

Resumen

A pesar de los avances, el 30% de los pacientes con cáncer de mama (CaMa) en etapa inicial experimentarían una recaída con metástasis a distancia¹. Modelos de diseminación metastásica describen una compleja interacción de factores de solubles y matriz extracelular (ECM) e implican procesos biológicos como: extravasación tumoral, la circulación, la extravasación, la proliferación, la angiogénesis² y el microambiente del tejido diana³. Sin embargo, las limitaciones en los modelos animales e *in vitro* no dejan establecer un mecanismo de migración e invasión definido. El cultivo 3D acoplado a invasión tumoral⁴ es una alternativa emergente para establecer un modelo que proporcione interacción de ECM y un tumor sólido agregado *in vitro*⁵. Con esta herramienta es posible caracterizar factores solubles secretados en cultivo celular para caracterizar el desarrollo de un proceso de invasión tumoral.

Objetivo

El propósito de este trabajo es obtener un patrón molecular de factores solubles tumorales asociados a malignidad de las líneas celulares MCF-7, ZR-75-30 y MDA-MB, así como identificar si estos factores solubles producen distintos grados de crecimiento tumoral. Estos medios se pondrán en contacto con un cultivo formador de esferoides de distintas líneas celulares de cáncer de mama y se llevara a cabo un ensayo de invasión 3D usando una Matriz extracelular como sustrato para la invasión. Esto dará información sobre que medio condicionado es activamente biológico y se analizarán los patrones de cada uno.

Materiales y métodos

• Generación de medios condicionados

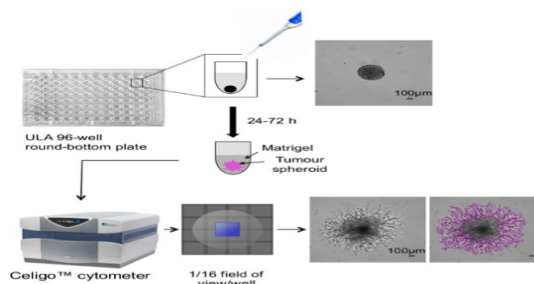
Se llevo a cabo un cultivo celular que contenía 8×10^6 células en una superficie de 75 cm^2 suplementado con medio RPMI-1640 con baja concentración de glucosa (1.5g/L) sin rojo de fenol y sin glutamina. El cultivo celular se dejó durante 24 h. en incubación con 5% de CO_2 a 37°C . El medio se recolectó y se dializó mediante una membrana con poro de 50 KDa en PBS y se liofilizó para concentrarlo. Después, se almacena a -70°C para su futuro uso.

• Cultivo celular en micro placas formadoras de esferoides (Corning Inc).

Se llevo a cabo un cultivo celular en micro placas formadoras de esferoides de 96 pozos agregando 4×10^3 células en 0.5 cm^2 . El esferoide tarda aproximadamente 24 h en formarse. Al tener los esferoides se procedió a evaluar el efecto de invasión a través de microscopia en intervalos de 6h.

• Adición de Matrigel (gel grueso).

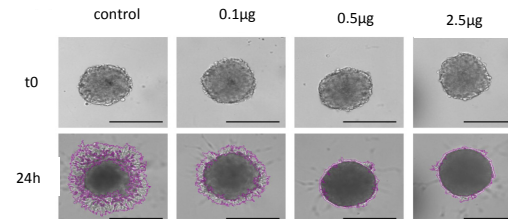
A los pozos que contienen los esferoides tumorales se les agregó Matrigel embebido en hielo en una concentración de gel grueso ($150\text{--}200 \mu\text{L}/\text{cm}^2$). El Matrigel se incubó a 37°C durante 1h. Después, se les agregó medio condicionado de diferentes líneas celulares para observar su efecto invasivo.



Resultados

• Los medios condicionados tienen diferente actividad a diferente concentración.

La proteína total de los medios condicionados fue cuantificada por medio de Bradford. Y se añadió diferencialmente desde $0.1 \mu\text{g}$ hasta $2.5 \mu\text{g}$ para tener un control de concentración del medio condicionado. Se observa que a mayor concentración de medio condicionado de la línea celular MDA-MB, la línea celular MCF-7 invade el Matrigel (figura 2). La invasión se midió en los pozos por medio del programa Image J.



• Conclusión

El ensayo de invasión 3D usando micro placas formadoras de esferoides junto con la adición de Matrigel para la mimetización de un tejido tumoral *in vitro* permite la evaluación de los medios condicionados provenientes de líneas celulares de cáncer de mama humano. Aun falta por visualizar los medios condicionados de ZR-75-30 y de MCF-7.

Referencias

1. 10.1016/S0140-6736(05)66544-0
2. 0.1002/1097-0142(19851001)56:7<1696::AID CNCR2820560738>3.0.CO;2-N
3. 10.1038/nm0806-875
4. 10.1056/NEJMra0805239
5. 10.3791/52686