm* 65: 629-636.
- Genova ML, Pich MM, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C, Formigini G, Castelli GP, Lenaz G. 2003. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(5):506-13.
- Gerber HP, Ferrara N. 2003. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med* 81: 20-31.
- Gooch JL, Lee AV, Yee D. 1998. Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 58(18):4199-205.
- Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissler EK, Jauch KW, Anthuber M, Falk W, Steinbauer M. 2001. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 61(14): 5575-9.
- Hombauer H, Minguell J. 2000. Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Cancer.* 82(7): 1290-1296.
- Honma S, Shimodaira K, Shimizu Y, Tsuchiya N, Saito H, Yanaihara T, Okai T. 2002. The influence of inflammatory cytokines on estrogen production and cell proliferation in human breast cancer cells. *Endocr J.* 49(3):371-7.
- Jiang Y, Jahagirdar B, Reinhardt L, Schwartz R, Keene D, Ortiz-Gonzalez X, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W, Largaespada D, Verfaillie C. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 4;418(6893):41-9.
- Kamohara H, Sakamoto K, Ishiko T, Masuda Y, Abe T, Ogawa M. 1997. Leukemia inhibitory factor induces apoptosis and proliferation of human carcinoma cells through different oncogene pathways. *Int. J. Cancer* 72: 687-695.
- Kasimir-Bauer S, Mayer S, Bojko P, Borquez D, Neumann R, Seeber S. 2001. Survival of Tumor Cells in Stem Cell Preparations and Bone Marrow of Patients with High- Risk or Metastatic Breast Cancer after Receiving Dose-intensive or High-Dose Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 7:1582-1589.
- Levenson AS, Jordan VC. 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 57(15):3071-8.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. 2001. *Exp Biol Med (Maywood)*. 226(6):507-20.
- Pantel K, von Knebel Doeberitz M. 2000. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2:95-101.

- Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. 2003. Sticky Business: Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions. *Cell* 112, 535-548.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392(6672):190-3.
- Pittenger M, Mackay M, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284: 143-147.
- Prockop, DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues, *Science* 276(5309):71-4.
- Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Härkönen PL 1999. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endoc* 149: 29-40.
- Shen WH, Zhou JH, Broussard SR, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. 2002. Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor. *Cancer Res.* 62(16):4746-56.
- Sierralta W. 2001. Immunoelectron Microscopy in Embryos. *Methods* 24: 61-69.
- Tait L, Soule HD, Russo J. 1990. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 50(18):6087-94.
- Tan PH, Goh BB, Chiang G, Bay BH. 2001. Correlation of nuclear morphometry with pathologic parameters in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mod Pathol.* 10:937-41.
- Vanderbilt JN, Bloom KS, Anderson JN. 1982. Endogenous nuclease. Properties and effects on transcribed genes in chromatin. *J Biol Chem.* 257(21):13009-17.
- Wang H, Rubin M, Fenig E, DeBlasio A, Mendelsohn J, Yahalom J, Wieder R. 1997. Basic fibroblast growth factor causes growth arrest in MCF-7 human breast cancer cells while inducing both mitogenic and inhibitory G1 events. *Cancer Res* 57(9):1750-7.
- Wang Q, Maloof P, Wang H, Fenig E, Stein D, Nichols G, Denny TN, Yahalom J, Wieder R. 1998. Basic fibroblast growth factor downregulates Bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 238(1):177-87.
- Wong AS, Gumbiner BM. 2003. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol.* 23;161(6):1191-203.