

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología Animal



TESIS DOCTORAL

Caracterización *in vitro* e *in vivo* de una nueva línea celular (IPC-366) de cáncer inflamatorio mamario canino (IMC): comparación con el cáncer de mama inflamatorio humano

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Cáceres Ramos

Directores

Juan Carlos Illera del Portal

Laura Peña Fernández

James Rueben

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Fisiología Animal



Caracterización *in vitro* e *in vivo* de una nueva línea celular (IPC-366) de cáncer inflamatorio mamario canino (IMC). Comparación con el cáncer de mama inflamatorio humano.

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Sara Cáceres Ramos

Bajo la dirección de los Doctores

Juan Carlos Illera del Portal, Laura Peña Fernández y

James Reuben

Madrid, 2016



El Dr. Juan Carlos Illera del Portal, con DNI: 50418501-V, Catedrático del Dpto. de Fisiología (Fisiología Animal), la Dra. Laura Peña Fernández, con DNI: 00806634-R, Profesora Titular de Universidad del Dpto. de Medicina y Cirugía Animal y pertenecientes a la Facultad de Veterinaria de la UCM y El Dr. James Reuben, con N° de Pasaporte 135301640, Professor of the University of Texas, Department of Hematopathology of the MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, EEUU.

Certifican:

Que la Tesis Doctoral **“Caracterización in vitro e in vivo de una nueva línea celular (IPC-366) de cáncer inflamatorio mamario canino (IMC). Comparación con el cáncer de mama inflamatorio humano”** realizada por Dña. Sara Cáceres Ramos, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y que tras su revisión consideramos que es apta para ser presentada ante el tribunal calificador.

Madrid, a 5 de junio de 2016

Los directores de la Tesis

Fdo.: Juan Carlos Illera del Portal Fdo.: Laura Peña Fernández.

Fdo.: James Reuben

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra”

Claude Bernard

A mi abuelo, a mi madre y a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Después de haber realizado esta Tesis Doctoral, no sé cómo agradecer todo el apoyo y la comprensión que he tenido de tantas personas en estos años.

Lo primero de todo me gustaría agradecer a los increíbles investigadores y directores de esta Tesis, los profesores Juan Carlos Illera, Laura Peña y James Reuben. Os estaré eternamente agradecida por haberme dado la oportunidad de hacer un sueño realidad y poder formar parte de un “pedacito” de vuestra investigación. Me habéis enseñado tantas cosas que no podría enumerarlas, y sobre todo, todo el cariño y todo el apoyo que me habéis proporcionado en momentos difíciles. Os voy a llevar siempre en el corazón. A Juan Carlos, por haberme devuelto la ilusión en investigar y por haberme enseñado todo lo que se. A Laura, por contagiarme ese entusiasmo por la ciencia. Siempre recordaré las sesiones de microscopio y sobre todo esa ilusión que nos hizo encontrar el “snorkel”. Gracias por vuestra paciencia y por haberme ayudado tanto en todo momento.

Thanks to Dr. Reuben, for giving me the opportunity to make a stay at the prestigious MD Anderson Cancer Center in Houston and have agreed to supervise this PhD Thesis. For your support, your help and your patience. I don't want to forget your amazing wife, Carmen, because you made my stay at Houston the most enjoyable.

Por otro lado, estoy especialmente agradecida a los profesores del Departamento de Fisiología Animal, por haberme ayudado siempre. A Gema, que para mí ha sido más que una profesora, gracias por todos los buenos momentos y los consejos que me has dado, por todo el aprecio que me has demostrado en estos años. A Pilar, “mami May”, por cuidarme, escucharme y sacarme siempre una sonrisa. A María José, por animarme en todo momento y haberme dado consejos muy valiosos. A Alberto, por alegrarme con sus visitas. En último lugar, a Alfredo, por ayudarme en los primeros momentos de este viaje.

I would also like to thank the departments of Hematopathology and Radiation Oncology of the MD Anderson Cancer Center, for help me to perform all experiments. To Dr. Wendy Woodward, for allowing me to make this stay. To Bisrat, for advice at all times, show me new guidelines, and help me interpret all results. Lara, because without her, many of the results could not have been revealed. Richard, thanks for all your help with mice, western blot, for everything, and being there whenever I needed it. To Hui, for all those good times and your interest in everything. To Chang, Sandal, Josh, Dan and Mirtha, for encouraging me and making me have such a good time.

También me gustaría agradecer toda la ayuda que me han prestado a Pedro, con todo el lío de preparaciones inmunohistoquímicas y por su simpatía, y a Carmen, mi Carmencita, por todo: por ayudarme, por escucharme, por apoyarme, por aconsejarme y sobre todo, por demostrarme su cariño en todo momento.

Me gustaría expresar mi gratitud también al Centro de Microscopía electrónica de la UCM, en especial a Miriam, Ana y Marisa. Gracias por toda vuestra ayuda y por haberme hecho pasar tan buenos momentos en la preparación de las muestras y ante el microscopio.

Todo este trabajo no lo podría haber realizado sin el apoyo que he tenido durante estos años de mis compañeros de laboratorio: Laura, Asun, Gabri, Alex, Fran, Carlota, Bea, y en especial a Leti. Por ser además de compañera, mi amiga y mi confidente. Por animarme en todo momento, por sacar siempre el lado positivo de las cosas, y por todo lo que me ha enseñado en el laboratorio.

Desde lo personal, agradecérselo a mis padres, a Juanjo y a mi familia. A mi madre, por ser mi referente en la vida, por su fuerza y entereza, por sacarme adelante. No tengo palabras para describir todos los esfuerzos que has realizado y las incontables veces que me has animado. Gracias a ti soy quien soy. Todo

este trabajo está especialmente dedicado a ti. Sin tu apoyo y tu comprensión, de lo que para ti era incomprensible, no podría haberlo conseguido. Al final entre las dos lo hemos conseguido. A mi padre, el responsable de que entrara en el Departamento de Fisiología. Por tu cariño incondicional, por alegrarte de mis logros y por hacerme seguir luchando hasta el final.

Especial gratitud a Juanjo, por tu incansable empeño de que siguiera mis sueños, por tu apoyo y comprensión, por estar a mi lado en todo momento, por no dejar que me viniera abajo y sacarme siempre una sonrisa, y sobre todo, por todo el cariño que me has demostrado.

No puede faltar mi familia, todos ellos, los que están y los que nos dejaron. A mi abuelo que, aunque no ha sido partícipe de todo este proceso, ha sido el que me ha guiado. A mis tíos y mis primos por su apoyo incondicional; y a mis maravillosos sobrinos, por ser mis alegrías.

Para finalizar me gustaría agradecer también todo su cariño a mis amigos. En especial a Carla, por ser mi mejor amiga y estar siempre ahí. A mis pececitos, porque sin vuestro apoyo no lo habría conseguido. Y no me quiero olvidar de mis amigas que me han visto crecer, Moni, Sandra, Tamara, Rosy, Bea, Esther: por haberme hecho disfrutar de la vida y haberme apoyado en todo momento. Mi especial gratitud a Mary, a mi niña, simplemente por ser como eres. A Miriam, Silvia y Olga, porque siempre estáis en mis pensamientos y por haberme apoyado y consolado. Todos vosotros sois los mejores amigos que pudiera tener. Soy muy afortunada de teneros.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE	xiii
LISTA DE ACRÓNIMOS	19
I. RESUMEN	25
II. SUMMARY	33
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	41
1. Introducción general del cáncer mamario inflamatorio humano y canino.	43
1.1 Epidemiología y pronóstico del IBC e IMC	45
1.2 Características clínicas e histopatológicas del IBC e IMC	47
1.3 Producción de hormonas esteroides en el cáncer de mama y sus receptores	53
1.3.1 Progestágenos	56
1.3.2 Estrógenos	57
1.3.3 Andrógenos	59
1.3.4 Receptores de hormonas esteroides	61
1.4 Bases moleculares de IBC e IMC	63
1.4.1 Clasificación molecular	63
1.4.1.1 Cáncer de mama triple negativo (TNBC)	65
1.4.2 Gen supresor tumoral p53	69
1.4.3 Genes RhoC y Wisp3	69
1.4.4 Ciclooxygenasa-2 (COX-2)	70
1.4.5 Adhesión celular: E-cadherina	72
1.4.6 Factores angiogénicos y linfangiogénicos	73
1.5 Tratamiento de IBC e IMC	74
1.6 Modelos experimentales en la investigación de IBC e IMC	77
1.6.1 Modelos <i>in vivo</i>	78
1.6.2 Modelos <i>in vitro</i>	83

1.6.2.1	¿Qué es un cultivo celular?	83
1.6.2.2	Condiciones de cultivo y características de crecimiento de un cultivo celular. Viabilidad celular	85
1.6.2.3	Líneas celulares establecidas para el cáncer de mama	88
1.6.2.4	Investigación con células madre del cáncer mamario	92
1.6.2.5	Características de malignidad celular de las BCSC: la transición Epitelial-Mesenquimatoso (EMT)	95
1.6.2.6	Marcadores de BCSC	97
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		101
V. MATERIAL Y MÉTODOS		105
1.	Obtención de la línea celular IPC-366	107
1.1.	Transferencia de células de frascos de cultivo (pase de células)	109
1.2.	Criopreservación	110
1.3.	Curva de crecimiento celular	111
2.	Condiciones de cultivo adherente de la línea celular SUM149	112
3.	Examen morfológico celular	112
4.	Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación del inmunofenotipo de IPC-366	114
4.1.	Valoración de la inmunotinción	117
5.	Procesamiento de muestras para microscopía electrónica	118
6.	Cultivo de células en suspensión (condiciones no adherentes): ensayo de eficacia de formación de mamosferas (MFE)	120
7.	Ensayo de viabilidad celular (MTS Assay)	121
8.	Citometría de flujo	122
9.	Análisis de Western Blot	124

9.1. Determinación de la cantidad total de proteína de los lisados y preparación de la muestra	125
9.2. Gel de electroforesis para la separación de proteínas	126
9.3. Transferencia de proteínas	127
9.4. Inmunodetección	128
9.5. Revelado de membranas	130
10. Ensayos de tumorigenicidad	131
10.1. Animales	131
10.2. Inoculación de las células	132
10.3. Examen histológico de los tumores	133
10.4. Homogeneizados de tumores	134
11. Técnicas EIA	134
11.1. Desarrollo de las técnicas EIA	135
11.1.1. Extracción de hormonas esteroides en muestras de sueros	136
11.1.2. Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida	137
11.1.3. Preparación de las curvas estándar	137
11.1.4. Reacción de competición	138
11.1.5. Tapizado de las placas para el EIA de amplificación	138
11.1.6. Adición del sustrato y del cromógeno	139
11.1.7. Lectura de placas	139
11.1.8. Procesado de los resultados	140
11.2. Parámetros de validación de la técnica EIA	140
12. Análisis estadístico	141
CAPÍTULO I: Establecimiento y caracterización de la nueva línea celular de IMC: IPC-366	145
1. Resumen	147
2. Diseño Experimental	149

Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366	151
CAPÍTULO II: Comparación entre las líneas celulares IPC-366 y SUM149: validación de IPC-366 como buen modelo de estudio de IBC e IMC	169
1. Resumen	171
2. Diseño Experimental	172
Canine cell line, IPC-366, as a good model for the study of inflammatory breast cancer	173
CAPÍTULO III: Determinación del microambiente tumoral de hormonas esteroides en machos y hembras de modelos murinos de xenotrasplantes de líneas celulares de IBC e IMC	189
1. Resumen	191
2. Diseño Experimental	193
Steroid tumor environment in male and female mice model of canine and human inflammatory breast cancer	195
CAPÍTULO IV: Secreción de hormonas esteroides en líneas celulares de IMC e IBC: nuevo estudio de detección mediante un EIA amplificado	202
1. Resumen	205
2. Diseño Experimental	207
Steroid hormone secretion in inflammatory breast cancer cell lines	209
VI. DISCUSIÓN	219
VII. CONCLUSIONES	247
VIII. CONCLUSIONS	251
IX. BIBLIOGRAFÍA	255

LISTA DE ACRÓNIMOS

17βHSD – 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

A4 – Androstenediona.

AJCC – American Joint Committee on Cancer.

ALDH1 – Aldehído deshidrogenasa 1.

ASCO - Sociedad Americana del Cáncer (*American Society of Cancer Oncology*).

ATP – Adenosin trifosfato.

bFGF – Factor de crecimiento fibroblástico básico.

BCSC – Células madre del cáncer de mama (*Breast Cancer Stem Cells*).

BSA – Albúmina de suero bovino.

CCN - CYR61-CTGF-NOV.

CD24, 44, 45, 133, 146, 326 – *Cluster of differentiation* 24, 44, 45, 133, 146, 326.

COX-2 – Ciclooxygenasa 2.

CTC – Células tumorales circulantes (*Circulating Tumor Cells*).

DAB – 3, 3'-diaminobenzidina.

DEAB – Dietilamino-benzaldehído.

DHEA – Dehidroepiandrosterona.

DHT – Dehidrotestosterona.

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

DMEM/F12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12*.

DMSO – Dimetil sulfóxido.

E1SO4 – Sulfato de estrona.

E2 – 17β estradiol.

EGF – Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor*).

- EGFR** – Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*).
- ELC** - Células con características endoteliales (*Endothelial-like cells*).
- EMT** – Transición epitelio-mesenquimatoso (*Epithelial-to-mesenchymal transition*).
- H&E** – Hematoxilina-eosina.
- HBSS** - *Hank's Balanced Salt Solution*.
- HER-2** – Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*Human epidermal Growth Factor Receptor 2*).
- HRP** – Peroxidasa de rábano picante.
- IBC** – Cáncer mamario inflamatorio humano (*Inflammatory Breast Cancer*).
- IHQ** – Inmunohistoquímica.
- IMC** – Cáncer mamario inflamatorio canino (*Inflammatory Mammary Cancer*).
- LDS** – Dodecilsulfato de litio.
- MEM** - *Minimum Essential Medium*.
- MFE** – Ensayo de eficiencia de formación de mamosferas.
- MINO** – *Mammary Intraepithelial Neoplasia Outgrowth*.
- MSC** – Células madre mesenquimatosas (*Mesenchymal Stem Cells*).
- MTS** – (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -5- (fenil 3-carboximetil) -2- (4-sulfofenil) 2H-tetrazolio).
- MTT** – 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diph-enil-2H tetrazolio de bromuro.
- P4** – Progesterona.
- P5** – Pregnenolona.
- PARP** – Poli-ADP-ribosa-polimerasa.
- PBS** – Buffer fosfato salino.

PGE2 – Prostaglandina E2.

PKC – Proteína quinasa C.

PMSF – Fenilmetanosulfonil fluoruro.

PT – Pre-tratamiento.

PVDF – Polifluoruro de vinilideno.

RA – Receptor de andrógenos.

RE – Receptor de estrógenos.

RE β – Receptor de estrógenos β .

RE α – Receptor de estrógenos α .

RhoC GTPasa - Ras homologue gene family, member C guanosine triphosphate.

RP – Receptor de progesterona.

SAS – *Statistical Analysis Systems*.

SCID – Inmunodeficiencia combinada severa.

SDS – Dodecilsulfato sódico.

SFB – Suero fetal bovino.

STS – estrona sulfotransferasa.

T – Testosterona.

TBS – *Tris Buffered Saline*.

TGF- β – *Transforming Growth Factor-Beta*.

TNBC – Cáncer de mama triple negativo (*Triple Negative Breast Cancer*).

VEGF – Factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*).

VEGF-A – Factor de crecimiento vascular endotelial A.

VEGF-C – Factor de crecimiento vascular endotelial C.

VEGF-D – Factor de crecimiento vascular endotelial D.

VEGFR-2 – Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
(*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*).

VEGFR-3 – Receptor 3 del factor de crecimiento del endotelio vascular
(*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3*).

VM – Mimetismo vascular (*Vasculogenic Mimicry*).

WISP3 – Wnt-1 induced secreted protein 3.

XXT – (2,3-bis [4-nitro-5-sulfofenil-2-metoxi] -5 - [(fenilamino) carbonil] hidróxido
2H-tetrazolio

I. RESUMEN

El cáncer de mama humano es el tipo de cáncer más frecuente y la principal causa de muerte en mujeres tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. El cáncer mamario inflamatorio es la neoplasia mamaria más agresiva y de peor pronóstico tanto en la mujer como en la perra. Su prevalencia es muy baja, estimándose entre el 1 y el 6% de todos los cánceres mamarios; es considerado un tipo especial de cáncer mamario con características genéticas, biológicas y clínicas diferentes con respecto al resto de los tumores mamarios. Este tipo de cáncer cursa con la aparición de calor en la mama, eritema, edema y “piel de naranja” y presenta una rápida propagación en ambas especies. Otra de las características distintivas es la presencia de numerosos émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial, junto con un alto potencial angiogénico y linfangiogénico.

La perra ha sido descrita como un buen modelo animal para estudiar el cáncer mamario inflamatorio de la especie humana. Para la investigación en ambas especies, el número de modelos de los que se dispone es limitado. Existen diversas líneas celulares de cáncer mamario inflamatorio como SUM149 o SUM190, además de modelos de xenotrasplantes como Mary-X o WIBC9. Hasta la fecha no se dispone de modelos establecidos *in vitro* de cáncer inflamatorio mamario canino.

Por ello, la presente Tesis Doctoral comprende la realización de cuatro investigaciones, todas ellas basadas en el establecimiento, caracterización y estudio de una nueva línea celular de cáncer mamario inflamatorio canino (IPC-366), con el objetivo principal de constituir esta línea celular como un buen modelo para la investigación del cáncer mamario inflamatorio canino y humano. Tras nuestros estudios IPC-366 goza de patente en España (P201400512) y se

encuentra en tramitación para obtener la patente internacional (WO 2015/197884).

Para el desarrollo de IPC-366 se recogieron muestras de tejido tumoral de una perra diagnosticada de cáncer mamario inflamatorio canino y se aislaron las células neoplásicas *in vitro*, a partir de las cuales se fueron realizando subcultivos hasta establecer finalmente la línea celular. Con el fin de caracterizar la línea celular, se evaluaron sus propiedades de crecimiento, citológicas y ultraestructurales, además de la capacidad tumorigénica y el potencial metastásico *in vivo* así como la determinación de su fenotipo inmunohistoquímico y su patrón cromosómico. Los resultados citológicos revelaron que IPC-366 está formada por células grandes, redondeadas o poligonales caracterizadas por marcadas atipias, con núcleos grandes, de evidente malignidad, nucléolos prominentes y con la aparición frecuente de células multinucleadas. En cuanto al análisis ultraestructural de estas células, se aprecian en algunas de ellas espacios vacíos citoplasmáticos, cubiertos por la membrana citoplasmática, algunas de ellas, con un gran hueco central, se asemejan a células endoteliales capilares, fenómeno que se ha descrito como mimetismo vascular. La caracterización inmunohistoquímica de IPC-366 reveló que se trata de una línea de tipo molecular basal, triple negativa con sobreexpresión de E-cadherina y COX-2 y con un alto índice de proliferación Ki67 (87,15%). Además, IPC-366 es altamente tumorigénica, originando tumores *in vivo* 2 semanas después de la inoculación de las células en ratones hembras SCID y es capaz de metastatizar en pulmón, hígado y ganglios linfáticos. Por otro lado, el análisis citogenético reveló que el 31% de las células presentaba, al menos, una o más anomalías cromosómicas, algunas de las cuales involucraban a los cromosomas X, 12 y 17.

Por lo tanto, la línea celular IPC-366 es una línea celular de tipo basal, triple negativa, altamente maligna y de crecimiento rápido en ratones inmunodeprimidos.

Para poder postular IPC-366 como un buen modelo para el estudio de la enfermedad humana, se comparó esta nueva línea celular canina con la línea celular de cáncer inflamatorio humano SUM149. Dicha comparación se llevó a cabo en términos de capacidad de las células de crecer en condiciones adherentes y no adherentes, expresión del inmunofenotipo por citometría de flujo, la producción de proteínas por técnicas de western blot, además del estudio de la capacidad tumorigénica de ambas líneas celulares, en las dos condiciones de cultivo. Los resultados revelaron que ambas líneas celulares presentan una morfología similar en condiciones adherentes y, además, son capaces de crecer en condiciones no adherentes, formando mamosferas con morfología en forma de racimo. Las células procedentes de los dos sistemas de cultivo también exhibieron un crecimiento rápido *in vivo* generando tumores (IPC-366: 2 semanas; SUM149: 4 semanas), cuya histología es muy similar entre ambas líneas, conservando el fenotipo angiogénico e invasivo característico de la enfermedad. Además, el inmunofenotipo de expresión de marcadores de células madre de IPC-366 y SUM149 es similar, presentando características mesenquimatosas y una sobreexpresión de las proteínas E-cadherina y N-cadherina mayor en los cultivos adherentes que en los no adherentes. Por lo tanto, las líneas celulares IPC-366 y SUM149 comparten muchas características *in vitro* e *in vivo*, por lo que la línea celular IPC-366 puede ser un buen modelo tanto para el estudio de la enfermedad humana como de la canina.

Una vez demostrada la gran capacidad tumorigénica de ambas líneas celulares en ratones hembra inmunodeprimidas, se evaluó esta capacidad en ratones macho y se comparó con la de ratones hembra, además de identificar las diferencias en la producción de hormonas esteroides en los tumores originados en ambos sexos. Se inocularon células de IPC-366 y SUM149 a ratones SCID hembra y macho y se determinaron sus características de crecimiento *in vivo* y las concentraciones séricas e intratumorales de las hormonas esteroides progesterona, sulfato de estrona, estradiol, testosterona y androstenediona. Los resultados revelaron que IPC-366 reproduce tumores en el 90% de los machos, 2 semanas después de ser inoculadas, en comparación con el 100% de las hembras que reproducen el tumor en el mismo tiempo. SUM149 reproduce tumores a las 4 semanas post-inoculación en el 40% de los machos, y en un 80% de las hembras. Ambas líneas celulares ocasionan metástasis a distancia en pulmones, presentando las hembras mayores tasas metastásicas que los machos. En cuanto al análisis hormonal, éste reveló que los tumores originados por los machos presentan mayores concentraciones de testosterona y sulfato de estrona, en comparación con los tumores de las hembras. Por otro lado, los niveles de esteroides en suero de machos y hembras son más bajos que los encontrados en los tumores. Se deduce que los ratones de ambos sexos son capaces de reproducir tumores, presentando un crecimiento tumoral similar y que los niveles hormonales intratumorales son cruciales en el desarrollo y progresión de estas neoplasias.

Se ha descrito que el cáncer mamario inflamatorio canino presenta altas concentraciones intratumorales de hormonas esteroides. Sin embargo, hasta la fecha no se había estudiado si eran las propias células tumorales las que

segregaban dichas hormonas, lo que se podrían demostrar si las células en cultivo eran capaces de sintetizarlas directamente al medio. Por lo tanto, y en último lugar, se validó una técnica de EIA amplificado con alta sensibilidad, fiable y precisa para la detección de las hormonas esteroides progesterona, sulfato de estrona, estradiol, androstenediona y testosterona, en medio de cultivo celular de IPC-366 y SUM149 y se evaluó el perfil de producción de hormonas esteroides de ambas líneas celulares en condiciones *in vitro*. La validación de la técnica se realizó en base a los resultados obtenidos de exactitud, precisión, sensibilidad y paralelismo, demostrando que la técnica es fiable, precisa y sensible. Los coeficientes intra e inter-ensayo son menores del 10% y la tasa de recuperación media de la hormona, añadida al medio de cultivo, es mayor del 90%. En cuanto a los perfiles hormonales de las líneas celulares se observó que, en todas las hormonas estudiadas, SUM149 presenta niveles más altos que IPC-366 (1,4 veces mayor, pero no estadísticamente significativo). Los índices de correlación entre las concentraciones de cada hormona de SUM149 y de IPC-366 son mayores del 97%. Por lo tanto, las líneas celulares IPC-366 y SUM149, en condiciones *in vitro*, son capaces de producir hormonas esteroides que pueden ser cuantificadas mediante la técnica de EIA de amplificación validada en este estudio, lo que supone una herramienta muy valiosa para la detección de la producción de esteroides en medios de cultivo.

Como conclusión, todos estos estudios han demostrado que IPC-366 es una herramienta útil para el estudio comparativo del cáncer mamario inflamatorio canino y humano ofreciéndose la posibilidad futura de realizar ensayos de nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad de tan difícil tratamiento.

II. SUMMARY

Breast cancer is the most frequently diagnosed type of cancer and the leading cause of death in women in both developed and under develop countries. Inflammatory breast cancer (IBC) in women and canine mammary cancer in dogs are the most aggressive types of mammary neoplasia with poor survival in both species. Prevalence of IBC is very low and estimated to be between 1 and 6% of all breast cancers; is considered a special type of breast cancer with genetic, biological and clinical characteristics different from the rest of mammary tumors. This type of mammary cancer occurs with the onset of heat in the breast, erythema, edema and "orange peel or *peau de orange*" appearance that presents a rapid spread in both species. Other distinctive features of this type of mammary cancer include the presence of numerous tumor emboli in lymphatic vessels of the superficial dermis, with the presence of a high angiogenic and lymphangiogenic potential.

The dog has been described as a good animal model for the study of inflammatory breast cancer in humans. For research in both species, the number of models that are available is limited. There are several inflammatory breast cancer cell lines such as SUM149 or SUM190 and xenograft models such as Mary-X or WIBC9. To date, there are no established *in vitro* models of canine inflammatory mammary cancer.

Therefore, this doctoral thesis is conducted by four investigations all based on the establishment, characterization and study of a new cell line of canine inflammatory breast cancer (IPC-366), with the main objective of establishing this cell line as a good research model for study canine and human inflammatory breast cancer. Our studies of IPC-366 were granted a patent in Spain (P201400512), and international patent is pending (WO 2015/197884).

For the development of IPC-366, tumor tissue from a female dog diagnosed with canine inflammatory mammary cancer was collected and neoplastic cells were isolated *in vitro*, from which were made subcultures to establish the cell line. In order to characterize this cell line, growth, cytological, immunohistochemical and ultrastructural characteristics were evaluated in addition to the tumorigenic and metastatic potential *in vivo* of IPC-366 as well as its chromosome pattern. Cytological results revealed that IPC-366 is formed of highly malignant large round or polygonal cells characterized by marked atypia, with large nuclei with prominent nucleoli and the frequent appearance of multinucleate cells. Ultrastructural analysis revealed that some cells had cytoplasmic empty spaces covered by cytoplasmic membrane, some of them, with a large central hole, resembling the morphology capillary endothelial cells, a phenomenon described as vascular mimicry. Indeed, immunohistochemical characterization revealed that IPC-366 is a triple negative basal-like cell line, with overexpression of E-cadherin and COX-2 and a high Ki67 proliferation index (87.15%). In addition, IPC-366 is highly tumorigenic, causing tumors *in vivo* 2 weeks after inoculation of the cells in SCID female mice and have the capacity to metastasize in lung, liver and lymph nodes. Furthermore, cytogenetic analysis revealed that 31% of the cells showed at least one or more chromosomal abnormalities, some of which involving chromosomes X, 12 and 17. Therefore, IPC-366 is a basal triple negative cell line, highly malignant and with rapid growth in immunodeficient mice.

In order to assess whether IPC-366 is a good model for the study of human disease, the new canine cell line was compared with the human inflammatory breast cancer cell line SUM149. This comparison was conducted in terms of

ability of cells to grow in adherent and nonadherent conditions, immunophenotype expression by flow cytometry, protein production by western blot techniques, and the study of the tumorigenic capacity of both lines in both cell culture conditions. The results revealed that both cell lines when cultured under adherent conditions displayed similar morphology whereas growth under nonadherent conditions formed mammospheres with a grape-like morphology. Cells from both culture systems also exhibited rapid growth *in vivo* (IPC-366: 2 weeks; SUM149: 4 weeks), generating tumor whose histology is very similar among cell lines and also retain the angiogenic and invasive phenotype characteristics of the disease. In addition, the immunophenotype of stem cell markers expression of IPC-366 and SUM149 is similar presenting mesenchymal features and an overexpression of E-cadherin and N-cadherin greater in nonadherent cultures than in adherent cultures. Therefore, cell lines IPC-366 and SUM149 share many *in vitro* and *in vivo* characteristics, suggesting that IPC-366 may be a good model for the study of human disease.

Once the great tumorigenic capacity of both cell lines in female immunocompromised mice was demonstrated, this ability was evaluated in male mice and compared with that in female mice as well as to identify differences in the production of steroid hormones by the tumors originated in both genders. Female and male SCID mice were inoculated with IPC-366 and SUM149 cells and their growth characteristics *in vivo* were assessed. In addition, steroid hormone progesterone, estrone sulfate, estradiol, testosterone and androstenedione concentrations were determined in serum and intratumoral samples. The results revealed that IPC-366 cells produced tumors in 90% of male mice 2 weeks after inoculation compared to 100% of female mice that reproduced

the tumor at the same time. SUM149 cells produced tumors 4 weeks post-inoculation in 40% of male mice and in 80% of female mice. Both cell lines caused distant metastases in lungs, with higher metastatic rates in females than in males. Hormonal analysis revealed that the tumors from male mice have higher testosterone and estrone sulfate levels compared with tumors from female mice. Furthermore, serum steroid levels of male mice and female mice were lower than intratumoral levels. It is apparent that mice of both sexes are able to reproduce tumors presenting similar tumor growth characteristics and also intratumoral hormone levels are crucial in the development and progression of these cancers.

It has been described that canine inflammatory mammary cancer show high levels of steroid hormones. However, to date it has not been examined whether these neoplastic cells themselves secrete these hormones, which could be demonstrated if the cells in culture were able to synthesize them directly to the medium. Therefore, an amplified enzyme immune assay (EIA) technique with high sensitivity, reliable and accurate detection of the steroid hormones progesterone, estrone sulfate, estradiol, androstenedione and testosterone was validated for the detection of these hormones in culture media, as well as to evaluate the steroid hormone profile in IPC-366 and SUM149 in *in vitro* conditions. The technique validation was performed based on the results of accuracy, precision, sensitivity and parallelism demonstrating that the technique is reliable, accurate and sensitive. Coefficients of intra- and inter-assay were less than 10% and the average recovery rate of hormone, added to the culture medium, was greater than 90%. Hormonal profiles of the cell lines revealed that in all studied hormones, SUM149 exhibited higher levels than those of IPC-366 (1.4 times higher, but not statistically significant). The correlation index between

the concentration of each hormone in SUM149 and IPC-366 was greater than 97%. Therefore, cell lines IPC-366 and SUM149 in *in vitro* conditions are able to produce steroid hormones which can be quantified by an amplified EIA technique that has been validated in this study, and found to be a great tool for the detection of steroid hormones in culture media.

In conclusion, these studies have shown that IPC-366 is useful for the comparative study of canine and human inflammatory breast cancers, thereby offering the possibility of developing future trials of new therapeutic strategies for this disease that is difficult to treat.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Introducción general del cáncer mamario inflamatorio humano y canino.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte en mujeres. En 2012 se llegaron a diagnosticar 1,7 millones de casos y alrededor de 520.000 muertes, lo que supone un 25% de todos los casos de cáncer diagnosticados y un 15% de todas las muertes en mujeres (Torre *et al.*, 2015).

El cáncer de mama es común tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, representando en estos últimos la mayor causa de muerte en mujeres (Ferlay *et al.*, 2015) debido, probablemente, a los sistemas sanitarios de estos países, en los que la mayoría de las mujeres tienen un difícil acceso al diagnóstico y tratamiento del cáncer (Torre *et al.*, 2015).

A partir del año 2000 se ha observado una disminución en las tasas de incidencia del cáncer de mama en países desarrollados que se ha atribuido, en parte, a la reducción del uso de terapias hormonales sustitutivas en mujeres con síndromes menopaúsicos. Así mismo, la tasa de mortalidad por cáncer de mama en países desarrollados se ha estabilizado debido al avance en los tratamientos y a su detección temprana (Torre *et al.*, 2015).

En la especie canina, sucede algo parecido a la especie humana, los tumores mamarios son las neoplasias más frecuentes en las hembras, suponiendo el 52% de los tumores diagnosticados (Moe, 2001; Salas *et al.*, 2015).

El cáncer inflamatorio es la neoplasia más agresiva y de peor pronóstico tanto en la mujer (Tavassoli, 1999; Mason y Johnson, 2008) como en la perra

(Susaneck *et al.*, 1983; Pérez Alenza *et al.*, 2001; Sleenckx *et al.*, 2011). Aparece con baja frecuencia y es considerado un tipo especial de cáncer mamario con características genéticas, biológicas y clínicas diferentes con respecto al resto de los tumores mamaros (Tavassoli, 1999; Pérez Alenza *et al.*, 2001; Giordano y Hortobagyi, 2003; Peña *et al.*, 2003a; Kim *et al.*, 2011).

El cáncer mamario inflamatorio humano (*Inflammatory Breast Cancer*, IBC) fue descrito por primera vez en el año 1814 por Charles Bell, que lo describió como la presencia en la piel alrededor del tumor de un color violáceo acompañado de un proceso doloroso. A partir de ese momento, el IBC fue designado con diferentes nombres como “síndrome de von Volkmann’s”, “carcinoma mamario agudo” o “mastitis carcinomatosa”, entre otros. En 1924 se acuñó el término de “carcinoma inflamatorio de mama”, gracias a Lee y Tannenbaum, quienes proporcionaron una descripción clínica de la enfermedad (revisado por Anderson *et al.*, 2005; Singletary and Cristofanilli, 2008). Actualmente, se denomina genéricamente cáncer mamario inflamatorio y se distinguen dos presentaciones clínicas de esta enfermedad denominadas primaria y secundaria. El “IBC primario” corresponde a un desarrollo *de novo* del tumor en una mama normal. Por el contrario, el “IBC secundario” es el resultado de cambios inflamatorios en la piel que imitan el aspecto de un IBC primario, en una mama ya alterada previamente por otra neoplasia (Robertson *et al.*, 2010). Estos dos tipos de IBC también se encuentran en la especie canina (Pérez Alenza *et al.*, 2001).

Susaneck y col., en 1983 describieron por primera vez el cáncer mamario inflamatorio en la especie canina (*Inflammatory Mammary Cancer*, IMC). Posteriormente, los trabajos de investigación de Pérez-Alenza y col. (2001) y

Peña y col. (2003) y sucesivos trabajos del grupo, describieron las características epidemiológicas, clínicas y patológicas de este tipo de cáncer, además de estudios de perfil hormonal, genético e inmunohistoquímico (Pérez Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a; Peña *et al.*, 2003b). La investigación en IMC también se ha complementado en los últimos años con trabajos más recientes que hacen referencia a diferencias en expresión génica entre tumores IMC y no-IMC (Millanta *et al.*, 2010; Raposo *et al.*, 2016).

En la actualidad, la descripción de IBC más usada procede del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que lo define como “una entidad clinicopatológica caracterizada clínicamente por la presencia de un edema difuso y eritema de la mama, ocupando la mayor parte de la misma y frecuentemente sin presentar nódulo mamario” (Greene *et al.*, 2002).

La última clasificación histopatológica de los tumores mamarios caninos incluye el IMC como “una entidad clínica caracterizada por un curso clínico fulminante, presentación repentina, firmeza, edema, eritema y calor de las glándulas mamarias, con o sin nódulos mamarios”, que presenta como característica histopatológica la invasión de los vasos linfáticos de la dermis por émbolos neoplásicos (Goldschmidt *et al.*, 2011).

1.1 Epidemiología y pronóstico del IBC e IMC.

La prevalencia del IBC es muy baja, estimándose entre 1 y el 6% de todos los cánceres mamarios (Anderson *et al.*, 2005; Hance *et al.*, 2005). Estos datos varían en función de la zona geográfica. En países como Estados Unidos, la prevalencia de IBC parece ser más alta que en otros países desarrollados (Anderson *et al.*, 2005). En España, la Asociación Española contra el Cáncer

indica que la incidencia del IBC es del 1 al 3% de los casos diagnosticados de cáncer de mama. En la especie canina el IMC es un cáncer poco frecuente, sin embargo la prevalencia es algo mayor que en la especie humana. Se estima en un 7,6% del total de las neoplasias mamarias diagnosticadas (Pérez Alenza *et al.*, 2001).

Además de variaciones geográficas, también existen variaciones raciales en el IBC. Se ha observado que mujeres de raza negra presentan una mayor prevalencia de IBC que mujeres de raza blanca (Hance *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha observado una predisposición racial a padecer IMC en la especie canina (Pérez Alenza *et al.*, 2001).

No obstante, en las últimas tres décadas parece haber aumentado ligeramente la prevalencia tanto del IBC como del IMC (Peña *et al.*, 2003a; Anderson *et al.*, 2005; Hance *et al.*, 2005). Asimismo se ha observado una mayor frecuencia de aparición de IBC en zonas rurales, lo cual se ha asociado con un menor estatus socio-económico además de una mayor tendencia a la lactancia materna (Le *et al.*, 2006).

Por otro lado, la edad media de mayor riesgo de padecer IBC es menor que en otras neoplasias mamarias. En el IBC se encuentra en torno a los 50 años; sin embargo, en otras neoplasias mamarias el mayor riesgo se estima a los 60 años (Anderson *et al.*, 2005). El caso contrario ocurre en la especie canina, donde la edad media a la que aparece el IMC es mayor con respecto a otros tumores mamarios malignos (11,4 años frente a 9,9) (Pérez Alenza *et al.*, 2001). Recientemente, se han descrito 12 casos de IMC en los que la edad media de diagnóstico fue de 10,2 años (De M. Souza *et al.*, 2009).

Los antecedentes familiares de cáncer de mama representan alrededor del 20% de todos los cánceres de mama y son considerados uno de los principales factores de riesgo. Se ha observado, que existe un mayor porcentaje de casos de IBC en mujeres con antecedentes familiares con respecto a otros tumores mamarios (Aziz *et al.*, 2001).

En cuanto a las tasas de supervivencia de pacientes diagnosticadas con IBC, en 2005 se estimaron en 2,9 años, frente a 6,4 años en el caso de tumores mamarios localmente avanzados; por tanto, los pacientes con IBC continúan siendo de pronóstico muy desfavorable (Hance *et al.*, 2005).

Por su parte, en la especie canina el IMC también presenta un pronóstico muy grave, estimándose el tiempo de supervivencia entre 35 y 57 días, en función de si el animal recibe tratamiento quimioterapéutico o paliativo, respectivamente (Clemente *et al.*, 2009). Incluso, se ha descrito que el tratamiento de IMC con piroxicam (un antiinflamatorio no esteroideo que inhibe la actividad de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2) aumenta el tiempo de supervivencia a 183 días (De M. Souza *et al.*, 2009).

1.2 Características clínicas e histopatológicas del IBC e IMC.

El cáncer mamario inflamatorio, tanto en la especie humana como canina, presenta características biológicas que lo diferencian del resto de tumores mamarios (Giordano y Hortobagyi, 2003).

Clínicamente, el IBC se caracteriza por la súbita aparición de calor en la mama, eritema, edema y “piel de naranja” y, a menudo, no se aprecia una masa bien definida (Giordano y Hortobagyi, 2003). Taylor y Meltzer describieron que en el IBC, el enrojecimiento de la piel puede variar desde un

ligero rubor a un rojo encendido, propagándose de forma difusa sobre el pecho, unido a sensación de calor, aspecto edematoso y presentando apariencia de "piel de naranja". Al mismo tiempo, el cáncer se propaga rápidamente por todo el pecho formando un endurecimiento difuso y mal definido, haciendo que el pecho se inflame y alcance dos o tres veces su volumen original en el plazo de unas pocas semanas (Taylor y Meltzer, 1938).

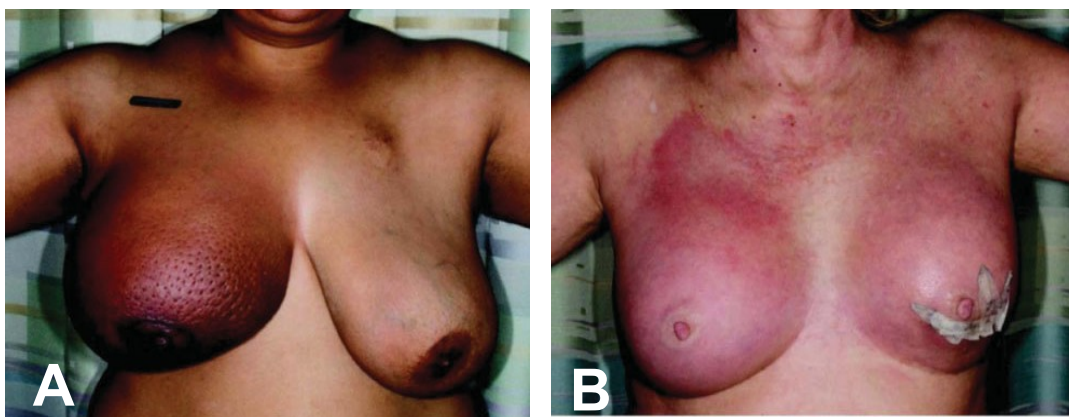


Figura 1: Signos clínicos de IBC. A, manifestación con aumento del tamaño de la mama y edema (piel de naranja). B, manifestación bilateral sincrónica con eritema. Imágenes tomadas de (Robertson *et al.*, 2010).

El IBC puede aparecer de forma bilateral en las dos mamas, asociado con un eritema y cambios en la piel que pueden dar lugar rápidamente a la aparición de nódulos y ulceraciones. No es frecuente detectar una masa palpable en el examen clínico, por lo que las primeras manifestaciones de la enfermedad son el rápido crecimiento de la mama y los cambios de coloración en la piel. Además, puede aparecer retracción o endurecimiento del pezón, sin embargo éste no es considerado un criterio de diagnóstico (Singletary y Cristofanilli, 2008; Robertson *et al.*, 2010).



Figura 2: Mama con IBC donde se muestra el pezón invertido. Imagen tomada de International Mycotherapy Institute. <http://www.imispain.com/>.

La presencia de afectación ganglionar es una pieza fundamental para clasificar al paciente y proporciona información importante para el pronóstico. En el caso del IBC, entre el 55 y el 85% de las mujeres que lo padecen presentan metástasis en los ganglios linfáticos axilares y supraclaviculares al diagnóstico (Robertson *et al.*, 2010).

Por su parte, el IMC también aparece de forma brusca con la aparición de edema, eritema, aumento de temperatura y sensación de dolor (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez Alenza *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Perez-Alenza y col. (2001) se observó que, en todos los casos, las perras presentaban múltiples glándulas mamarias afectadas, pudiendo también presentar edema en la parte proximal de las extremidades. Por otro lado, se observó una afectación de los linfonódulos axilares e inguinales, además de una infiltración severa en el tejido muscular y en el adiposo en la mayoría de los casos. En cuanto a la aparición de metástasis, la metástasis pulmonar fue la más frecuente. Un estudio más reciente que compara los patrones de metástasis de tumores IMC y no-IMC revela que las perras con IMC metastatizan en vejiga

urinaria y en el tracto reproductivo; sin embargo, éstos no metastatizan en hueso y la metástasis en pulmones, hígado y riñón es menos frecuente que en perras con tumores no-IMC (Clemente *et al.*, 2010a).

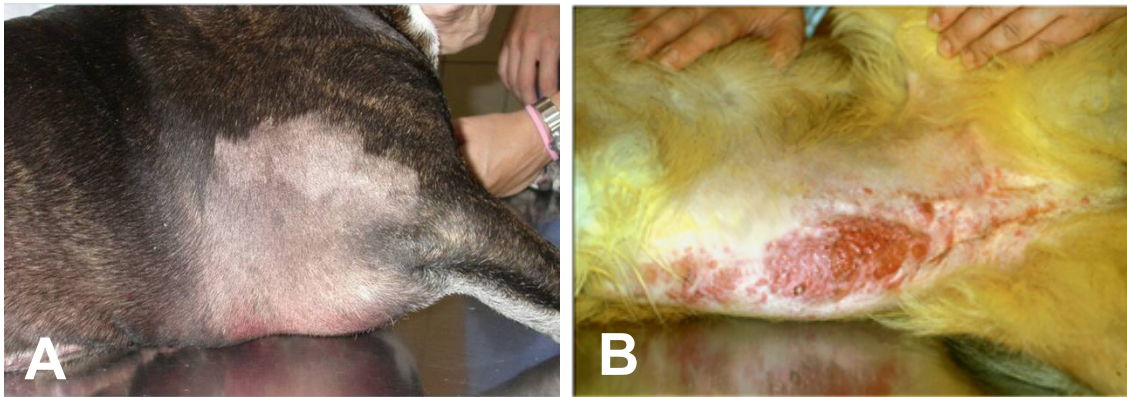


Figura 3: Signos clínicos de IMC. A, marcado edema y eritema en región mamaria y en extremidad. B, IMC secundario, con presentación de edema y marcado eritema (Camacho, 2011).

La característica histopatológica más importante para el diagnóstico de IBC e IMC y que los distingue del resto de tumores mamarios malignos, es la presencia de numerosos émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial (Tavassoli, 1999; Pérez Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a; Robertson *et al.*, 2010; Clemente *et al.*, 2013). En el IBC, las células que componen los émbolos son, normalmente, de un alto grado nuclear y de fenotipo ductal. En ambas especies, la obstrucción del drenaje linfático por los émbolos tumorales causa los signos clínicos de edema y eritema (Robertson *et al.*, 2010). Con frecuencia, los vasos linfáticos que no presentan émbolos tumorales suelen aparecer dilatados (linfangiectasias) (Peña *et al.*, 2003a; Robertson *et al.*, 2010).

Aunque el IBC no está asociado con un subtipo histológico específico, a menudo es de tipo ductal infiltrativo con alta malignidad histológica (Robertson *et al.*, 2010). En el IMC también encontramos varios tipos histológicos: cánceres simples, cánceres ricos en lípidos, cánceres de células escamosas y cánceres complejos, todos ellos de elevada malignidad histológica (Peña *et al.*, 2003a).

Una de las características más relevantes de IBC e IMC es su alto potencial linfangiogénico y linfangioinvasivo (Kleer *et al.*, 2000; Clemente *et al.*, 2010b). El IBC primario está asociado con una invasión linfática prominente y presenta un elevado grado de malignidad histológica, con células tumorales pleomórficas y figuras mitóticas atípicas (Kleer *et al.*, 2000), al igual que el IMC, donde se ha observado que las células presentan un elevado índice mitótico con mitosis atípicas (Peña *et al.*, 2003a).

Además de las vías angiogénicas asociadas con la migración endotelial, la proliferación, y la organización para formar nuevos vasos, impulsadas principalmente por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y sus receptores, los tumores IBC e IMC presentan fenómenos semejantes a angiogénesis a partir de células tumorales, en los que se forman *de novo* estructuras semejantes a vasos que permitirían el flujo de oxígeno y nutrientes en ausencia de células endoteliales.

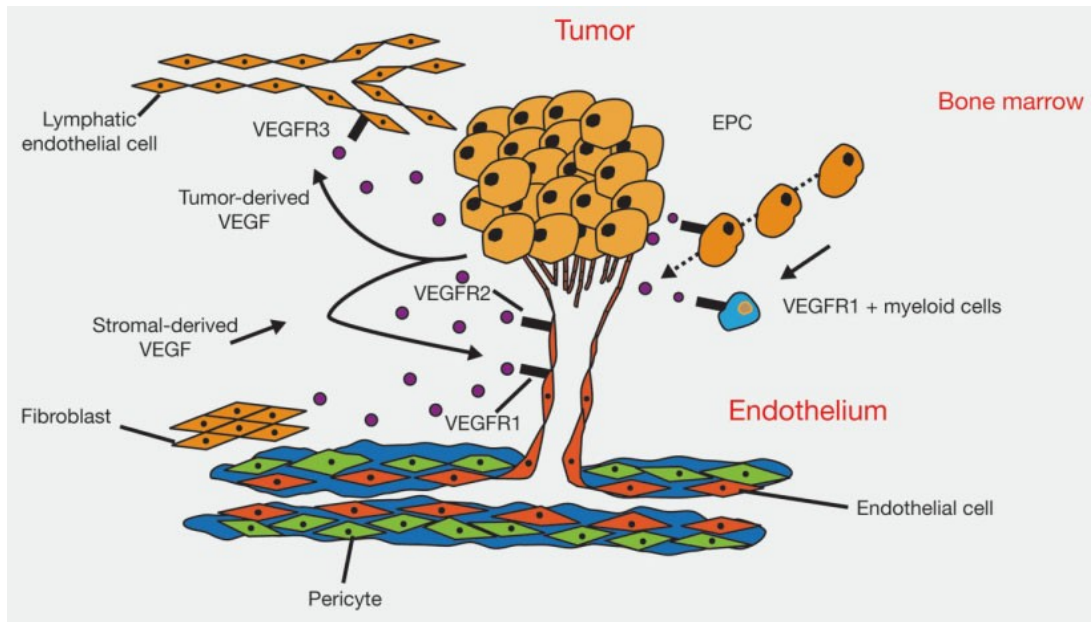


Figura 4: Esquema de angiogénesis tumoral. El modelo muestra el papel del VEGF en la angiogénesis tumoral a partir de células endoteliales. Imagen tomada de Hicklin y Ellis, 2005.

La capacidad de las células tumorales para formar estructuras similares a tubos se define como mimetismo vascular (VM, *Vasculogenic mimicry*) y fue descrita por primera vez en personas con melanoma (Maniotis *et al.*, 1999).

La VM es una característica importante de tumores muy agresivos con plasticidad fenotípica (Robertson *et al.*, 2010). Se ha observado que la VM se da más frecuentemente en este tipo de neoplasias, tanto en IBC como en IMC, con respecto a otros tumores mamarios (Shirakawa *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2010b).

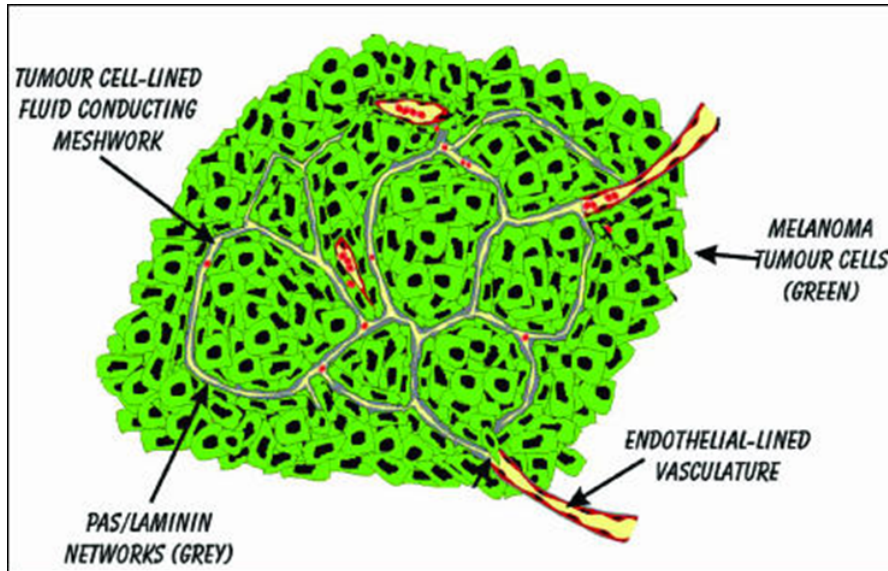


Figura 5: Esquema de mimetismo vascular. Imagen tomada de Dome *et al.*, 2007.

1.3 Producción de hormonas esteroideas en el cáncer de mama y sus receptores.

Las glándulas mamarias normales y neoplásicas son consideradas por algunos autores un tejido endocrino, sobre todo en virtud de la síntesis de estrógenos y andrógenos (Vermeulen *et al.*, 1986; Killinger *et al.*, 1987; Blankenstein *et al.*, 1999; Liao y Dickson, 2002). La acción de los estrógenos y andrógenos es crucial en el crecimiento neoplásico y en la progresión del cáncer de mama, debido a su interacción con receptores específicos (Birrell *et al.*, 1998; Liao y Dickson, 2002).

Algunos autores han observado que en los tumores mamarios caninos existe una gran concentración de hormonas esteroideas (Peña *et al.*, 2003b; Illera *et al.*, 2006), así como en la especie humana (Labrie *et al.*, 2003), donde además se ha visto que los estrógenos y andrógenos producidos por el tumor,

actúan en los tejidos sin ser liberados al torrente sanguíneo (Suzuki *et al.*, 2007).

Según algunos autores (Peña *et al.*, 2003b; Sánchez-Archidona *et al.*, 2007) las abundantes gotas lipídicas que se observan histológicamente en el citoplasma de las células tumorales del IMC, podrían corresponderse con la síntesis de hormonas esteroideas y así contribuir al comportamiento agresivo del IMC mediante la elevada producción de estrógenos.

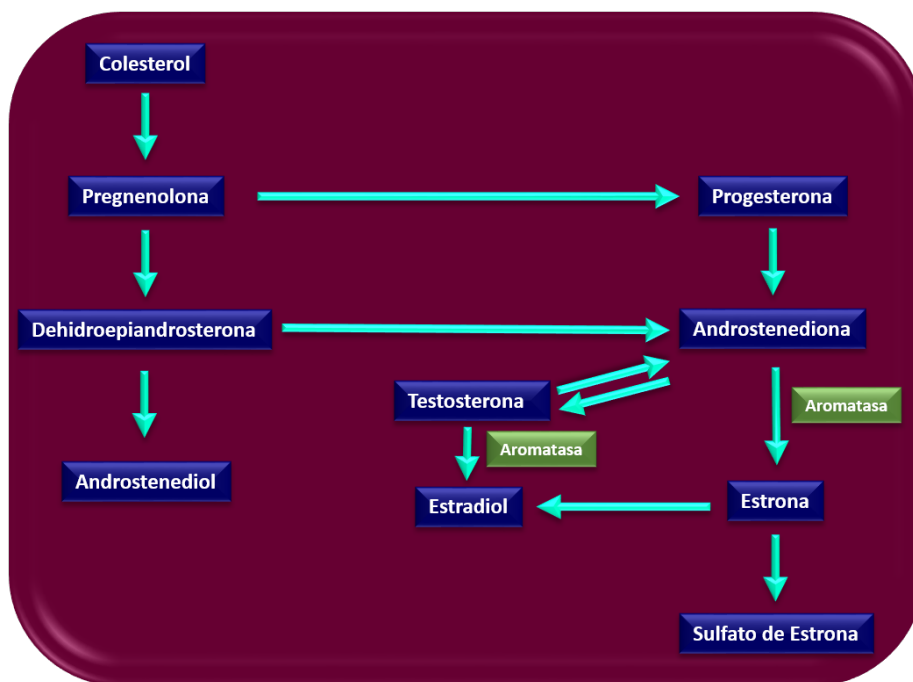


Figura 6: Esquema de cascada esteroidogénica.

Todos los esteroides endógenos derivan del colesterol. Precisamente, el primer paso en la producción de esteroides consiste en la conversión del colesterol en pregnenolona (P5) catalizada por la enzima P450_{scc} (CYP11A1) (Kristensen y Borresen-Dale, 2000). La P5 es la hormona precursora de todas las demás hormonas esteroideas (Grigoryev *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los tumores IMC presentan una alta expresión inmunohistoquímica de la

enzima P450_{scc} en las células del estroma y en células adiposas (Peña *et al.*, 2003b). Al igual que los de la especie canina, los tumores humanos de IBC también expresan esta enzima (Sasano *et al.*, 1994).

La hormona P5 conduce a la producción de dehidroepiandrosterona (DHEA) y progesterona (P4) por dos vías diferentes, ambas catalizadas por diferentes enzimas (Labrie, 2015). Estas dos hormonas son las precursoras inmediatas de los estrógenos, como el sulfato de estrona (E1SO₄) y el 17β estradiol (E2), y los andrógenos como la androstenediona (A4) y la testosterona (T). Esta conversión se produce en la glándula adrenal y en el ovario, pero no en la mama (Labrie *et al.*, 2003; McNamara y Sasano, 2015). En el cáncer mamario, se ha propuesto que la vía de DHEA es la precursora principal para la producción de andrógenos y estrógenos (Labrie, 2015; McNamara y Sasano, 2015). En el siguiente esquema, se muestra la cascada esteroideogénica para la producción de las hormonas sexuales en el cáncer mamario.

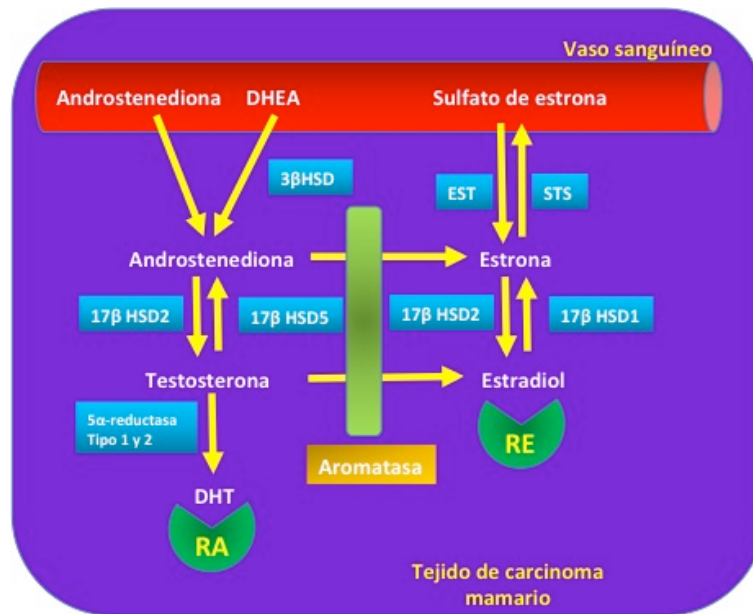


Figura 7: Esquema de la biosíntesis de esteroides en el cáncer mamario. Enzimas y precursores implicados en la producción de andrógenos y estrógenos. Basado en imagen de Suzuki *et al.*, 2007.

1.3.1. Progestágenos

La P4 juega un papel esencial en el desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad y la gestación además de estar involucrada en los cambios proliferativos que ocurren en el ciclo menstrual, el embarazo y la lactancia (Anderson, 2002; Wiebe, 2006). Sin embargo, su función en la carcinogénesis no está muy estudiada (Wiebe, 2006), aunque niveles altos de P4 incrementan el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria (Mol *et al.*, 1999).

Pasqualini (2009) observó que los progestágenos podían reducir los niveles intratisulares de estrógenos, como E2, en el cáncer mamario humano mediante el bloqueo de la actividad de las enzimas 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) y sulfatasa. Además, en la especie canina, se han

encontrado unos niveles de P4 más elevados en tumores mamarios que en tejido mamario normal (Peña *et al.*, 2003b).

La progresión tumoral puede estar relacionada con cambios en los niveles de P4. Se ha propuesto que la producción de esta hormona por parte del tejido tumoral de lugar a ciertos metabolitos, de los cuales unos tendrían funciones estimuladoras de la proliferación celular mientras que otros, por el contrario, la inhibirían (Wiebe, 2006). Una de las enzimas que cataliza la conversión de la P4 a metabolitos como los 5 α -pregnanos, es la enzima 5 α -reductasa. En los tumores mamarios existe una gran cantidad de 5 α -pregnanos, por lo que se cree que la actividad de la enzima 5 α -reductasa debe de ser más elevada que la de otras enzimas involucradas en la conversión de la P4 a otros metabolitos (Wiebe *et al.*, 2000).

1.3.2. Estrógenos

Diversos estudios han descrito que existen elevadas concentraciones de estrógenos en tumores de mama (Chetrite *et al.*, 2000). Los estrógenos circulantes son secretados, principalmente, por el ovario en mujeres premenopaúsicas, sin embargo la mayoría de los tumores mamarios surgen después de la menopausia, una vez que los ovarios dejan de ser funcionales (Suzuki *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los estrógenos causan la regulación positiva de oncogenes, tales como c-myc, c-fos y c-jun, lo cual conduce a la estimulación de la proliferación de células de cáncer mamario (Kristensen y Borresen-Dale, 2000).

En los tejidos tumorales mamarios, tanto humanos como caninos, se ha indicado que las concentraciones de E2 son significativamente más elevadas que en la glándula mamaria normal (Chetrite *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2003b).

Además, el E2 puede influir en la mitogenicidad de las células mamarias positivas al receptor de estrógenos (RE), regulando los niveles de estrógenos y, por lo tanto, la progresión de la neoplasia mamaria (Shyamala *et al.*, 2002). De la misma forma, también nos encontramos altas concentraciones de E1SO4 en los tejidos tumorales, los cuales se piensa que pueden representar un reservorio para la formación de estrógenos biológicamente activos (Pasqualini *et al.*, 1996; Illera *et al.*, 2006).

Existen dos vías principales para la formación de E2, uno de los estrógenos más potentes, en los tejidos de cáncer de mama: la vía de la aromatasa (Lipton, 1987), mediada por la enzima CYP19-aromatasa que transforma los andrógenos en estrógenos, y la vía de la sulfatasa que convierte la estrona (E1) en E1SO4 mediante la enzima estrona sulfotransferasa (STS). Esta hormona (E1) se convierte a su vez en E2 por la enzima 17 β HSD (Shibuya *et al.*, 2008; McNamara y Sasano, 2015). Sin embargo, la secreción local de las hormonas esteroides por las células tumorales está poco estudiada.

Se ha sugerido que, la conversión de andrógenos en estrógenos por la ruta de la aromatasa, puede ser un posible mecanismo por el cual los andrógenos estimulan la proliferación de las células tumorales mamarias (Baglietto *et al.*, 2010). La actividad de la enzima aromatasa determina los niveles de estrógenos locales (Kristensen y Borresen-Dale, 2000). Además, su expresión en el cáncer mamario es elevada y, por tanto, su inducción puede provocar una sobreproducción de E2 que estimula la progresión del tumor (Catalano *et al.*, 2009).

Otros autores indican, sin embargo, que la actividad de la vía de la sulfatasa es mayor que la vía de la aromatasa (Pasqualini *et al.*, 1996). Algunos estudios *in vitro* con la línea celular MCF-7 han señalado que estas células tumorales son capaces de bloquear su propia biosíntesis de estradiol mediante la inhibición de la conversión de E1SO₄ a E2 (Pasqualini y Chetrite, 2001).

1.3.3. Andrógenos

La hormona dehidrotestosterona (DHT) es el andrógeno antiproliferativo más potente para células MCF-7 (Macedo *et al.*, 2006) y se une con alta afinidad al receptor de andrógenos (RA). La T es la hormona encargada de promover la actividad transcripcional del RA (Hanamura *et al.*, 2013). Por otro lado, en el tejido mamario normal, la producción de andrógenos está mediada principalmente por dos enzimas: la 17 β HSD y la 5 α -reductasa, cuyas acciones combinadas generan T y DHT, así como la unión a su receptor afín, RA (McNamara *et al.*, 2014). Además, se demuestra que la presencia de estas enzimas androgénicas en los tumores de mama está asociada con una menor capacidad invasiva de los tumores triple negativos (McNamara *et al.*, 2014).

Sin embargo, el efecto de los andrógenos sobre el tejido mamario es más complejo y todavía no se ha podido dilucidar su papel. Estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que los andrógenos también pueden ejercer un efecto antiproliferativo y de apoptosis (Baglietto *et al.*, 2010). Algunos estudios revelan que los andrógenos ejercen efectos inhibitorios en las células del cáncer de mama hormono-dependientes (McNamara *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha observado que la DHT inhibe la proliferación celular en células de cáncer de mama (Ando *et al.*, 2002). Además, en los carcinomas mamarios positivos al RE, se ha demostrado que los andrógenos presentan un papel supresor de la

proliferación celular; sin embargo, existen controversias sobre la acción de los andrógenos en los cánceres de mama triple negativos (TNBC, *Triple Negative Breast Cancer*) (Hickey *et al.*, 2012). Por otra parte, diversos estudios indican que los andrógenos regulan la expresión del protooncogen bcl-2, ejerciendo un efecto inhibitor sobre la proliferación de células de cáncer de mama (Lapointe *et al.*, 1999). De hecho, se ha demostrado que el tratamiento con andrógenos regula la actividad 17 β HSD y 5 α -reductasa en líneas celulares triple negativas (McNamara y Sasano, 2015).

También se ha postulado que los andrógenos actúan como un posible factor carcinógeno en cáncer de mama. Esta propuesta se basa principalmente en el hecho de que la incidencia de cáncer de mama es relativamente alta en las mujeres post-menopáusicas, cuando los niveles androgénicos son altos (Secreto *et al.*, 1991). Este hecho se corrobora con un estudio en mujeres japonesas, que presentan un menor riesgo de cáncer de mama comparado con las mujeres estadounidenses o británicas, debido a que las mujeres japonesas tienen niveles de andrógenos en plasma inferiores (Hill *et al.*, 1985). Además, la administración de andrógenos en la enfermedad quística de la mama ha demostrado que aumenta el riesgo de cáncer (Veronesi y Pizzocaro, 1968). Como ya se ha comentado, los andrógenos median el crecimiento celular a través de la aromatización de T a E2 en las células epiteliales de cáncer de mama (Jensen *et al.*, 2003), estimulando la proliferación celular como en el caso de la línea celular MCF-7 (Sonne-Hansen y Lykkesfeldt, 2005). Recientemente, varios estudios han evidenciado que existe una fuerte relación entre los niveles plasmáticos de T y el cáncer de mama (Dorgan *et al.*, 1997).

Todos estos hallazgos epidemiológicos, proporcionan indicios que relacionan los andrógenos con la carcinogénesis del cáncer de mama.

1.3.4. Receptores de hormonas esteroides

En las últimas dos décadas, los mecanismos moleculares relacionados con tumores de mama hormono-dependientes han sido ampliamente investigados y el papel del receptor de estrógenos y el receptor de progesterona (RP) en el desarrollo de cáncer de mama ha sido muy estudiado.

El mecanismo clásico de la carcinogénesis de los estrógenos describe la unión de los mismos a su receptor nuclear específico, RE α , para formar un complejo que estimula la proliferación celular mediante el aumento de la producción de factores de crecimiento (Mangelsdorf *et al.*, 1995). La detección de expresión de los RE y RP se lleva a cabo de forma rutinaria para el diagnóstico de tumores mamarios humanos (Wu *et al.*, 2015). Sin embargo, en los tumores mamarios caninos la detección de estos receptores no es una forma de diagnóstico, aunque varios estudios relacionan la expresión de RE con el pronóstico (Nieto *et al.*, 2000; Illera *et al.*, 2006; Sorenmo *et al.*, 2011). En tumores IBC es muy frecuente encontrar una ausencia de expresión de RE y RP (Van Laere *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2010). En la especie canina, un estudio revela que el 87% de tumores IMC son negativos a la expresión de RE (Clemente *et al.*, 2009). Sin embargo, existe alrededor de un 73% son positivos a RP asociando esta expresión a la presentación secundaria de la enfermedad (Peña *et al.*, 2003a; Clemente *et al.*, 2009). Por otro lado, en otro estudio de 19 casos de IMC no se encontró ninguno con expresión de RE o RP (Millanta *et al.*, 2010).

Sin embargo, existen pocos estudios acerca de la expresión y función del receptor de estrógenos β (RE β) en el cáncer mamario humano, aunque se ha propuesto que la utilización de los estrógenos podría estar mediada por el RE β , ya que el RE α no presenta expresión en muchos tumores mamaros, tanto en la especie canina como en la humana (Illera *et al.*, 2006; Russo y Russo, 2006). En líneas celulares de IBC como SUM149 o SUM190 se ha encontrado una gran expresión de RE β (Ohshiro *et al.*, 2012). Además, se ha observado un aumento en la inmunexpresión del RE β en tejidos de IMC con respecto a otros tipos de tumores mamaros malignos, aunque no se han encontrado diferencias en la expresión del receptor de estrógenos α (RE α) (Illera *et al.*, 2006).

El papel de los andrógenos y el RA en la carcinogénesis del tejido mamario sigue siendo poco clara (Garay y Park, 2012). Se sugiere que este receptor debe estar implicado en la patogénesis y progresión del cáncer de mama y, también, se relaciona con el pronóstico (Tang *et al.*, 2012).

La expresión del RA en el cáncer de mama se asocia con un mejor pronóstico y una respuesta favorable al tratamiento endocrino, en particular para los cánceres de mama RE+ (Kotsopoulos y Narod, 2012). Por ello, las acciones de los andrógenos son de gran interés en la investigación del cáncer mamario (McNamara *et al.*, 2013). Aunque se ha demostrado una relación entre RA y ambos RE y RP en cáncer mamario humano, un porcentaje significativo de los tumores son positivos para el RA y negativos para el RE y el RP (Esfahlan *et al.*, 2011).

El RA se expresa en aproximadamente el 70% a 90% de los cánceres de mama invasivos, una frecuencia mayor comparable con la encontrada para RE

(70-80%) y RP (50-70%) (Esfahlan *et al.*, 2011; McNamara *et al.*, 2013; Cochrane *et al.*, 2014). Además, se han descrito varias líneas celulares de cáncer de mama como T47D y MCF-7 que expresan el RA (Kimura *et al.*, 1994).

En cuanto a la expresión de RA en IBC e IMC existen escasos estudios. Recientemente, un estudio de RA en IBC describe que este receptor está expresado en el 39% de los casos, de los cuales, el 42,6% resultaron ser tumores triple negativos a la expresión de receptores hormonales y del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 o *human epidermal growth factor receptor 2*) (Gong *et al.*, 2014). En el caso de IMC, se ha encontrado que existe una mayor expresión de RA en tumores IMC que en los tumores no-IMC (Illera *et al.*, 2006; Sánchez-Archidona *et al.*, 2007). Además, la inmunoexpresión del RA en IMC, se ha descrito en células infiltrantes altamente malignas y en las células metastásicas (Illera *et al.*, 2006; Clemente *et al.*, 2009).

1.4 Bases moleculares de IBC e IMC.

La histopatología y la clínica del IBC han sido descritas en numerosas citas de la literatura científica. Sin embargo, hasta hace poco, no se han podido estudiar las bases moleculares de esta enfermedad, enfocando las investigaciones, sobre todo, al estado de los receptores hormonales así como a las mutaciones del gen p53 (Kleer *et al.*, 2000). En la actualidad, disponemos de más información sobre las características moleculares que contribuyen al fenotipo “inflamatorio”.

1.4.1. Clasificación molecular

El cáncer mamario humano se clasifica de forma ya clásica en subtipos específicos en función de la presencia o ausencia de expresión de los receptores RE, receptores de progesterona (RP), HER-2 y de la presencia de marcadores de células basales (Perou *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2010; Holliday y Speirs, 2011). De esta forma, podemos clasificar los tumores mamarios en 4 tipos distintos (Tabla 1) (Holliday y Speirs, 2011).

Clasificación	Expresión de Receptores	Otras características
Luminal A	RE + ; RP +/- ; HER-2 -	Ki67 bajo
Luminal B	RE+ ; RP +/- ; HER-2 +	Ki67 alto
Basal	RE - ; RP - ; HER-2 -	Ki67 alto, EGFR+, CK 5/6 +
HER-2	RE - ; RP - ; HER-2 +	Ki-67 alto

Tabla 1: Clasificación molecular de los subtipos de tumores mamarios según el estado de expresión de los receptores hormonales, además del índice de proliferación celular (ki67) y de la expresión de otros marcadores como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o epidermal growth factor receptor) o citoqueratinas (CK).

Generalmente los tumores IBC suelen ser de tipo basal aunque puede presentar cualquier combinación de receptores hormonales (Robertson *et al.*, 2010). Un estudio estimó que un 44% de los tumores IBC eran positivos al RE, un 30% de los mismos positivos al RP (Paradiso *et al.*, 1989), y alrededor de un 40% de los IBC sobreexpresaban HER-2 (Prost *et al.*, 1994).

La clasificación molecular no está tan definida en los tumores mamarios caninos ya que los resultados entre los autores son controvertidos (Im *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2014). Aunque sí se ha analizado la expresión de receptores hormonales (Peña *et al.*, 2003b; Illera *et al.*, 2006; De Andrés *et al.*, 2016).

Sin embargo, mediante estudios moleculares basados en la expresión génica de cDNA, y con la ayuda de perfiles inmunohistoquímicos de expresión de receptores de hormonas, HER-2, y proteínas de la diferenciación de células basales, se han identificado 5 subtipos de cáncer mamario canino: luminal A, luminal B, HER-2, basal y tumores con expresión normal; siendo los de peor pronóstico los carcinomas basales (Gama *et al.*, 2008; Sassi *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2014). En la especie canina se observó que el subtipo molecular más frecuente era el subtipo luminal A, seguido del basal, luminal B y HER-2 (Gama *et al.*, 2008). Sin embargo, recientes estudios describen al subtipo luminal B como el subtipo molecular más frecuente en tumores mamarios caninos (Sassi *et al.*, 2010; Im *et al.*, 2014; Figueroa *et al.*, 2015).

1.6.1.1 Cáncer de mama triple negativo (TNBC).

Los TNBC constituyen entre el 10 y el 20% de todos los cánceres de mama. Su denominación deriva de tumores caracterizados por la ausencia de expresión de los receptores RE, RP y HER-2. Este tipo de cáncer afecta con mayor frecuencia a pacientes más jóvenes en el caso de mujeres afroamericanas (Morris *et al.*, 2007; Foulkes *et al.*, 2010; Lehmann *et al.*, 2011). Estos tumores son generalmente de mayor tamaño, son de mayor grado de malignidad, afectan a los ganglios y son biológicamente muy agresivos. A pesar de tener mayores tasas de respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante, los pacientes con TNBC tienen una mayor tasa de recidiva y un

peor pronóstico. Menos del 30% de las mujeres con este tipo de cáncer sobreviven más de 5 años (Lehmann *et al.*, 2011).

Uno de los primeros hallazgos moleculares en TNBC fue la probabilidad de que estos tumores surgieran en mujeres portadoras de mutaciones del gen BRCA1. Este gen desempeña un papel importante en la reparación del ADN, lo que contribuye al mantenimiento de la estabilidad de éste (Lehmann *et al.*, 2011). Más del 75% de los tumores que surgen en las mujeres con una mutación en este gen tienen un fenotipo triple negativo y/o un fenotipo basal (Foulkes *et al.*, 2010).

Debido a que la mayoría de los TNBC también son cánceres de mama de tipo basal (aproximadamente el 80%), se ha afirmado que ambos fenotipos son sinónimos; sin embargo, técnicas de microarray e inmunohistoquímicas muestran que este no es el caso. Entre un 18-40% de los cánceres de tipo basal no presentan un fenotipo triple negativo en el análisis inmunohistoquímico. Del mismo modo, los TNBC abarcan además del fenotipo basal otros subtipos moleculares de cáncer de mama (Foulkes *et al.*, 2010). En 2011, Lehman y col. analizaron los perfiles de expresión génica de muestras tumorales de TNBC identificando 6 subtipos de TNBC que se resumen en la siguiente tabla (Tabla 2).

Subtipo de TNBC	Características
Basal 1	Mayores niveles de expresión de genes implicados en proliferación celular. Con mutaciones en BRCA1.
Basal 2	
Inmunomodulador	Elevada expresión de moléculas relacionadas con la señalización del sistema inmune.
Mesenquimatoso	Expresión de genes implicados en transición epitelio-mesenquimatoso. Con propiedades de células madre.
Mesenquimatoso característico de células madre	
Luminal RA	Elevada expresión de citoqueratinas y RA.

Tabla 2: Subtipos de TNBC por identificación de perfiles de expresión génica descritos por Lehman y col. (2011).

En el caso del IBC, alrededor del 20 al 40% de los casos son TNBC donde se presentan de manera no predominante los 6 subtipos de TNBC descritos (Masuda *et al.*, 2013).

En los tumores mamarios caninos también existen neoplasias que son negativas o basales. En un estudio realizado en TNBC caninos se estableció que el 75,6% de los tumores estudiados eran positivos a más de dos marcadores basales (citoqueratina 14, citoqueratina 5/6, p63 y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o *epidermal growth factor receptor*)), lo que podría interpretarse como una indicación de que la mayoría de los tumores triple negativos poseía un fenotipo basal. Sin embargo, aún se desconoce si estos fenotipos se pueden diferenciar entre sí (Kim *et al.*, 2013).

Los pacientes con TNBC no responden a los tratamientos de terapia hormonal a base de trastuzumab debido a la ausencia de los receptores diana ER, PGR, y HER-2. Por lo tanto, la cirugía y la quimioterapia, individualmente o en combinación, parecen ser las únicas modalidades disponibles. Sin embargo, algunos estudios han identificado ciertos receptores como dianas para nuevos fármacos terapéuticos, por ejemplo, receptores de superficie celular tales como EGFR y c-Kit, que se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la progresión de estos tumores (Foulkes *et al.*, 2010; Reddy, 2011).

Tratamientos como el cisplatino, el etopósido, la bleomicina o la radiación ionizante pueden controlar la proliferación celular e inducir la muerte celular de las células tumorales. La utilización de estos tratamientos en TNBC se basa en la disfunción de BRCA1. Por otro lado, las enzimas poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) son críticas para el procesamiento adecuado y la reparación de roturas de ADN. Los inhibidores de PARP1 anulan eficazmente la capacidad de las células neoplásicas de repararse y causan su muerte. Diversos estudios han observado que los inhibidores de la PARP1 podrían proteger contra la nefrotoxicidad del cisplatino o la cardiotoxicidad de la doxorubicina, lo que podría ayudar a proporcionar eficacia al tratamiento quimioterapéutico (Lehmann *et al.*, 2011; Reddy, 2011).

Aproximadamente el 66% de tumores TNBC presentan una sobreexpresión de EGFR. Por ello, se están investigando tratamientos con anticuerpos anti-EGFR como el cetuximab (Reddy, 2011).

Se desconoce la proporción de IMC que son triple negativos.

1.4.2. Gen supresor tumoral p53

Otras de las características a destacar de los tumores IBC e IMC es que incluyen una alta expresión del gen supresor tumoral p53, y la sobreexpresión del EGFR (Kleer *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2013; Queiroga *et al.*, 2015). En un estudio de pacientes con IBC (Riou *et al.*, 1993) se observó una asociación entre la expresión nuclear de p53 y un mal pronóstico de la enfermedad. Aquellos pacientes que presentaban una mutación en el gen p53 y una sobreexpresión nuclear de la proteína p53, tenían un riesgo 8 veces mayor de fallecer. Por otra parte, al analizar la expresión del RE de estos pacientes, se encontró que el grupo de pacientes con RE negativo y sobreexpresión nuclear de p53 tenía 18 veces mayor riesgo de fallecer. Por lo tanto, el estado de expresión de p53 es un indicador de la supervivencia del paciente (Riou *et al.*, 1993; Kleer *et al.*, 2000). En la especie canina, también se han detectado casos de IMC con inmunoexpresión de la proteína p53, especialmente en los IMC primarios que son aún más agresivos que los IMC secundarios (Peña *et al.*, 2003a).

1.4.3. Genes RhoC y Wisp3

En 1999, Van Golen y col. identificaron dos genes cuya expresión estaba alterada en casos de IBC: una sobreexpresión del gen RhoC GTPasa (*Ras homologue gene family, member C guanosine triphosphate*) y la ausencia de expresión del gen WISP3 (*WNT-1 induced secreted protein 3*). WISP3 es un miembro de la familia de proteínas CCN (proteínas de señalización intercelular cuyas siglas derivan de las primeras proteínas descritas CYR61, CTGF y NOV), implicada en la carcinogénesis. En IBC, WISP3 presenta funciones inhibitoras de la angiogénesis y la proliferación celular, contribuyendo así a su

fenotipo invasivo (Kleer *et al.*, 2002). Por su parte, la RhoC GTPasa es un miembro de la superfamilia Ras de GTPasas. La activación de las proteínas Rho da lugar al ensamblaje de los filamentos contráctiles de actina-miosina en complejos de adhesión focal que facilitan la polaridad y la motilidad celular (Wu *et al.*, 2010). Diversos estudios *in vitro* sugirieron que el efecto de RhoC podría ser modulado por la expresión de WISP3, mediante la alteración de los patrones de angiogénesis y proliferación tumoral, de modo que ambos genes actúan coordinados contribuyendo al fenotipo agresivo de IBC (Kleer *et al.*, 2004). Sin embargo, la expresión de RhoC y WISP3 no se ha estudiado en IMC.

1.4.4. Ciclooxygenasa-2 (COX-2)

COX-2 es una enzima que cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, expresada en tejidos inflamados y neoplásicos y cuya expresión se induce a través de factores de crecimiento, estímulos inflamatorios o determinados oncogenes (Howe, 2007). Estudios *in vitro* utilizando líneas celulares de IBC describen que COX-2 contribuye al fenotipo invasivo y angiogénico de IBC (Van der Auwera *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2010). La sobreexpresión de esta proteína y la aparición de niveles elevados de su producto enzimático, la prostaglandina E2 (PGE2), es una de las características de los tumores mamarios invasivos y detectable en las primeras etapas de la carcinogénesis (Parrett *et al.*, 1997). Otro papel que desempeña COX-2 es la regulación de la enzima aromatasa la cual, a su vez, regula la producción de estrógenos. Además se ha observado que COX-2 también interactúa con los receptores HER-2 y EGFR (Robertson *et al.*, 2010).

Sin embargo, la investigación de COX-2 en el cáncer se centra sobre todo en su relación con la angiogénesis. Además de encontrar una correlación significativa entre la expresión de COX-2 y factores angiogénicos como el VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) (Costa *et al.*, 2002; Angelo y Kurzrock, 2007), se ha sugerido que la sobreexpresión de esta enzima por parte de las células neoplásicas da lugar a PGE₂, la cual estimula la expresión de genes regulatorios de la angiogénesis resultando en un aumento de la densidad microvascular y la progresión tumoral (Chang *et al.*, 2004).

Por otro lado, COX-2 también regula los procesos de VM, haciendo que las células que sobreexpresan esta enzima se diferencien en canales vasculares (Basu *et al.*, 2006). Se ha observado que COX-2 regula la expresión de VEGF mediante la activación de la proteína quinasa C (PKC) en diversas células tumorales. Esta activación y el aumento de expresión de PGE₂ por parte de las células tumorales que sobreexpresan COX-2 sería un posible mecanismo para mediar la formación de VM (Luo *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2015).

En la especie canina, se ha asociado la expresión de COX-2 al desarrollo de metástasis a distancia, una menor tasa de supervivencia y un peor pronóstico de la enfermedad (Queiroga *et al.*, 2005a; Queiroga *et al.*, 2010). Además también se ha observado que existe una relación entre la expresión de COX-2 y VEGF en tumores mamarios caninos (Queiroga *et al.*, 2011). En el IMC se ha encontrado una mayor expresión de COX-2 con respecto a otros tumores mamarios malignos, lo que sugiere que esta proteína adquiere un papel esencial en este tipo de cáncer, probablemente estimulando el proceso de angiogénesis (Queiroga *et al.*, 2005a; Clemente *et al.*, 2009; Camacho *et al.*,

2014). Además, se ha observado que la expresión de COX-2 en tumores mamarios malignos caninos está asociada con el factor vascular VEGF-A; sin embargo, en el caso del IMC esta expresión se asocia con el factor VEGF-D (Clemente *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2014). Al igual que el IBC, en la especie canina también se ha encontrado una fuerte expresión de COX-2 en células ELC relacionando ésta enzima con el fenómeno de VM (Clemente *et al.*, 2013).

1.4.5. Adhesión celular: E-Cadherina

Cabe destacar en la biología de IBC e IMC la sobreexpresión de la glicoproteína E-cadherina, presente en los tumores de IBC, en concreto en los émbolos tumorales, además de en las células tumorales circulantes (*Circulating tumor cells*, CTCs) (Kleer *et al.*, 2001; de Andrés *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2010). Esta sobreexpresión también se ha encontrado en casos de IMC, particularmente, en los émbolos tumorales de los vasos linfáticos. La expresión de E-cadherina se asocia con el fenotipo normal de células mamarias, mientras que la pérdida de expresión de E-cadherina es un fenómeno que se ha descrito como imprescindible para que se produzca la transición epitelial-mesenquimatosa (*Epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT), fenómeno asociado con la progresión tumoral y la metástasis (Klopp *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2010). Charafe-Jauffret y col. (2004) determinan que la expresión de E-cadherina es una de las moléculas clave del "fenotipo inflamatorio" en IBC. De la misma forma, sugieren que la pérdida de expresión de E-cadherina asociada a la EMT, es un evento transitorio que permite a las células malignas invadir los canales vasculares y los tejidos y, una vez en la

circulación, las células cancerosas vuelven a expresar E-cadherina, lo que facilita la adhesión intercelular y permite la formación de émbolos tumorales.

Otra proteína involucrada en la adhesión celular es la glicoproteína MUC1, perteneciente a la familia de las mucinas. Su ausencia de expresión hace que se pierda la unión entre las células tumorales y las células endoteliales, lo que facilita la diseminación de los émbolos tumorales. La sobreexpresión de E-cadherina y la disfuncionalidad de MUC1 pueden contribuir al fenotipo metastásico del IBC (Alpaugh *et al.*, 2002). Sin embargo, la implicación de MUC1 en IMC no ha sido estudiada hasta la fecha.

1.4.6. Factores angiogénicos y linfangiogénicos.

Se ha demostrado que los tumores IBC e IMC presentan altos niveles de expresión de múltiples factores asociados con la angiogénesis y la linfangiogénesis como el VEGF-A y VEGF-D (Peña *et al.*, 2003a; Van der Auwera *et al.*, 2004). Aunque el papel principal de VEGF-A en las células tumorales es su implicación en los procesos de angiogénesis en tumores malignos, también se ha sugerido que este factor está implicado en la linfangiogénesis, induciendo la formación de vasos linfáticos (Mohammed *et al.*, 2007).

Tanto en IBC como en IMC se ha encontrado una elevada expresión de los factores VEGF-C y VEGF-D en comparación con otros tumores malignos (Van der Auwera *et al.*, 2004; Clemente *et al.*, 2013).

El receptor 3 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR-3, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3*) es la proteína más importante implicada en el proceso de linfangiogénesis en estas neoplasias. Esta proteína se activa mediante la unión a VEGF-C o VEGF-D y de esta forma, favorece la

formación de nuevos vasos linfáticos (Vermeulen *et al.*, 2010; Clemente *et al.*, 2013).

1.5 Tratamiento de IBC e IMC.

Aunque los avances en la lucha contra el cáncer de mama se basan, sobre todo, en terapias anti-estrogénicas y anti-aromatasa, gracias a su eficacia en el tratamiento del cáncer de mama RE positivo, las opciones terapéuticas para casos triple negativos son muy limitadas. Las terapias dirigidas hacia el RA podrían ser un tratamiento útil para una gran proporción de los cánceres de mama como el IBC y el IMC. Distintos tratamientos como la flutamida, un inhibidor del RA, han demostrado que reducen la proliferación y el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama y en modelos *in vivo* (Naderi *et al.*, 2011). Estudios previos han demostrado que los pacientes tratados con exemestano (un inhibidor de aromatasa) mostraron bajas concentraciones intratumorales de E2 y altas concentraciones de T y DHT, lo que sugiere que este tratamiento inhibe el crecimiento tumoral gracias al bloqueo de la conversión de andrógenos a estrógenos (Takagi *et al.*, 2010). Por lo tanto, la disponibilidad de terapias contra el RA, desarrolladas para el tratamiento del cáncer de próstata, podría alterar las vías androgénicas en el cáncer de mama triple negativo (McNamara *et al.*, 2014).

Sin embargo, en el tratamiento del IBC se recomienda aplicar una terapia multimodal consistente en quimioterapia sistémica, seguida de cirugía, radioterapia y, en su caso, tratamiento adyuvante. Debido a la rareza de la enfermedad, no existe un tratamiento quimioterapéutico estandarizado. Por ello, varios ensayos retrospectivos en pacientes con IBC han explorado la

eficacia de los tratamientos de quimioterapia que se usan para tratar otros tumores mamarios (Robertson *et al.*, 2010).

La quimioterapia sistémica consiste en un tratamiento con antraciclinas y taxanos. Un estudio de pacientes con IBC que recibieron un régimen quimioterapéutico basado en antraciclinas seguido de cirugía y radioterapia, dio como resultado unas tasas de supervivencia a los 5 y 10 años del 44% y 33%, respectivamente (Baldini *et al.*, 2004). Si además de las antraciclinas se incluye un tratamiento con taxanos como el paclitaxel, se encuentran tasas de respuesta patológica completa más altas y una mayor supervivencia (Cristofanilli *et al.*, 2004). Este mismo tratamiento fue utilizado en pacientes con IBC y metástasis en ganglios linfáticos axilares, observándose que, las mujeres que tuvieron una respuesta patológica completa en los ganglios linfáticos axilares presentaron una tasa de supervivencia global mejor (82,5%) y de supervivencia libre de enfermedad (78,6%), que pacientes con enfermedad axilar residual (Hennessy *et al.*, 2006).

Además de la quimioterapia, se pueden emplear otros compuestos antes del tratamiento de elección (tratamiento neoadyuvante), generalmente quirúrgico o después del mismo (terapia adyuvante). La utilización de terapias adyuvantes de tipo hormonal para el IBC no mejora la supervivencia de esta enfermedad de forma global ya que la mayor parte de los tumores son negativos a los receptores hormonales. Sin embargo, las pacientes con tumores positivos a receptores hormonales, son tratadas con terapia hormonal adyuvante con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa (Giordano y Hortobagyi, 2003).

Otras terapias adyuvantes utilizadas en el tratamiento de IBC son aquellas dirigidas contra la proteína HER-2, como por ejemplo el anticuerpo trastuzumab. Las mujeres con IBC positivo a HER-2 tratadas con trastuzumab, en combinación con una quimioterapia sistémica, presentan una mejor respuesta y mayores tasas de supervivencia (Robertson *et al.*, 2010). Lapatinib es un inhibidor de la tirosina quinasa asociada al mecanismo de acción de los receptores EGFR y HER-2. Se ha demostrado su eficacia como neoadyuvante en un ensayo clínico con tumores IBC positivos a HER-2 con resultados similares a los obtenidos con trastuzumab (Boussen *et al.*, 2010).

Además de estos tratamientos, que se emplean en el cáncer mamario en general, están surgiendo nuevas estrategias terapéuticas dirigidas (terapias diana) frente a proteínas que se sobreexpresan de forma característica en el IBC como son RhoC GTPasa, WISP3 o VEGFA. Así, se ha desarrollado un tratamiento inhibidor de la farnesil transferasa que modula la expresión de RhoC GTPasa que aún requiere una mayor investigación a nivel clínico (Robertson *et al.*, 2010). El bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra VEGFA, fue evaluado en un ensayo piloto en combinación con los quimioterápicos doxorubicina y docetaxel, y se observó que la tasa de respuesta global fue del 67%, además de una disminución en los niveles del receptor de VEGF-A (VEGFR-2, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) de las células tumorales, lo que llevó a plantearse que esta terapia no sólo puede tener un efecto antiangiogénico, sino también un efecto antitumoral directo a través de VEGFR-2 (Wedam *et al.*, 2006). En cuanto a la cirugía en pacientes con IBC, en general nunca es el primer tratamiento que se realiza; se suele llevar a cabo una mastectomía radical, donde se extirpa la mama entera,

así como los nódulos linfáticos axilares. Después de esta cirugía es recomendable un tratamiento radiológico para evitar posibles recidivas (Dawood *et al.*, 2011).

En la especie canina, el IMC supone el único tipo de neoplasia mamaria en la que la cirugía no se recomienda (Susaneck *et al.*, 1983) y se suele proceder al tratamiento paliativo mediante la administración de antiinflamatorios y antibióticos (en su caso) seguido de la eutanasia humanitaria del animal (Pérez Alenza *et al.*, 2001). Sin embargo, se han realizado estudios en perras con IMC administrando un tratamiento quimioterápico constituido por mitoxantrona, sola o en combinación con vincristina y ciclofosfamida, además de la terapia paliativa. De esta forma, se comprobó que los animales tratados con este protocolo presentaban un mayor tiempo de supervivencia media (57 días) respecto a los animales a los que sólo se les había administrado un tratamiento paliativo (35 días). Aunque la quimioterapia aumenta la supervivencia de los animales con IMC, ésta sigue siendo muy inferior a la observada en animales con tumores mamarios malignos no-IMC (Clemente *et al.*, 2009; Ness, 2009).

1.6 Modelos experimentales en la investigación de IBC e IMC.

Los modelos experimentales más utilizados en la investigación del cáncer de mama son tanto los modelos *in vivo*, útiles para evaluar nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer, como los modelos *in vitro*, empleados para mejorar el conocimiento de la genética y la biología de las células tumorales.

1.6.1 Modelos *in vivo*.

El desarrollo de modelos animales para el estudio del cáncer de mama ha sido una herramienta muy útil para mejorar nuestra comprensión de la progresión tumoral y metástasis en las últimas décadas (Ruggeri *et al.*, 2014).

Por lo general, los roedores son los animales empleados en investigación del cáncer de mama, especialmente los ratones debido a su pequeño tamaño, su facilidad de reproducirse y, la posibilidad de ser modificados genéticamente (de Jong y Maina, 2010). El éxito de estos modelos se debe al profundo conocimiento que se tiene de su biología mamaria (en cuanto a desarrollo o aparición de tumores espontáneos), además de la cantidad de genes promotores que se han caracterizado en esta especie, pudiendo introducir o eliminar genes mediante técnicas de ingeniería genética (Borowsky, 2003). Sin embargo, ciertos tipos de tumores mamarios no pueden ser validados en modelos murinos, puesto que no reproducen con precisión las características de ese tipo de tumor, como por ejemplo, el cáncer de mama positivo a RE (Cardiff *et al.*, 2004).

En las últimas décadas, la ingeniería genética nos ha permitido obtener dos modelos de gran utilización en la investigación del cáncer de mama: los ratones transgénicos y los ratones knockout. Los modelos transgénicos presentan una expresión de oncogenes específicos ajenos a su genoma (Fantozzi y Christofori, 2006). Los modelos transgénicos más utilizados en la investigación del cáncer mamario son los Erbb2 y MINO (*mammary intraepithelial neoplasia outgrowth*), empleados sobre todo en investigación de mecanismos moleculares (Namba *et al.*, 2004). Los modelos *knockout* se generan genéticamente haciendo que carezcan de la expresión de un gen

específico (Fantozzi y Christofori, 2006), como los modelos Tp53 que carecen de la expresión del gen p53, o modelos *knockout* para genes supresores de tumores como el Rb, E-cadherina o BRCA1 y BRCA-2 (Jerry *et al.*, 2000; Moynahan, 2002).

Además de los modelos modificados genéticamente, también se emplean ratones inmunodeprimidos a los cuales se les trasplantan las células tumorales.



Figura 8: A.- Ratón Fox Chase SCID (CB17/Icr-Prkdcscid/IcrlcoCrl); B.- Ratón BALB/c Nude (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl). Imágenes tomadas de Charles River (www.criver.com).

Los ratones “nude” (atímicos) y SCID (inmunodeficiencia combinada severa) son los roedores más utilizados para realizar este tipo de intervenciones denominadas xenotrasplantes, las cuales podemos definir como un trasplante de un material biológico a un hospedador de diferente especie de la que procede el material integrado, en este caso células neoplásicas (Borowsky, 2003; de Jong y Maina, 2010).

Las ventajas de utilizar modelos de xenotrasplantes en investigación son numerosas: muchos de estos modelos son reproducibles; son fácilmente disponibles y el número de animales a utilizar es estadísticamente válido. Sin embargo, también presentan desventajas como un coste de mantenimiento elevado, el componente del estroma de los tumores es de origen murino, los animales están inmunodeprimidos y, la mayor parte del tiempo, los tumores se

implantan en un lugar del huésped que no coincide con la localización original del tumor primario (Teicher, 2006).

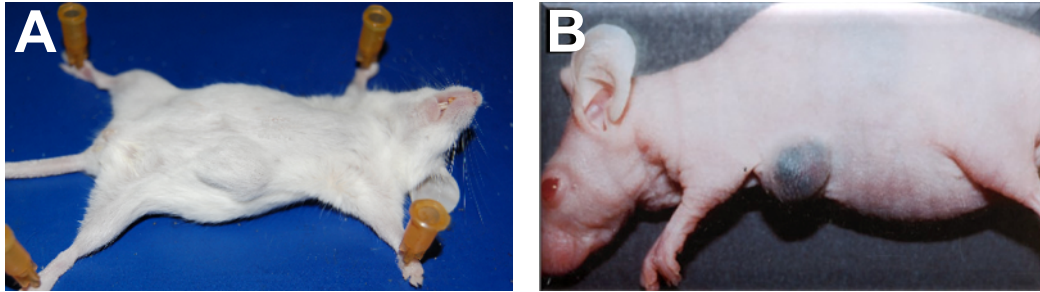


Figura 9: A.- Ratón SCID con tumor inoculado subcutáneamente en la cadena mamaria (Imagen tomada de Camacho, 2011). B.- Modelo Murino de WIBC-9 (Imagen tomada de Shirakawa *et al.*, 2001).

Para el buen desarrollo de los modelos experimentales en investigación del cáncer de mama, es necesario establecer qué cepa de ratones es conveniente utilizar además de la localización donde se generará el tumor y el tipo de inoculación que se tiene que llevar a cabo. El tumor o las células tumorales se pueden inyectar en el animal, ya sea de forma ectópica (por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular) o de forma ortotópica (en la cual la inoculación se realiza en el sitio original del tumor primario) (de Jong y Maina, 2010; Ruggeri *et al.*, 2014). Los modelos experimentales desarrollados para la investigación del cáncer de mama suelen ser, generalmente, xenotrasplantes ectópicos conseguidos mediante inoculaciones subcutáneas o intravenosas, y los ortotópicos, que se llevan a cabo mediante la inoculación de células tumorales en la grasa mamaria o *mammary fat pad* (MFP) (Ruggeri *et al.*, 2014).

Los modelos de xenotrasplantes ectópicos son simples de realizar, reproducibles, y presentan una tasa de crecimiento e histología del tumor homogénea. Por ello, este tipo de xenotrasplantes se utiliza ampliamente en estudios sobre nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer. En los modelos de xenotrasplantes ortotópicos el tumor crece en el tejido de origen del tumor primario, lo cual implicaría que las células proliferan en su microambiente original. Sin embargo, la manipulación quirúrgica necesaria para realizar este tipo de xenotrasplantes es a menudo compleja, por lo que el número de animales utilizados inicialmente en estos estudios es superior al teóricamente necesario ya que puede haber bajas derivadas de complicaciones tras la cirugía y su recuperación (de Jong y Maina, 2010; Ruggeri *et al.*, 2014).

Una de las desventajas de todo biomodelo surge cuando el crecimiento del tumor, la biodistribución y sus posibles metástasis son difíciles de monitorizar. Por ello, se han desarrollado técnicas moleculares de imagen a tiempo real que nos permiten observar el desarrollo tumoral (Teicher, 2006).

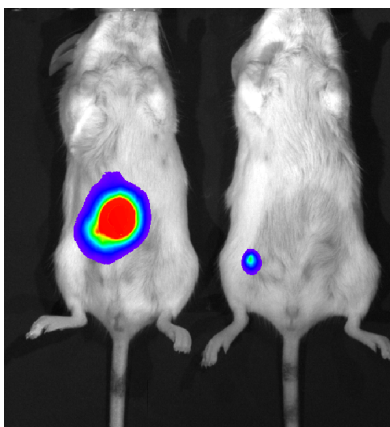


Figura 10: Imagen por bioluminiscencia de ratones SCID con tumores de IMC (Caceres *et al.*, 2015).

Por ejemplo, la técnica de captación de imágenes por bioluminiscencia ha sido desarrollada recientemente para la detección y la observación del crecimiento del tumor primario y la metástasis *in vivo*. Esta técnica se basa en

la inoculación enzimas emisoras de luz, tales como la luciferasa, que actúan como fuente interna de luz y, a la vez, se puede detectar externamente (Jenkins *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2008).

Existen modelos de xenotrasplantes muy utilizados para la investigación del IBC como MARY-X y WIBC-9 originados gracias al implante de tejidos obtenidos de biopsias de IBC y caracterizados en cuanto a la expresión de receptores hormonales, HER-2, p53 y factores angiogénicos entre otros (Alpaugh *et al.*, 1999; Shirakawa *et al.*, 2001). MARY-X que es RE-, RP-, HER-2-, p53+ y EGFR+, es el único modelo de IBC que simula la presentación clínica de este tipo de tumor en modelos murinos, además de mostrar un fenotipo de intravasación linfático (Alpaugh *et al.*, 1999; Agollah *et al.*, 2014). Por su parte, WIBC-9 es un modelo *in vivo* que se ha empleado para la investigación de VM, puesto que sus neoplasias contienen esta característica (Shirakawa *et al.*, 2003).

Para la investigación del cáncer mamario en la especie canina también se dispone de modelos animales, ya sea mediante inoculación de líneas celulares tumorales caninas en ratones inmunodeprimidos (Kawabata *et al.*, 2006; Gentshev *et al.*, 2009), o trasplantes de tumores primarios (Yamashita *et al.*, 2001). De la misma forma, la investigación del IMC también se ha llevado a cabo en modelos animales establecidos. Recientemente, nuestro grupo (Camacho *et al.*, 2013) ha caracterizado un modelo de ratones inmunodeprimidos trasplantados ectópicamente con tumores primarios de IMC canino. Los tumores desarrollados resultaron ser altamente agresivos, presentando una de las características principales de IMC e IBC como es la

presencia de émbolos tumorales en la dermis superficial; en este caso el fenotipo tumoral fue RE+, RP+, y HER-2-.

1.6.2 Modelos *in vitro*.

La técnica del cultivo celular nos permite conocer el comportamiento *in vitro* de las células cancerosas. Los cultivos celulares nos proporcionan una fuente ilimitada de células con capacidad de autorreplicación, que crecen fácilmente en medios de cultivo estándar y libres de contaminación de células del estroma (Lacroix y Leclercq, 2004).

Los primeros cultivos celulares de los que se dispone información datan de 1907, cuando se cultivó por primera vez un coágulo linfático de médula espinal de anfibio. Sin embargo, hasta principios de la década de los setenta no se depura la técnica de cultivo celular siendo entonces cuando se produce una desbordante irrupción de publicaciones cuyos resultados se basan en la utilización de cultivos celulares. Sin ir más lejos, los principales conocimientos *in vitro* que tenemos sobre el cáncer de mama se basan en esta técnica (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003).

1.6.2.1 ¿Qué es un cultivo celular?

El cultivo celular puede definirse como la técnica mediante la cual es posible mantener células o fragmentos de tejidos de un organismo pluricelular en situación de aislamiento (Gil-Loyzaga, 2011).

Los cultivos preparados directamente a partir de tejidos son los denominados cultivos primarios. Las células de estos pueden recuperarse de la placa de cultivo y utilizarse para formar un gran número de otros cultivos, denominados cultivos secundarios. De este modo las células pueden ser subcultivadas repetidamente durante semanas o meses. Los cultivos primarios

habitualmente son heterogéneos y de crecimiento lento, pero son más representativos del tejido original del que derivan, ya que expresan muchas de las propiedades del mismo. A pesar de que todas las células de una línea celular son muy similares entre sí, a menudo no son idénticas. Los subcultivos de una línea celular pueden originar una línea celular finita si acaban perdiendo número de células y se extinguen. Por el contrario, las células en cultivo pueden presentar una viabilidad indefinida con una proliferación mantenida y dar lugar a una línea celular continua (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003; Gil-Loyzaga, 2011).

En ocasiones, si se mantiene en un cultivo bajo unas condiciones adecuadas, alguna de estas células sufre algún cambio genético que la hace realmente inmortal y prolifera indefinidamente (célula variante inmortal); de esta forma, se constituye una línea celular. Las líneas celulares en cultivo tienen gran interés ya que permiten obtener grandes cantidades de células del mismo tipo con propiedades metabólicas, inmunológicas y morfológicas específicas y, además, se pueden conservar en nitrógeno líquido a -180°C durante un período indefinido de tiempo, siendo perfectamente viables una vez descongeladas (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003; Gil-Loyzaga, 2011).

Las líneas celulares continuas, o inmortales, normalmente presentan alteraciones citomorfológicas características, como un menor tamaño celular, menor adherencia, morfología más redondeada, mayor relación núcleo/citoplasma y, sobre todo, un incremento en la tasa de proliferación celular, una reducción del tiempo de doblaje, menor dependencia de suero en el medio de cultivo y más facilidad para crecer en suspensión (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003).

1.6.2.2 Condiciones de cultivo y características de crecimiento de un cultivo celular. Viabilidad celular.

El medio de cultivo constituye el medio extracelular de las células en cultivo y contiene los nutrientes necesarios para la proliferación celular. Para cultivos rutinarios es frecuente utilizar medios líquidos que contienen sales, glucosa, aminoácidos, vitaminas y, muchas veces, se suplementan con suero de caballo o suero fetal bovino, entre otros. Generalmente, es necesario adicionar a estos medios algunas proteínas como la insulina o factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor* o EGF) que estimulan la proliferación. Por otro lado, estos medios también suelen complementarse con antibióticos (como la penicilina y la estreptomicina) y antimicóticos (como la anfotericina B) para prevenir una posible contaminación del cultivo por crecimiento de bacterias u hongos (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003; Gil-Loyzaga, 2011).

Los cultivos se realizan y se mantienen en recipientes especiales de plástico o de vidrio, denominados “flasks”, que presentan una superficie preparada de forma que permite la adhesión de las células. Estos recipientes con las células en cultivo se conservan en una estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003; Gil-Loyzaga, 2011).

Toda línea celular se ajusta a un patrón común de evolución y crecimiento constituido por 4 fases: LAG, LOG (crecimiento logarítmico), Plateau y de envejecimiento o senescencia (Figura 4). La elaboración de estas curvas de crecimiento permite conocer el desarrollo celular, la velocidad de crecimiento y

las características fisiológicas de cada tipo celular. Las distintas fases de una curva de crecimiento *in vitro* se caracterizan por (Gil-Loyzaga, 2011):

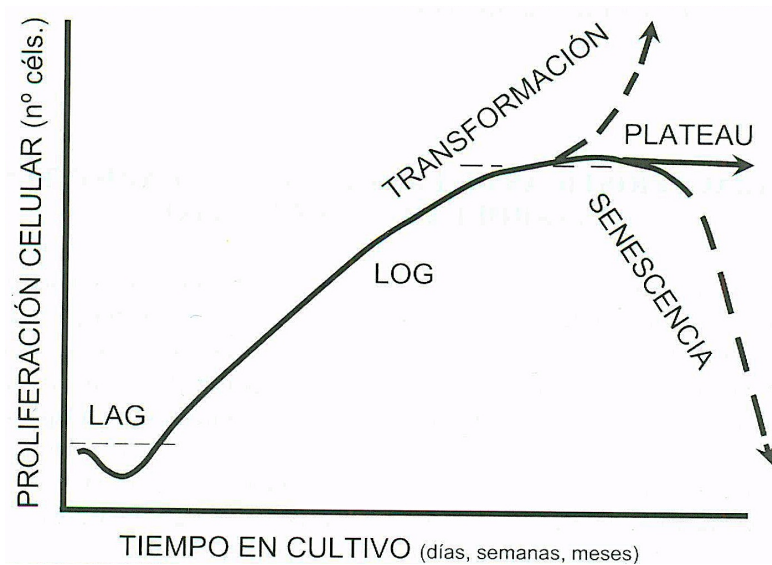


Figura 11: Curva modelo de crecimiento de células en cultivo. Imagen tomada de Gil-Loyzaga (2011).

FASE LAG: Esta fase es de corta duración, comienza con el cultivo de las células y finaliza cuando el número de células es ligeramente superior al número inicial. Se caracteriza por presentar, en primer lugar, un cierto porcentaje de muerte celular y una pérdida de diferenciación celular. En esta fase las células sufren un proceso denominado adaptación celular, por el cual las células se adaptan a las condiciones de cultivo.

FASE LOG: Una vez que las células se han adaptado a las condiciones de cultivo, comienza una fase de intensa proliferación. Esta fase recibe su nombre por el crecimiento logarítmico que desarrollan las células y, permite conocer la capacidad de crecimiento de las

células en cultivo, además de establecer el ritmo de alimentación del cultivo. Esta es la fase adecuada para despegar las células del frasco de cultivo (mediante métodos enzimáticos) con el fin de realizar subcultivos.

FASE PLATEAU: Las células continúan proliferando y ocupan prácticamente toda la superficie de cultivo, estableciendo una monocapa de células continua en la que las células están muy próximas unas a otras (situación denominada coalescencia). En esta fase, cuando las células entran en contacto con las células vecinas comienzan a disminuir su ritmo de proliferación, lo que se denomina inhibición por contacto.

FASE DE ENVEJECIMIENTO O SENESCENCIA: Si no se realizan subcultivos, las células comienzan a acumular radicales libres y a envejecer para acabar con el proceso de muerte celular.

En los últimos años, los ensayos con cultivos celulares están siendo muy utilizados como una alternativa al uso de animales. Además, se emplean en el cribado de un gran número de productos químicos, para observar su citotoxicidad. También se han utilizado en tratamientos de quimioterapia para seleccionar un fármaco, así como su dosis (Tominaga *et al.*, 1999). Para ello es necesario medir la proliferación celular con diversos métodos, como los basados en el recuento directo de células viables, la medición de la actividad metabólica y el contenido de ADN celular. Los métodos tradicionales de recuento de células se basan sobre todo en los ensayos con azul de tripán, en los cuales las células no viables se tiñen con este compuesto y mediante el uso de un hemocitómetro se realiza el recuento celular de las células no teñidas y,

por tanto, viables. Este tipo de ensayos son simples y baratos; sin embargo, consumen mucho tiempo y a veces son inexactos (Kanemura *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010a).

Por otro lado, la medición de la captación de [³H]timidina es un método común para evaluar la viabilidad celular, aunque requiere instalaciones especiales además de producir residuos radiactivos. Otros compuestos no radiactivos utilizados para ensayos de viabilidad celular colorimétricos son, el rojo neutro, el cristal violeta y las sales de tetrazolio que tiñen las células en diferentes localizaciones (Webb *et al.*, 1967). El compuesto 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diph-enil-2H tetrazolio de bromuro (MTT) ha sido el más empleado para los ensayos de viabilidad, ya que produce un color intenso tras su reducción en la célula y forma un compuesto denominado formazán. El MTT, sin embargo, presenta la desventaja de que el formazán obtenido es extremadamente insoluble en agua, formando depósitos que dañan las células (Mosmann, 1983). Se vio la necesidad de encontrar un compuesto que produjera el mismo efecto que el MTT y además fuera soluble en agua. Por ello, actualmente se utilizan las sales de tetrazolio acuosas como el MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -5- (fenil 3-carboximetil) -2- (4-sulfofenil) 2H-tetrazolio) o el XXT (2,3-bis [4-nitro-5-sulfofenil-2-metoxi] -5 - [(fenilamino) carbonil] hidróxido 2H-tetrazolio), muy utilizadas en investigación para la medición de la viabilidad celular (Tominaga *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2010a).

1.6.2.3 Líneas celulares establecidas para el cáncer de mama.

Para la investigación del cáncer de mama humano se dispone de una amplia variedad de líneas celulares obtenidas directamente de pacientes o a través de animales de experimentación. Aunque ciertos investigadores cultivan

líneas propias no comercializadas, la mayoría de trabajos se realizan en líneas catalogadas que se comercializan básicamente en Estados Unidos. Muchas de las líneas celulares que se utilizan actualmente en investigación, se establecieron a finales de la década de 1970. Desde entonces, la producción de líneas celulares no ha cesado. Actualmente, existe información de más de 30 líneas celulares de cáncer de mama humano, de las cuales alrededor de un 85% de ellas son derivadas de carcinomas intraductales o de tumores metastásicos, generalmente procedentes de efusiones pleurales (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003; Lacroix y Leclercq, 2004; Neve *et al.*, 2006).

La primera línea celular de cáncer establecida fue la línea celular HeLa, obtenida en 1951 a partir de un cáncer cervical (Gey *et al.*, 1952; revisado por Holliday y Speirs, 2011). A partir de entonces, surgieron muchas más líneas celulares, destacando la primera línea celular para el cáncer mamario denominada BT-20, establecida en 1958 (Lasfargues y Ozzello, 1958; revisado por Holliday y Speirs, 2011).

Sólo algunas de estas líneas de cáncer mamario han sido investigadas con cierta profundidad desde el punto de vista de su dependencia hormonal, de los receptores de membrana para diferentes factores de crecimiento, de la acción mitogénica o antimitogénica de estos, etc. Las líneas celulares de cáncer mamario más utilizadas en investigación son las pertenecientes a la serie MCF (de las siglas de Michigan Cancer Foundation) como MCF7; la serie MDA (aisladas en el hospital MD Anderson Cancer Center de Houston) como la línea hormono-independiente MDA-MB-231; o las pertenecientes a la serie SUM (originadas por Steve Eicher en la Universidad de Michigan) como las líneas SUM149 o SUM190, ambas procedentes de pacientes de IBC (Martínez-

Carpio y Navarro Moreno, 2003; Lacroix y Leclercq, 2004; Neve *et al.*, 2006). La más utilizada en investigación ha sido SUM149, en la se han determinado muchas de las características biológicas del IBC como la sobreexpresión de RhoC GTPasa (van Golen *et al.*, 1999) o la pérdida de expresión de WISP3 (Kleer *et al.*, 2002). Una de las últimas líneas celulares que se han establecido para IBC es la línea triple negativa FC-IBC02 procedente de una efusión pleural (Fernandez *et al.*, 2013).

Entre las líneas celulares más utilizadas en investigación del cáncer de mama podríamos destacar (Tabla 3):

Línea celular	Clasificación	Fenotipo	Origen	Tipo de tumor de procedencia
BT-20	Basal A	RE-; RP-; HER-2-	Mama	Carcinoma ductal infiltrante
MCF7	Luminal	RE+; RP+; HER-2-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante
MDA-MB-231	Basal B	RE-; RP-; HER-2-	Efusión pleural	Adenocarcinoma
MDA-MB-435	Basal B	RE-; RP-; HER-2-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante
SkBr3	Luminal	RE-; RP-; HER-2+	Efusión pleural	Adenocarcinoma
SUM149	Basal B	RE-; RP-; HER-2-	Mama	IBC
SUM159	Basal B	RE-; RP-; HER-2-	Mama	Carcinoma Anaplásico
SUM190	Basal A	RE-; RP-; HER-2+	Mama	IBC
T47D	Luminal	RE+; RP+; HER-2-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante

Tabla 3: Líneas celulares de cáncer de mama más utilizadas. En esta tabla se recoge información de cada línea celular acerca de su clasificación molecular; su fenotipo de expresión de receptores hormonales y HER-2; origen de las células de la línea celular y, tipo del tumor de procedencia (Neve *et al.*, 2006).

La utilización de líneas celulares conlleva numerosas ventajas, como su fácil manejo y su capacidad de replicación ilimitada, además de ser bastante homogéneas y de poder ser fácilmente reemplazables a partir de reservas congeladas (Holliday y Speirs, 2011). Por otro lado, también se pueden obtener

líneas celulares a partir de líneas ya establecidas como las obtenidas por su cultivo en medios diferentes, o por la selección de subpoblaciones celulares resistentes a determinados agentes (Turton *et al.*, 2001).

Aparte de las líneas celulares procedentes de la especie humana, también existen otras líneas celulares de cáncer mamario canino, todas ellas de muy reciente creación. Unos ejemplos de estas líneas celulares caninas son: DTK-E y DTK-PYME (Hsiao *et al.*, 2014), CMT1, CMT-U27, CMT9, P114, CNMP y CIPP (Gracanin *et al.*, 2014), y KTOSA5 CSKOS (Pang *et al.*, 2014), CHMP (Michishita *et al.*, 2011), CMT-W1 y W2 (Majchrzak *et al.*, 2013).

Estas líneas celulares han sido obtenidas a partir de los tumores primarios tras su escisión quirúrgica, conservando las características originales de los tumores primarios (Pawlowski *et al.*, 2009), presentando, alguna de ellas, resistencia a distintos fármacos, por lo que se las ha propuesto como un modelo experimental comparativo para la resistencia farmacológica (Chang *et al.*, 2010).

1.6.2.4 Investigación con células madre de cáncer mamario.

En las líneas celulares de cáncer de mama, el cultivo de células en condiciones no adherentes es una herramienta ampliamente utilizada para identificar y aislar células madre de cáncer de mama (*Breast Cancer Stem Cells* o BCSC); de esta forma se pueden estudiar los mecanismos de crecimiento en condiciones no adherentes, así como los mecanismos implicados en la supervivencia de células madre (Wang *et al.*, 2014). Los tumores metastásicos agresivos suelen mostrar cierta plasticidad fenotípica y se ha observado que presentan una subpoblación de células BSCS con características únicas e “iniciadoras de tumores” (Robertson *et al.*, 2010).

Las BCSC se identificaron por primera vez por Al-Hajj y col. en 2003, describiéndolas como células capaces de sobrevivir en suspensión y proliferar en tales condiciones, formando grupos de células definidos como mamosferas (Wang *et al.*, 2014). A partir de ese momento, las mamosferas fueron desarrolladas como un método para propagar células madre mamarias en cultivo en suspensión (Dontu *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2013).

Las células que forman las mamosferas son células multipotentes que presentan las capacidades de auto-renovación, diferenciación, propagación ilimitada y pueden originar células fenotípicamente distintas (Ponti *et al.*, 2005). Se ha sugerido que las mamosferas son las responsables de las metástasis y recidivas de tumores malignos, siendo a la vez más resistentes a las dianas terapéuticas que las células que crecen en condiciones adherentes (Bhadriraju y Chen, 2002; Birgersdotter *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006).

Las BCSC suelen tener una tasa de replicación lenta, por lo que son menos susceptibles a los efectos citotóxicos de los agentes quimioterápicos que se dirigen, principalmente, a células que proliferan activamente (Robertson *et al.*, 2010). Además las BCSC expresan transportadores de membrana multirresistentes a fármacos, que permiten a las células deshacerse de ciertas sustancias citotóxicas propiciando de esta manera un mecanismo adicional para resistir los efectos de los tratamientos quimioterápicos (Robertson *et al.*, 2010). Así mismo, se ha demostrado que las BSCS pueden activar vías de supervivencia como la vía de señalización Akt/P13K que media la resistencia a la radiación ionizante (Korkaya *et al.*, 2009).

La gran ventaja que poseen los cultivos en condiciones de suspensión, en comparación con los cultivos adherentes, es que simulan mejor el entorno

tisular y fisiológico de las células con respecto a la morfología celular y la señalización (Kim, 2005; Yamada y Cukierman, 2007). Los cultivos no adherentes reproducen mejor las características originales del tumor, ya que en los cultivos adherentes no existe estroma y no se producen interacciones célula-célula, los cuales son factores muy importantes en la investigación del cáncer de mama (Birgersdotter *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Por ello, en la última década, estos nuevos cultivos han sido desarrollados para solucionar parcialmente estos problemas y crear un entorno *in vitro* más similar al que nos encontramos en un tumor mamario (Kim, 2005). Sin embargo, el gran inconveniente de los cultivos en suspensión es que presentan una supervivencia limitada puesto que no son viables tras una serie de pases (Yamada y Cukierman, 2007; Dey *et al.*, 2009; Iglesias *et al.*, 2013).

En el caso de los tumores IBC, se piensa que pueden presentar grandes subpoblaciones de BSCS lo que podría explicar su escasa respuesta a tratamientos anti-proliferativos. Por ello, actualmente se está investigando en las vías de señalización (como la vía de señalización de Hedgehog) o factores de transcripción (como Notch y Wnt) muy presentes en las BSCS como nuevas estrategias terapéuticas para el IBC (Robertson *et al.*, 2010).

1.6.2.5 Características de malignidad celular de las BCSC: la transición Epitelial-Mesenquimatosa (EMT).

La EMT es un proceso implicado en la progresión tumoral, que lleva a las células epiteliales a convertirse en células mesenquimatosas promoviendo la invasión tumoral y la mediación de metástasis. Además, la adquisición del fenotipo mesenquimatoso por parte de las células tumorales implica la pérdida de la expresión de marcadores epiteliales y la expresión de distintos factores

de transcripción (Iglesias *et al.*, 2013). Este fenómeno se ha descrito en células tumorales mamarias que adquieren características de BSCS (Mani *et al.*, 2008).

Gracias a estos avances en la investigación de las BSCS se están probando estrategias terapéuticas que reviertan el proceso de EMT, lo que daría lugar a una pérdida del fenotipo invasivo y metastásico. Por ejemplo, se ha observado que la línea celular SUM149, que expresa altos niveles de EGFR, es sensible a una sustancia denominada erlotinib, un inhibidor de la EGFR tirosin-quinasa. Su efecto consiste en bloquear la vía de señalización ERK1/2 y de esta forma disminuir su fenotipo invasivo. Incluso se ha observado que bajas dosis de erlotinib, no tienen efecto sobre el crecimiento tumoral, pero sí que inhiben el desarrollo de metástasis (Zhang *et al.*, 2009).

El proceso de la EMT se caracteriza por la pérdida de las uniones epiteliales célula-célula y la reorganización del citoesqueleto, y dan como resultado la pérdida de la polaridad celular apical-basal y la adquisición de la morfología mesenquimatosa. Por lo tanto, se asocia con una disminución en la expresión de proteínas de unión epitelial-epitelial, como la E-cadherina y un aumento en la expresión de proteínas mesenquimatosas como la vimentina (Lacroix y Leclercq, 2004; Trimboli *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha observado que silenciando la expresión de E-cadherina en células MCF-7 (línea celular que puede crecer en suspensión), se impide la formación de mamosferas; sin embargo, si en células que no crecen en suspensión, como las de la línea celular SKBR3, inducimos la sobreexpresión de E-cadherina, observamos que estas células son capaces de formar mamosferas en suspensión. Estos

estudios revelan el gran papel de esta proteína en la EMT y la formación de mamíferas (Klopp *et al.*, 2010; Iglesias *et al.*, 2013).

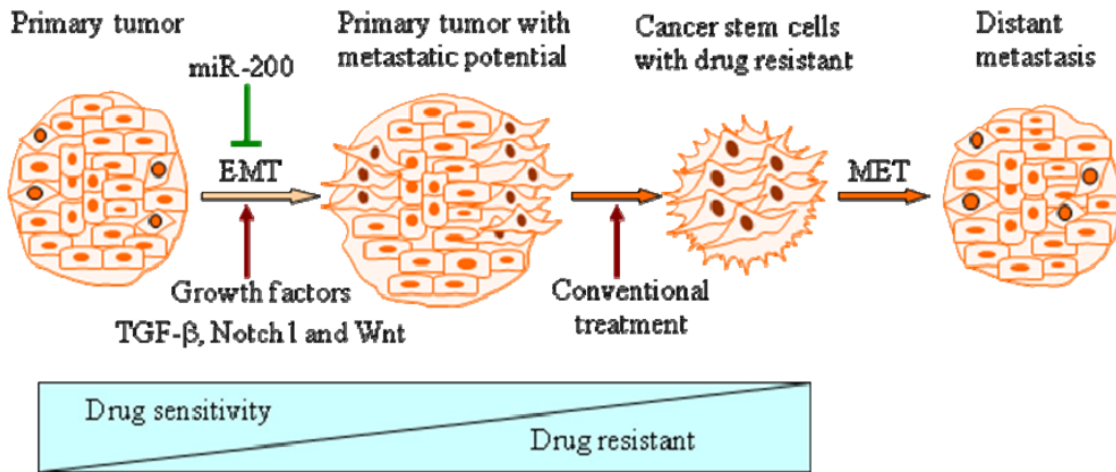


Figura 12: Esquema de transición epitelial-mesenquimatoso. Imagen tomada de (Kong *et al.*, 2011).

La E-cadherina es una glicoproteína esencial para el mantenimiento de la adhesión entre las células epiteliales (Takeichi, 1991). Aunque se pierde su expresión con la malignización y la EMT, una característica especial del IBC es justo lo contrario, su sobreexpresión. Se ha visto que esta proteína está sobreexpresada en el biomodelo murino de IBC, MARY-X, y en líneas celulares de IBC como SUM149 (Tomlinson *et al.*, 2001; Hoffmeyer *et al.*, 2005). También en IMC se ha comprobado la sobreexpresión de E-cadherina mediante estudios inmunohistoquímicos (de Andrés *et al.*, 2010). Se cree que la E-cadherina estaría involucrada en la formación de los émbolos neoplásicos, aumentando la adhesión entre las células tumorales y manteniendo la integridad de los émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis (Gong, 2008).

Las células tumorales pueden sufrir los procesos de EMT por varias vías de señalización, en particular por la cooperación entre las vías de señalización de TGF- β (*Transforming Growth Factor-Beta*) y Ras, Wnt, Notch o Hedgehog. Además, se ha observado que el TGF- β se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, por lo que se ha sugerido que este factor es un inductor del proceso de EMT (Fuxe *et al.*, 2010). Además de estas vías de señalización, otros factores de transcripción entre los que se incluyen TWIST, SNAIL, SLUG, ZEB1 y FOXC2, pueden inducir el proceso de EMT, (Yang y Weinberg, 2008).

La unión del TGF- β a su receptor induce la activación de distintas vías de señalización como la de complejos Smad, la vía Wnt o la vía Ras. Esta activación hará que se regule la transcripción de los genes diana del TGF- β reprimiendo o expresando diferentes factores de transcripción y, en última instancia, promoviendo los procesos de EMT (Fuxe *et al.*, 2010).

Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de los factores de transcripción SNAIL y SLUG induce los procesos de EMT ya que estos inhiben la expresión de E-cadherina (Mego *et al.*, 2012). Otros factores de transcripción que inducen la EMT son TWIST1, que inhibe la vía de señalización de p53, o la β -catenina, que induce la expresión de marcadores mesenquimatosos como la fibronectina y la vimentina (Fuxe *et al.*, 2010).

1.6.2.6 Marcadores de BCSC.

Las células madre pueden ser identificadas por patrones de expresión de moléculas de la superficie celular, tales como CD44, CD24 o por otros marcadores tales como la enzima ALDH1 (Aldehido Deshidrogenasa 1) (Al-Hajj *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005; Jaggupilli y Elkord, 2012; Yu *et al.*, 2012; Wang

et al., 2014). Así, la presencia de células CD44⁺ y CD24^{-baja} sirve para aislar células madre del cáncer de tumores sólidos (Jaggupilli y Elkord, 2012; Yu *et al.*, 2012).

Diversos estudios indican que sólo las BCSC cuya expresión de CD24 y CD44 es CD44⁺/CD24^{-baja} tienen la capacidad de proliferar en suspensión y formar mamosferas (Al-Hajj *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005). Además, se ha observado que son capaces de formar tumores en ratones inmunodeprimidos reproduciendo la heterogeneidad del tumor original (Ponti *et al.*, 2005).

De este modo, la línea celular SUM149 presenta una subpoblación celular de inmunofenotipo CD44⁺/CD24^{-baja} que expresa la enzima ALDH y que presentan más capacidad tumorigénica que el resto de células tumorales de SUM149 (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009).

La prevalencia de una población celular CD44⁺/CD24^{-baja} dentro de los tumores de mama y su asociación con características clínicas del tumor, todavía sigue en estudio. Sin embargo, se ha descrito que los tumores de mama con una alta proporción de células con fenotipo CD44⁺/CD24^{-baja} son capaces de desarrollar metástasis a distancia, considerándose tumores con mal pronóstico (Abraham *et al.*, 2005). Por su parte, la expresión de ALDH también se relaciona con el desarrollo de metástasis a distancia ya que, como ya hemos indicado, se ha descrito como un marcador de las células madre normales y malignas de la mama (Blacking *et al.*, 2011; Ricardo *et al.*, 2011).

La expresión de estos marcadores se utiliza en combinación con la de otros tales como CD326 (también denominado EpCAM) que es un marcador general de tumor epitelial maligno (Patriarca *et al.*, 2012). CD326 es una molécula de adhesión célula-célula, cuya expresión en células epiteliales es

positiva y está ausente en células mesenquimatosas o en tejidos musculares y neuroendocrinos (Went *et al.*, 2004). Otros marcadores que se emplean en la investigación con BCSC son: CD45, un marcador hematopoyético cuya expresión está ausente en células madre de fenotipo mesenquimatoso (Calloni *et al.*, 2013), CD133, un marcador de superficie específico de células madre de cáncer (Irollo y Pirozzi, 2013) y CD146, que identifica células madre, se considera inductor de la EMT (Zeng *et al.*, 2012), y que participa en procesos de adhesión celular, metástasis y juega un papel crítico en la angiogénesis tumoral (Wang y Yan, 2013).

Por lo tanto, el fenotipo de expresión de estos marcadores (CD24, CD44, CD326, CD45, CD133 y CD146) en células madre se ha asociado con su potencial metastásico, el aumento de las propiedades de invasión celular (Sheridan *et al.*, 2006), la resistencia a la radiación (Phillips *et al.*, 2006) y un pronóstico adverso (Shipitsin *et al.*, 2007).

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Para la investigación en el cáncer inflamatorio tanto humano como canino, la disponibilidad de modelos *in vitro* e *in vivo* es limitada. En los últimos años se han desarrollado varias líneas celulares de IBC, aunque en investigación siempre se tiende a utilizar la línea celular SUM149. Hasta estos estudios, no se conocían líneas celulares establecidas de IMC. La hipótesis es que se podría desarrollar una línea de IMC mamaria que podría ser semejante a una de IBC. En base a ello y debido a la escasez de líneas celulares de cáncer inflamatorio canino el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es la obtención de una línea celular inmortal de cáncer inflamatorio mamario canino que servirá, tanto para profundizar en la investigación de aspectos moleculares del IMC, como para establecer la similitud de la línea canina con su homóloga humana, consiguiendo que la nueva línea desarrollada sirva o se establezca como modelo para el estudio de la enfermedad humana y para el desarrollo de nuevas terapias.

Para la consecución de la hipótesis y el objetivo general señalados se han establecido los siguientes objetivos:

- 1.- En primer lugar, establecer y caracterizar la nueva línea celular de IMC, denominada IPC-366, en términos de morfología celular, crecimiento *in vitro*, capacidad de crecer en modelos *in vivo*, características inmunohistoquímicas y su patrón cromosómico.
- 2.- Una vez caracterizada, el siguiente objetivo fue comparar IPC-366 con su línea celular homóloga humana SUM149 en dos sistemas de cultivo distintos con el fin de apreciar las diferencias y semejanzas de ambas líneas celulares. Para ello, se cultivaron ambas líneas en

condiciones adherentes y no adherentes y se compararon en función de la expresión de marcadores de células madre y producción de proteínas características de la EMT, además de observar las diferencias de su crecimiento *in vivo*, para comprender mejor los mecanismos patogénicos del IBC e IMC, y poder validar el modelo canino para la investigación de IBC, proporcionando nuevas herramientas para el estudio de la enfermedad.

3.- Comparar el crecimiento de los tumores generados por la inoculación subcutánea de las líneas celulares IPC-366 y SUM149, en hembras y machos de ratones SCID, para determinar las similitudes y diferencias derivadas de un diferente microambiente hormonal del tumor (hormonas esteroides), su crecimiento y su biodistribución.

4.- En última instancia, desarrollar y validar una nueva técnica de enzimoimmunoensayo (EIA) de amplificación en medios de cultivo de las líneas celulares de IMC e IBC, en términos de exactitud (límite de detección), precisión, sensibilidad y paralelismo, para medir la concentración de hormonas esteroides (Progesterona, Estradiol, Sulfato de Estrona, Testosterona y Androstenediona) secretadas por las células en cultivo y comparar el perfil de producción hormonal entre ambas líneas celulares.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Obtención de la línea celular IPC-366

En el capítulo 1, se describe cómo se consiguió establecer la línea celular IPC-366 además de sus características.

La línea celular IPC-366 se consiguió a partir de muestras de un cáncer mamario inflamatorio canino, procedentes de una perra de raza mestiza de 10 años de edad, tomadas inmediatamente después del sacrificio humanitario del animal.



Figura 13: Imágenes de perra de raza mestiza diagnosticada de IMC (con permiso del propietario).

Después de la eutanasia, las muestras tumorales se obtuvieron rápidamente en la necropsia y se procesaron para la confirmación histopatológica de IMC. La histopatología y la necropsia se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. El tumor mamario canino original fue diagnosticado como un cáncer sólido con múltiples émbolos tumorales dérmicos y presentes en vasos linfáticos (Figura 12), lo que confirmó el diagnóstico de IMC.

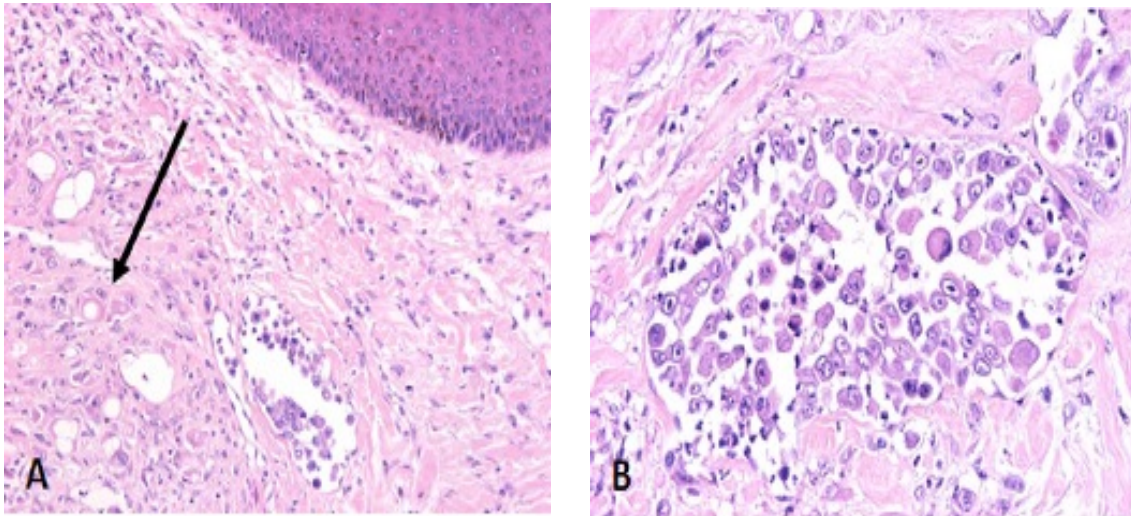


Figura 14: Cáncer inflamatorio mamario canino originario de la línea celular IPC-366. Secciones de parafina, H&E. A) (10X) y B) (20X). Émbolos neoplásicos en la dermis superficial. Las células tumorales presentan marcada anisocitosis y anisocariosis, y grandes nucléolos evidentes. Células neoplásicas infiltrantes (flecha).

Para la realización del cultivo primario de las células tumorales, una parte del tumor se recogió en condiciones de esterilidad y se mantuvo en una solución HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Sigma Aldrich, Madrid) con un 1% de antibiótico penicilina-estreptomina (Sigma Aldrich, Madrid). Se lavó bien el tumor con la misma solución HBSS y se cortó en pequeños fragmentos.

Para realizar la digestión enzimática de los fragmentos tumorales, estos se introdujeron en un tubo Falcon con colagenasa III (enzima que digiere los fragmentos tumorales) (Sigma Aldrich, Madrid) y se dejaron en agitación continua a 37°C durante 2 horas. En ese tiempo se ayudó a la digestión del tejido realizando una disgregación mecánica con una pipeta.

Una vez realizada la digestión del tejido, se filtraron los fragmentos tumorales con un filtro o *Cell Strainer* de 22 nm (Controltecnica, Madrid) y se

inactivó la colagenasa añadiendo medio de cultivo DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12*) (Sigma Aldrich, Madrid) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich, Madrid). Posteriormente, se procedió a centrifugar el contenido a 112 x g 2 min a 4°C.

Se desechó el sobrenadante y el sedimento o pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo DMEM/F12, suplementado con 10% SFB; 1% de L-glutamina (Sigma Aldrich, Madrid) y 1% antibiótico penicilina-estreptomicina. Por último, el contenido se transfirió a frascos de cultivo T-75 cm² (Controltecnica, Madrid) los cuales se mantuvieron en un incubador de CO₂ (Nuair modelo NU-4750E) (Plymouth, MN, EEUU) a 37°C con un 5% de CO₂ y una atmósfera humidificada.

Cada 7 días se cambió el medio de cultivo de los frascos, por medio de cultivo fresco, para limpiar el cultivo y nutrir las células. Las células del cultivo primario tardaron en adherirse 24 horas, aproximadamente. A la semana de cultivar las células, se empezó a ver proliferación celular. El progreso del cultivo se monitorizó mediante su observación al microscopio invertido (Optika, modelo XDS-2; Italia).

1.1 Transferencia de células de frascos de cultivo (pase de células).

Cuando la confluencia celular alcanzó, aproximadamente, un 75%, las células fueron despegadas de los frascos de cultivo y transferidas a otro frasco de cultivo. Para la realización de este proceso, en primer lugar, las células se lavaron con una solución HBSS, con 1% de antibiótico, para retirar todos los artefactos que pudiera haber. Una vez lavadas, se les agregó una solución de tripsina (*Trypsin-EDTA Solution* al 0,25%) (Sigma Aldrich, Madrid) que se dejó actuar durante 2 minutos en el incubador de CO₂. Transcurrido este tiempo, se

observaron las células al microscopio invertido para comprobar si se habían despegado del frasco de cultivo y se encontraban en suspensión. Posteriormente, sin desechar la tripsina, se inactivó la misma con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma Aldrich, Madrid) suplementado con un 10% de SFB.

Todo este contenido fue transferido desde el frasco de cultivo a un tubo Falcon y éste se centrifugó a $112 \times g$, 5min, a 20°C. El pellet de células resultante fue resuspendido en medio DMEM/F12 suplementado y transferido a un nuevo frasco de cultivo estéril.

Consideramos que la línea celular de IMC IPC-366 se estableció cuando el número de pases, o transferencias de las células a otros frascos de cultivo, superó los 50, conservando las células sus características iniciales.

1.2 Criopreservación de las células.

Con el fin de observar si la línea celular resistía la criopreservación, se congelaron las células cultivadas en 3 frascos de cultivo en crioviales de 2 ml (Controltecnica, Madrid).

Para ello, se realizaron los primeros pasos de la transferencia de células hasta la resuspensión del pellet. En este caso, el pellet se resuspendió en 1 ml de solución HBSS con antibiótico. En cada criovial, se añadieron 0,2 ml de DMSO (Dimetil Sulfoxido) (Sigma Aldrich, Madrid), 0,8 ml de SFB y la resuspensión de las células en HBSS.

Por último, se enfriaron las células gradualmente, pasando por temperaturas de 4°C, -20°C hasta congelarlas a -80°C. Pasada una semana, se ultracongelaron en un tanque de nitrógeno líquido.

Transcurridas 2, 3, y 4 semanas del proceso de congelación, se procedió a descongelar los crioviales. En primer lugar, se descongelaron a 37°C en un baño termostático. Una vez descongelados, se añadió el contenido del criovial a un Falcon con 20 ml de solución HBSS con antibiótico. Se centrifugó el contenido a 112 x g, 5 min a 20°C y el pellet se resuspendió en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado y, para establecer la viabilidad celular, se procedió al conteo de células viables.

Para ello, 10 µl de la resuspensión de células se tiñeron con 10 µl de azul tripán (Sigma Aldrich, Madrid) y se contaron las células que no estaban teñidas mediante el uso de un hemocitómetro (Boeco, Alemania) al microscopio óptico (Leitz, modelo Laborlux 12) (Leica Microsystems, Barcelona). Por último, las células se cultivaron en un frasco de cultivo que se incubó a 37°C.

Si las células, después de la crioconservación, presentaban un buen crecimiento en múltiples pases conservando las características de la línea celular, se consideró que era crioconservables.

1.3 Curva de crecimiento celular.

Para identificar el tipo de crecimiento de la línea celular IPC-366, las células fueron transferidas a placas de cultivo de 6 pocillos (Controltecnica, Madrid) en una concentración de 10^5 células por pocillo. Se incubaron con medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB, 1% de L-glutamina, 1% antibiótico penicilina-estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂. Cada día, durante 10 días, se contaron las células de tres pocillos usando un hemocitómetro. Se utilizó la media del conteo de cada día para, posteriormente, representarla gráficamente y observar la evolución del crecimiento de las células en cultivo.

2. Condiciones de cultivo adherente de la línea celular SUM149.

En el desarrollo de los capítulos de la presente Tesis Doctoral, se va a utilizar a modo comparativo con IPC-366, la línea celular de IBC, SUM149 (Asterand, plc; Detroit, MI, EEUU).

La línea celular SUM149 fue cultivada en medio Ham's F12 suplementado con 10% de SFB, 1 mg/ml de hidrocortisona, 5 g/ml de insulina y 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina.

SUM149 se cultivó en frascos de cultivo de 25-cm² y se mantuvo en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37°C. Diariamente se observaban los cultivos de células mediante un microscopio invertido para comprobar la viabilidad celular y el crecimiento.

3. Examen morfológico celular.

El examen citológico de la línea celular IPC-366 se llevó a cabo tanto en frotis de células como en pellets; sin embargo, el examen citológico de SUM149, solo se llevó a cabo en los pellets.

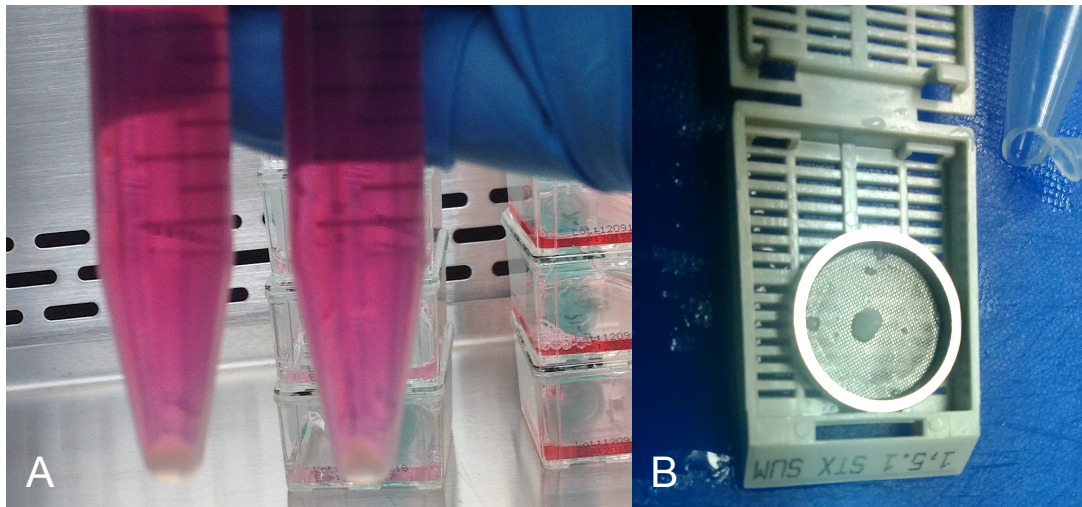


Figura 15: Pellets de líneas celulares. A) Pellets obtenidos tras la centrifugación de las células. B) Pellet fijado y preparado para incluir.

Los pellets obtenidos en el proceso de tripsinización de las células y posterior centrifugación, se resuspendieron en formalina tamponada al 10% (pH = 7,4) y se procedió de nuevo a su centrifugado para una óptima fijación. El pellet se incluyó en parafina siguiendo procedimientos rutinarios del laboratorio de anatomía patológica y se cortaron secciones de 3-4 micras que se tiñeron, también de forma rutinaria, con hematoxilina-eosina (H&E). Se midieron los diámetros celulares, nucleares y nucleolares en 12 campos de un pellet, con el objetivo de 40 aumentos y mediante el software analizador de imágenes Image J (NIH, EEUU).

Para la realización de los frotis de IPC-366, el pellet de células fue resuspendido en 0,5 ml de tampón TBS (*Tris Buffered Saline*, pH=7,4). Inmediatamente después se realizaron extensiones en varios portas y se tiñeron con la técnica de Diff Quick (Panreac, Barcelona).

4. Técnica inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación del inmunofenotipo de IPC-366.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas en cortes de pellets incluidos en parafina, se analizaron diversos marcadores de fenotipo tumoral utilizados para identificar líneas celulares epiteliales, en general y, células neoplásicas mamarias en particular. Los anticuerpos empleados en este estudio fueron evaluados mediante la técnica inmunohistoquímica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Se utilizaron anticuerpos primarios tanto monoclonales (anticuerpos homogéneos que reconocen el mismo epítipo del antígeno) como policlonales (mezcla de anticuerpos para más de un epítipo). Estos anticuerpos presentan reactividad cruzada con la especie canina y se usan habitualmente para caracterizar tumores de mama caninos.

Los anticuerpos empleados, la casa comercial y el tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpo Primario	Tipo, Clon*	Comercial**	Incubación	Sistema de detección
Pancitokeratina	Mab AE1/AE3	Prediluido, MAD-001000QD	60min	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Citoqueratina 14	Mab LL02	AbD Serotec 1:1000 LL02	60 min	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
P63	Mab 4A4	Prediluido, MAD-000479QD	30 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Vimentina clon	Mab SP20	Prediluido, MAD-000326QD	20 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Actina Músculo Liso	Mab 1A4	Prediluido, MAD-001195QD	30 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Receptor Estrógenos	Mab 1D5	DAKO 1/30 M7047	60 min RT	Dako EnVision-HRP K4007
Receptor Progesterona	Mab 1E2	Prediluido Ventana/Roch e 790-2223	90 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
HER-2	Pab	Dako A0485 1/1000	20 min RT	Dako Envision-HRP K5007
COX-2	Mab SP21	Prediluido, MAD-000335QD	150 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
E-Cadherina	Mab EP700Y	Prediluido, MAD-000051QD	60 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Ki-67	Mab SP6	Prediluido, MAD 000310QD	90 min	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK

* Mab= anticuerpo monoclonal, Pab=anticuerpo policlonal.

** MAD= Master Diagnostica.

Tabla 4: Datos técnicos específicos de anticuerpos y revelado de peroxidasa para técnicas de inmunohistoquímica.

En todos los casos, como control negativo de la técnica se sustituyó el anticuerpo primario por un anticuerpo no inmune (anti IgG felino) para la muestra y como control positivo, una muestra tisular de expresión conocida para cada anticuerpo (por ejemplo, una muestra de útero de perra).

Aunque en el revelado de las técnicas se han usado kits comerciales, la base del revelado se suele basar en que a la unión antígeno-anticuerpo primario se le unirá específicamente un anticuerpo secundario conjugado con biotina, molécula con afinidad por unirse a la estreptavidina marcada con la enzima peroxidasa. El complejo será visualizado mediante la aplicación de DAB, sustrato cromógeno de la enzima peroxidasa (Figura 15).

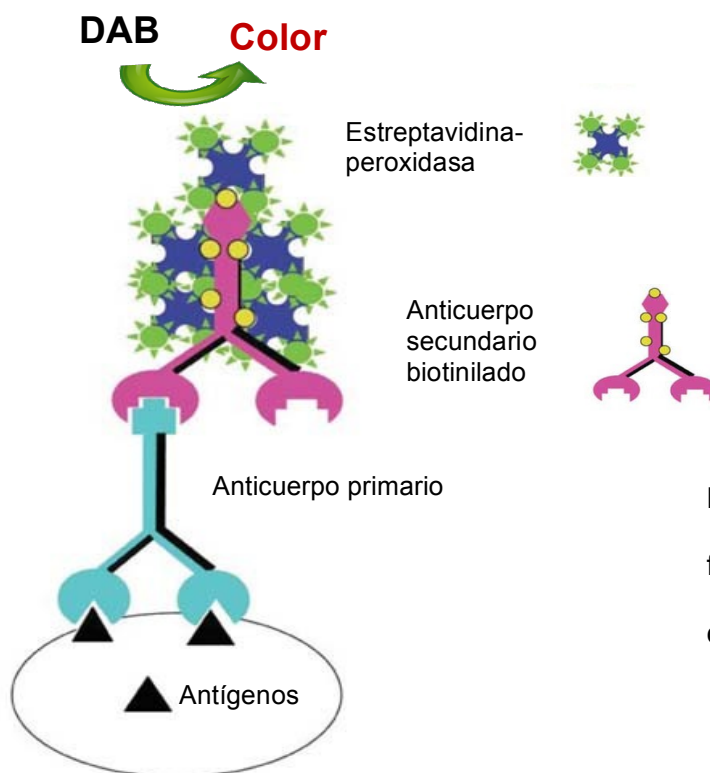


Figura 16: Esquema del fundamento de la técnica IHQ de estreptavidina-biotina.

Para todas las técnicas de IHQ se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Las secciones de pellets en parafina (3µm) fueron colocadas en un módulo PT (pre-tratamiento) (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) que

contiene una solución tampón EDTA (pH 8,0) (Master Diagnostica). Este módulo se calentó durante 20 min a 95°C y se dejó enfriar hasta los 65°C. De esta manera se produce el desparafinado y el desenmascaramiento antigénico por calor, quedando el antígeno expuesto para su posterior unión con el anticuerpo. A continuación, las preparaciones fueron lavadas con agua caliente.

Posteriormente, se colocaron las preparaciones en un inmunoteñidor automático (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA). En el inmunoteñidor, se realizaron los siguientes pasos, donde excepto el primer lavado con agua destilada, todos los demás lavados se llevaron a cabo con TBS-Tween (pH=7,4). El primer paso fue el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (MAD-021540Q-125) durante 10 minutos. A continuación se incubó con la solución de bloqueo de fondo (incluido en los kits comerciales) según indicaciones. A continuación se incubó con el anticuerpo primario (dilución y condiciones de incubación según la tabla 4) y se prosiguió según las instrucciones de cada kit.

Tras el revelado con DAB (incluido en los kits) y lavado con agua destilada, las preparaciones se extrajeron del inmunoteñidor, se lavaron con agua corriente, y se tiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y montaron con DPX según procedimientos rutinarios del laboratorio de anatomía patológica.

4.1 Valoración de la inmunotinción

Para cada anticuerpo se valoró la presencia o ausencia de inmunoexpresión, en el citoplasma o núcleo de las células neoplásicas, mediante un analizador de imágenes asistido por ordenador (Imagen J),

contando hasta 1.000 células. Para las tinciones de pancitoqueratina, vimentina, citoqueratina 14, p63, E-cadherina, actina y COX-2 la tinción se consideró positiva cuando se observaban más de un 10% de células neoplásicas positivas.

La evaluación de la tinción de HER-2 se realizó siguiendo las pautas recomendadas por la Sociedad Americana del Cáncer (ASCO, *American Society of Cancer Oncology*) por la cual 3+ se consideró cuando hay más de un 30% de las células teñidas con alta intensidad.

Por último, el índice de proliferación Ki-67 se determinó contando los núcleos positivos y negativos en 1.000 células neoplásicas. Cada núcleo teñido se consideró positivo independientemente de la intensidad. De esta forma, se obtuvo el porcentaje medio de células positivas a Ki67.

5. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica

A partir de un pellet de células procedentes de la línea celular IPC-366 y fijadas en una solución de 4% de paraformaldehído (Panreac, Barcelona) y 2,5% de glutaraldehído (Panreac, Barcelona), se siguió el método de procesado rutinario para microscopía electrónica, que se llevó a cabo en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid, donde se procesaron las muestras.



Figura 17: Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 3000 F. Imagen tomada de www.cnme.es

Las células se incubaron con tampón de cacodilato 0,1 M a 4°C durante la noche. Al día siguiente, las células fijadas fueron tratadas con una solución de ferrocianuro (Panreac, Barcelona) al 3% (diluido en PBS (buffer fosfato salino)) y de tetraóxido de osmio (Panreac, Barcelona) al 2% durante 1 hora. Posteriormente fueron lavadas en agua destilada y se deshidrataron en acetonas de creciente porcentaje (30, 50, 70, 80 y 100 %). Las muestras se infiltraron gradualmente en una mezcla de resina de Müllenhauer (Lowicryl resin, Sigma Aldrich, Madrid), y se dejaron solidificar a 60°C durante 24 h. Las células embebidas se seccionaron en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica. Los cortes ultrafinos se observaron mediante un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 3000 F.

6. Cultivo de células en suspensión (condiciones no adherentes): ensayo de eficacia de formación de mamosferas (MFE)

Este ensayo se llevó a cabo en colaboración con los Departamentos de Hematopatología y Radiología Oncológica del Centro Oncológico MD Anderson Cancer Center de Houston, Universidad de Texas, EEUU.



Figura 18: Placa de ultra-baja fijación para el cultivo de mamosferas.

Para generar mamosferas primarias, las líneas celulares IPC-366 y SUM149 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos de ultra-baja fijación (Corning; Nueva York, EEUU) con medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium*) enriquecido con factores de crecimiento (20 ng/ml bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico, Life Technologies, Alcobendas, Madrid), 20 ng/ml EGF (factor de crecimiento epidérmico, Life Technologies, Alcobendas, Madrid) y 1x B27 (suplemento libre de suero), en una densidad de 10^4 y 2×10^4 células por pocillo/ml de medio. Para la producción y observación de mamosferas, las células en suspensión se mantuvieron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% a 37°C durante 7 días.

Las mamosferas resultantes fueron teñidas con una solución MTT (Invitrogen, Waltham, MA, EEUU) para proceder a su conteo usando un contador de colonias Gelcount (Oxford Optronix, Oxford, Reino Unido).

Después de 7 días de cultivo, la primera generación de mamíferas se disoció en células individuales, mediante una digestión enzimática con tripsina, con la ayuda de una aguja de 23G, y posteriormente las células fueron centrifugadas a 112 x g, 5 min a 20°C. El pellet resultante se resuspendió en medio MEM enriquecido y las células fueron recultivadas. Cada semana se repitió este proceso para establecer el número de pasajes que soportan las mamíferas.

Para evaluar el tiempo de supervivencia de las mamíferas, se realizó un ensayo de eficiencia de formación de mamíferas (MFE). Para ello, las mamíferas se pasaron al menos 6 veces. El MFE se calculó como el número de mamíferas de cada generación dividido por el número original de células cultivadas y se expresa como porcentaje medio (\pm SD).

7. Ensayo de viabilidad celular (MTS Assay)

Para establecer la viabilidad de las células en condiciones adherentes y no adherentes de las líneas celulares IPC-366 y SUM149 se utilizó un kit comercial denominado CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madrid) que se empleó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

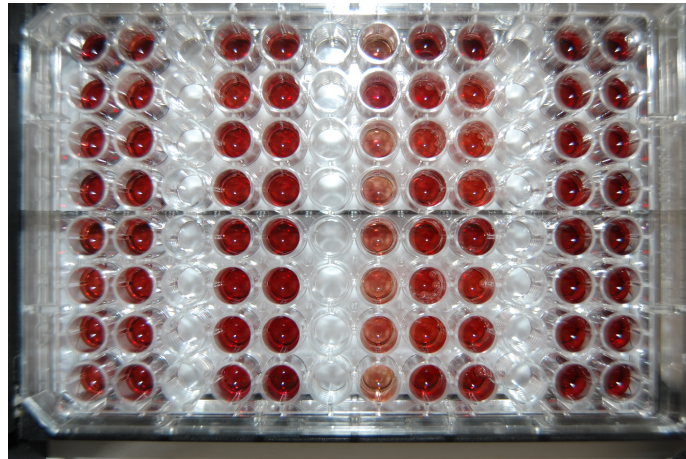


Figura 19: Ensayo de MTS. Placa de 96 pocillos utilizada para realizar el ensayo.

Para ello, células en condiciones adherentes y no adherentes, en una densidad de 10^3 , fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con 100 μ l de medio correspondiente a cada cultivo, más 20 μ l del compuesto MTS y se incubaron durante 3 horas en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 490 nm con un lector de placas. Se tomaron los datos de las células adherentes para representar el 100% de proliferación y los datos de las células no adherentes fueron expresados en relación a estos.

8. Citometría de flujo

Este ensayo se llevó a cabo en el Departamento de Hematopatología del Centro Oncológico MD Anderson Cancer Center de Houston, Universidad de Texas, EEUU.

Para la realización de este estudio, las células adherentes fueron tripsinizadas y las mamíferas disociadas como se ha descrito anteriormente.



Figura 20: Kit de ALDH empleado.

La actividad ALDH de las células, en condiciones adherentes y no adherentes, de ambas líneas celulares, se evaluó utilizando el kit comercial Aldefluor Assay (Stemcell technologies; Vancouver, Canadá) siguiendo el protocolo del fabricante. Una densidad de 10^6 células adherentes y no adherentes se resuspendió en tampón Aldefluor que contenía un inhibidor del dominio de unión del ATP (adenosin trifosfato). Las células se dividieron en dos tubos: en un tubo se hicieron reaccionar las células con 5 μ l del inhibidor de ALDH, dietilamino-benzaldehído (DEAB), utilizado como control negativo. El otro tubo constó de otra parte de las células que reaccionaron con el reactivo ALDH. Tanto la reacción de ensayo como el control negativo se incubaron durante 35 minutos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Una vez transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron a 1.372 x g durante 5 minutos a 20°C. El sobrenadante es desechado y las células se resuspendieron en buffer Aldefluor y se mantuvieron en nevera y oscuridad hasta su posterior procesamiento con el citómetro de flujo.

Así mismo, se determinó la expresión de marcadores de superficie de células madre (CD44, CD24, CD45, CD326, CD133 y CD146) en las líneas celulares cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes, el protocolo a seguir se detalla a continuación.

Las células centrifugadas fueron resuspendidas en buffer Aldefluor. En este caso, las células fueron transferidas a tres tubos: un control negativo al que se le añadieron 5 μ l de DEAB; un control positivo de los isotipos apropiados (IgG1); y el tubo de ensayo con el reactivo Aldefluor. Los controles y el tubo de ensayo se incubaron durante 35 minutos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Posteriormente, se añadieron 5 μ l de los anticuerpos a analizar a cada uno de los tubos. Los anticuerpos utilizados (se indica el fluorocromo entre paréntesis) fueron: CD44 (PerCP), CD24 (PE-Cy5), CD45 (PE-Cy7), CD326 (FITC), CD133 (APC) y CD146 (PE) (BD Pharmingen; San Diego, CA, EEUU). Además en el tubo del control positivo se añadieron 5 μ l del isotipo IgG. Después, todos los tubos se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y protegidos de la luz. Las células marcadas se centrifugaron a 1.372 x g durante 5 minutos a 20°C y el sedimento celular se resuspendió en 250 μ l de tampón de Aldefluor antes del análisis en un citómetro de flujo.

El citómetro de flujo utilizado fue el LSR II (BD Biosciences; San Jose, CA, EEUU) capaz de discriminar la fluorescencia de 6 colores. Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas.

9. Análisis de Western Blot

Para comparar los patrones de expresión de marcadores de EMT (N- y E-cadherinas y fibronectina), la angiogénesis (VEGF-A), las proteínas RhoC GTPasa y WISP3 y la expresión de los receptores hormonales RE, RP y HER-2, de las dos condiciones de cultivo en ambas líneas celulares, se llevó a cabo un análisis de producción proteica mediante la técnica de western blot,

realizada en el Departamento de Radiología Oncológica del MD Anderson Cancer Center de Houston, Universidad de Texas, EEUU.

En primer lugar, las células adherentes y no adherentes de IPC-366 y SUM149 se incubaron con una solución de lisado consistente en: 100 µl de solución enzimática RIPA (50 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 150 mmol/l de NaCl, 1% de NP40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de dodecilsulfato sódico (SDS)); 10 µl de fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF) 1 µM; y 890 µl de agua Milli-Q. Para ello, al cultivo adherente se le añadieron directamente 300 µl de esta solución y, posteriormente, se rasparon las células para ayudar a la lisis; el lisado se recoge en un tubo eppendorf. En el caso de las mamosferas, éstas fueron previamente centrifugadas a 112 x g, 5 min a 20°C para resuspenderlas directamente en la solución de lisis. En todo momento los lisados se mantuvieron en frío para evitar la degradación proteica. Posteriormente, los lisados fueron centrifugados a 10.000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se congelaron hasta su posterior utilización en los análisis de western blot.

9.1 Determinación de la cantidad total de proteína de los lisados y preparación de la muestra.

Antes de comenzar con la técnica, es necesario determinar la cantidad de proteína total que contienen los lisados. Este paso se realiza mediante ensayos colorimétricos que se basan en las reacciones que se producen entre las proteínas de la muestra y los reactivos de detección. Además, para determinar la cantidad de proteína necesitamos realizar una curva estándar mediante diluciones ascendentes de cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) (Thermofisher; Waltham, MA, EEUU).

Para ello, tanto la curva estándar como las muestras a analizar se hicieron reaccionar con dos reactivos (reactivo A y reactivo B) (Thermofisher; Waltham, MA, EEUU) en una placa de 96 pocillos, y posteriormente, se procedió a la lectura de las absorbancias.

Por último, se trazó la curva estándar en función de las absorbancias obtenidas y la cantidad de proteína estándar utilizada. A partir de esta curva, se extrapolaron las cantidades de proteína de las muestras problema.

Es importante que al realizar la técnica de western blot todas las muestras contengan la misma cantidad de proteína. Por ello, en este caso, se determinó cuánto volumen de muestra era necesario para que la cantidad de proteína fuera de 40 μg .

Las muestras, posteriormente, fueron tratadas con tampones de carga que desnaturalizan las proteínas, rompiendo de esta forma las estructuras tridimensionales. Para ello, se preparó el tampón de carga que consistió en una mezcla de dodecilsulfato de litio (LDS) (NuPage; Thermofisher; Waltham, MA, EEUU), que es un agente desnaturalizante, y β -mercaptoetanol (Invitrogen; Waltham, MA, EEUU), que es un agente reductor. Una vez tratadas las muestras con el tampón de carga, se sometieron a una incubación de 10 minutos en agua hirviendo (aproximadamente 100°C).

9.2 Gel de electroforesis para la separación de proteínas

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Invitrogen; Waltham, MA, EEUU) bajo condiciones reductoras. Los geles se dispusieron en un recipiente de electroforesis que se llenó de tampón de electroforesis que contenía Tris (que mantiene el pH),

Glicina (que conduce la electricidad) y SDS (que mantiene las proteínas cargadas negativamente).

Posteriormente, las muestras se cargaron en los distintos pocillos del gel. En el primer pocillo, se cargó un marcador de peso molecular que se utilizó para saber si la proteína de interés estaba dentro del rango adecuado.

Por último, para la separación de las proteínas, se dejó correr el gel durante toda la noche a 15V. De esta forma, se aplicó un campo eléctrico que provocó el movimiento de las proteínas hacia el polo positivo y la separación de las mismas en función del peso molecular.

9.3 Transferencia de proteínas.

Una vez ha terminado la electroforesis del gel, las proteínas se transfirieron a una membrana. Dicha membrana es un soporte sólido que inmoviliza las proteínas, permitiendo así la posterior hibridación de un anticuerpo.

Las membranas utilizadas fueron membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Biorad; California, EEUU). La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se realizó en un recipiente de electroforesis lleno de tampón de transferencia (compuesto por Tris, Glicina y Metanol). Las membranas previamente fueron sumergidas en metanol durante 10-15 min. El gel y las membranas se intercalaron y fijaron firmemente entre finas esponjas y papel absorbente, evitando que se formaran burbujas de aire. Este montaje se introdujo en el recipiente de electroforesis y se expuso a corriente eléctrica. La transferencia de las proteínas se llevó a cabo a 100 mA y 25V durante 4 horas.

Una vez realizada la transferencia de proteínas, se debe observar que ésta se haya ejecutado correctamente. Para ello, las membranas fueron teñidas con el colorante Ponceau S (Thermofisher; Waltham, MA, EEUU) durante 30 segundos y posteriormente aclaradas con agua corriente para no dejar restos del colorante.

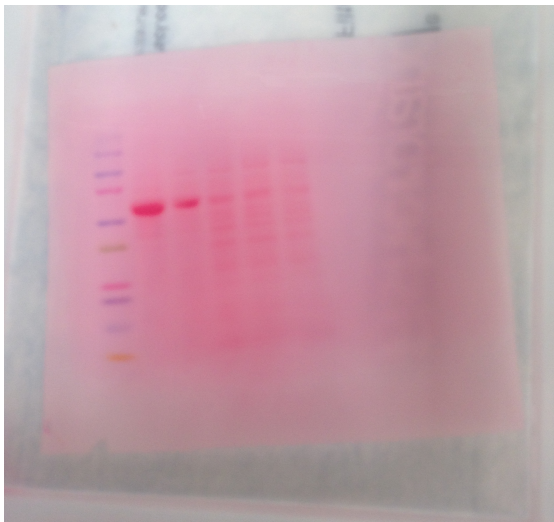


Figura 21: Membrana teñida con colorante Ponceau S.

9.4 Inmunodetección

Las membranas fueron depositadas en una placa de Petri y se lavaron 3 veces con TBS (Invitrogen; Waltham, MA, EEUU) durante 5 min cada uno. Luego se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una solución de 5% de leche en polvo en TBS-tween (*Tris Buffered Saline y Tween 20*) para bloquear las proteínas de la membrana.

Durante este tiempo, se realizaron las diluciones de los anticuerpos primarios (entre 1:2000 y 1:5000) en un solución de TBS-tween con 5% de leche en polvo y un 1% de azida sódica al 2%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: N-cadherina, E-cadherina, fibronectina, VEGF-A, RhoC GTPasa, WISP3, RE, RP, HER-2 y actina (usado como control

positivo de carga). En la siguiente tabla se muestran las características de cada uno de ellos.

Anticuerpo	Compañía	Especie	Clon	Peso molecular
E-cadherina	BD Bioscience	Ratón	Monoclonal	120 kDa.
N-cadherina	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	Policlonal	130 kDa.
Fibronectina	BD Bioscience	Ratón	Monoclonal	240 kDa.
Actina	BD Bioscience	Ratón	Monoclonal	42 kDa.
RE	Abcam	Conejo	Monoclonal	67 kDa.
RP	Abcam	Ratón	Monoclonal	99 kDa.
HER-2	Biorbyt	Ratón	Monoclonal	138 kDa.
RhoC GTPasa	Biorbyt	Conejo	Policlonal	21 kDa.
WISP-3	Biorbyt	Conejo	Policlonal	37 kDa.
VEGFA	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	Policlonal	42 kDa.

Tabla 5: Relación de anticuerpos primarios utilizados en western blot.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del bloqueo de las proteínas, se desechó la solución de TBS-tween y leche y se le añadió la solución de anticuerpo primario a las membranas. Las placas con las membranas y el anticuerpo primario se dejaron incubar toda la noche a 4°C y en agitación continua.

Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS durante 5 min. Posteriormente, se preparó la dilución del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Cell Signalling; Beverly, MA, EEUU) (1:10.000) en

TBS-tween con 5% de leche polvo. El anticuerpo secundario utilizado en cada caso dependía del animal del que proceda el anticuerpo primario (ratón o conejo). Una vez finalizados los lavados, las membranas se expusieron a la dilución del anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente.

9.5 Revelado de membranas.

Transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo secundario, las membranas se volvieron a lavar 3 veces con TBS durante 5 min cada lavado. Posteriormente, las membranas fueron expuestas a la solución de revelado (Thermo Scientific; Waltham, MA, EEUU) durante 30 segundos e inmediatamente después fueron colocadas en una cubierta de plástico transparente enjuagada con etanol al 70% y metida directamente en un casete de exposición para que las membranas estuvieran en oscuridad.

En un cuarto oscuro, se abrió el casete y se puso encima de la cubierta de plástico una hoja de película fotográfica entre 30 segundos y 1 minuto. Por último, la película fotográfica se reveló utilizando un densitómetro de Kodak, obteniéndose finalmente las bandas correspondientes a cada marcador.

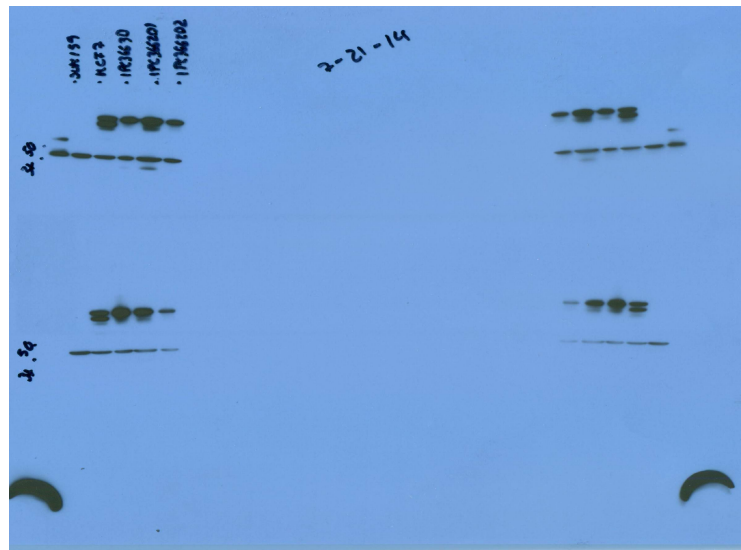


Figura 22: Revelado de inmunotinción en película fotográfica.

10. Ensayos de tumorigenicidad

Las células procedentes de las líneas celulares IPC-366 y SUM149 fueron inoculadas en ratones inmunodeprimidos para observar el crecimiento tumoral. En este apartado, se describirán los ratones utilizados en cada ensayo además de la forma de inoculación de las células.

10.1 Animales

En los capítulos 1, 2 y 3 de la presente Tesis Doctoral el número de animales utilizados fue distinto; sin embargo la especie y la edad fue la misma. El número de animales utilizado fue de 10, 40 y 60 ratones para cada uno de los capítulos respectivamente. En los capítulos 1 y 2 se utilizaron ratones hembra de 6-8 semanas de edad, Fox Chase SCID® Beige CB17.Cg-PrkdcscidLystbg-J/Crl (Charles River, MA, USA). En el capítulo 3, se utilizaron

30 ratones macho y 30 ratones hembra de 6-8 semanas de edad de la cepa anteriormente descrita.

Los animales fueron alojados en jaulas (5 animales por jaula), dentro de un aislador flexible, en una habitación con condiciones ambientales controladas (20-22°C; 50 a 55% de humedad relativa; 10-15 cambios de aire/hora; y un ciclo luz-oscuridad de 12:12h) en el animalario del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria (UCM), registrado en la Comunidad Autónoma de Madrid (Nº de registro: ES-28079-0000090). El alimento y el agua, previamente esterilizados, se suministraron *ad libitum*.

Los protocolos clínicos y experimentales de este estudio fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Complutense de Madrid (Nº de registro: PROEX 065/15). Todos los procedimientos se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y se ajustaron a la Directiva pertinente de la UE.

10.2 Inoculación de las células

A los ratones utilizados se les inoculó subcutáneamente a la altura de la cuarta glándula mamaria inguinal, una suspensión de 10^6 células adherentes y de 2×10^4 células no adherentes de IPC-366 y SUM149.

Los animales fueron inspeccionados dos veces por semana para observar el desarrollo de tumores. Una vez detectados los tumores, los ratones se controlaron semanalmente mediante palpación y la medición del tumor se realizó con calibre de precisión.

Para el cálculo del volumen tumoral se midió el diámetro longitudinal (longitud) y el diámetro transversal (ancho) del tumor, y se calculó mediante la fórmula elipsoidal modificada: volumen = $1/2$ (longitud x anchura²). Los ratones

fueron sacrificados con una dosis letal de isoflurano, cuando el volumen del tumor alcanzó los 1.500 mm³. Después del sacrificio de los ratones, los tumores y los órganos de interés (hígado y pulmón) se recogieron en la necropsia para el examen histológico.



Figura 23: Necropsia de ratón inoculado con células de IPC-366.

Por otro lado, en el capítulo 3, se analizaron las concentraciones de hormonas esteroides en suero de 10 ratones hembra y 10 ratones macho. Las extracciones de sangre de estos ratones se realizaron en el plexo venoso submandibular con ayuda de una lanceta. La sangre fue centrifugada a 1.452 x g, 20 min a 4°C y se extrajo el suero para el posterior análisis hormonal.

10.3 Examen histológico de los tumores

Los tumores y órganos recogidos de los ratones inoculados con células adherentes y no adherentes, de IPC-366 y SUM149 fueron fijados en formalina tamponada al 10% (pH = 7,4), incluidos en parafina y teñidos con H&E para el análisis histológico, según procedimientos rutinarios del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario Complutense de la UCM.

10.4 Homogeneizados de tumores

Una parte de los tumores recogidos en las necropsias de los ratones fue congelada hasta que se realizó el macerado tumoral. Para ello, se pesaron 0,5 g de tejido que se cortó y se introdujo en un macerador Pobel con 5 ml de PBS.

Posteriormente, se maceró el tejido hasta que estuviera homogeneizado y el líquido resultante se pasó a un tubo de ensayo que se centrifugó a 1.452 x g, 20 min a 4°C. Por último, se recogió el sobrenadante en tubos debidamente etiquetados y se congeló hasta su posterior análisis hormonal.

11. Técnicas EIA

Para la determinación de las concentraciones de hormonas esteroides en los macerados de tumores y sueros se realizó una técnica EIA de competición. Sin embargo, en el caso de los medios de cultivo, se desarrolló una técnica EIA de amplificación.

Tanto en macerados y sueros como en los medios de cultivo, las hormonas esteroides a determinar fueron P4, A4, E1SO4, E2 y T. Las técnicas EIA utilizadas han sido desarrolladas y validadas en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid).

El EIA de competición se basa en la competición que se establece entre la hormona libre sin marcar (estándar o problema) y la hormona marcada con peroxidasa (HRP), por unirse a un anticuerpo específico fijado a una fase sólida. Posteriormente, mediante una reacción colorimétrica que se produce entre la enzima y un sustrato-cromógeno, es posible medir la cantidad de hormona unida al anticuerpo. La técnica EIA de amplificación es una variante

del EIA de competición. En esta variante no existe tal competición, sino que se favorece que la hormona problema se una al anticuerpo y, posteriormente, el conjugado se une a los sitios de unión con el anticuerpo que hayan quedado libres.

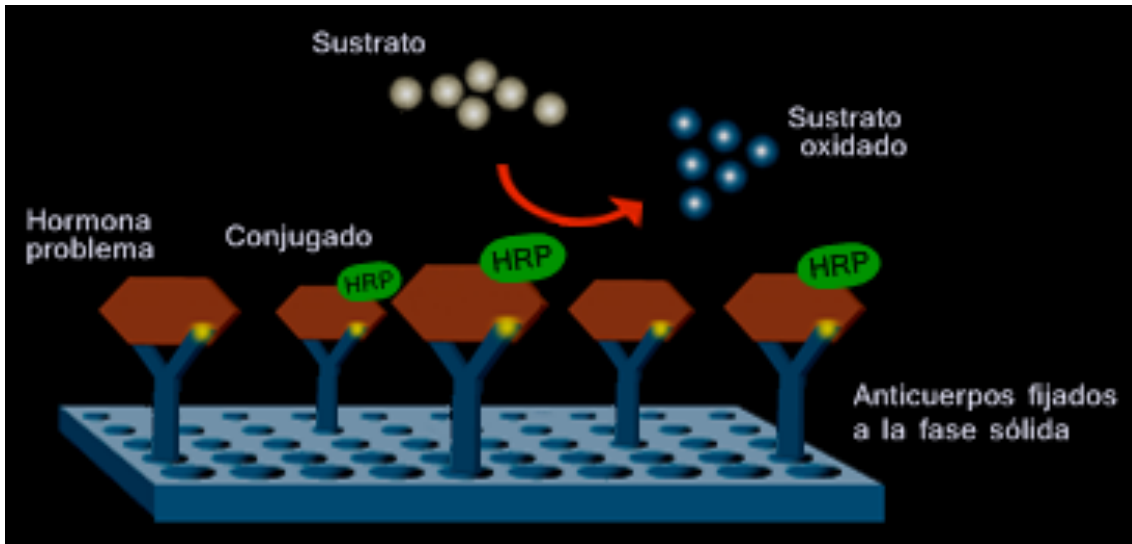


Figura 24. Esquema de EIA de competición.

11.1 Desarrollo de las técnicas EIA

Ambas técnicas, tanto el EIA de competición como el de amplificación, comparten pasos del proceso. A continuación se detalla el protocolo a seguir del EIA de competición incluyendo, donde sea pertinente, las modificaciones que se llevan a cabo en el EIA de amplificación.

En la siguiente tabla, se resumen todos los anticuerpos y conjugados utilizados en esta técnica, así como las diluciones utilizadas y los tiempos de incubación de sustrato.

Anticuerpo	Dilución	Conjugado	Dilución	Tiempo de Sustrato
Anti-A4 (C9111)	1/4.000	A4 3CMO:HRP	1/20.000	30 min
Anti-E1 GLUC (R522-2)	1/4.000	E1 GLUC:HRP	1/40.000	5 min
Anti-E2 (C6E91)	1/4.000	E2 3CMO:HRP	1/40.000	10 min
Anti-P4 (CL425)	1/6.000	P4 3CMO:HRP	1/80.000	5 min
Anti-T (R156)	1/8.000	T 3CMO:HRP	1/40.000	5 min

Tabla 6: Anticuerpos y conjugados utilizados para las técnicas EIA.

11.1.1 Extracción de hormonas esteroideas en muestras de sueros

Antes de comenzar con la técnica, para la determinación de las hormonas E2 y P4 en las muestras de suero, éstas deben ser extraídas, ya que la hormona se encuentra unida a proteínas de transporte.

En el caso de E2, se tomaron 20 µl de suero y se disolvieron en 2 ml de éter dietílico (Panreac, Barcelona). Dicha mezcla se agitó en un vórtex (Reax 2000, Heindolph) durante 40 segundos. A continuación, se sumergió una gradilla con los tubos de ensayo en una cubeta con metanol (Panreac, Barcelona) y nieve carbónica de tal manera que en el fondo del tubo se formó un sedimento congelado y un sobrenadante líquido, donde se encontraba el esteroide libre. Este sobrenadante se volcó a otro tubo de ensayo limpio y se mantuvo durante 24 horas en campana de extracción para su completa evaporación.

Para la extracción de P4, se tomaron 20 µl de la muestra y se disolvieron en 2 ml de éter de petróleo (Panreac, Barcelona). El proceso de extracción fue el mismo que para E2.

11.1.2 Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida

En esta primera fase del ensayo se tapizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-one; Frickenhausen, Alemania) con la dilución apropiada del anticuerpo para la hormona a determinar (Tabla 6). Todas las diluciones de anticuerpo se realizaron en buffer coating (carbonato sódico (0.05M), carbonato de sodio hidrógeno (0.05M), thimerosal 1%; pH: 9,6).

Una vez realizadas las diluciones de anticuerpo, se añadieron 100 µl de las mismas en todos los pocillos de la placa dejando libre el primer pocillo para utilizarlo como blanco. Por último, las placas se sellaron con una tapa de acetato y se dejaron incubar 16 horas a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las placas tapizadas con solución de lavado utilizando un lavador de placas (Anthos Washer Fluido 1WK Model 24 500, Anthos Labtec Instruments, USA).

11.1.3 Preparación de las curvas estándar

Para trazar la curva estándar de cada una de las hormonas, se partió de una solución madre de hormona esteroide, a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas de la misma en etanol absoluto (Panreac, Barcelona), hasta obtener un total de 6 estándares (0,1 pg; 1 pg; 10 pg; 100 pg; 1000 pg; 10000 pg/100 µl). Se prepararon seis tubos con 10 µl de cada uno de los estándares. Posteriormente, se evaporó el etanol en un evaporador y el extracto se disolvió en 500 µl de conjugado.

Cuando se tapizó la placa con las muestras, se añadieron 50 µl de cada estándar con conjugado y 50 µl de buffer EIA (Fosfato de sodio dihidrógeno

monohidratado (0.01M), fosfato di-sodio hidrógeno anhidro (0.01M), cloruro de sodio (0.9M), BSA 1%, Thimerosal 1%; pH: 7,0) en los pocillos apropiados de la placa.

11.1.4 Reacción de competición

Este paso solo se da en la técnica EIA de competición. En esta fase tiene lugar la reacción entre la hormona libre (muestra estándar o muestra problema) y la hormona conjugada con peroxidasa. Para ello se realizó una dilución de conjugado en solución buffer EIA.

Las diluciones y conjugados utilizados se han descrito anteriormente en la Tabla 6. Una vez obtenida la dilución de conjugado, se añadieron 250 µl de la misma en 50 µl de las muestras problema. Sin embargo, a las muestras de sueros extraídas previamente, se les añadió 150 µl de conjugado. Con esta mezcla de muestra (extraída o no extraída) y conjugado, se tapizaron los pocillos de la placa añadiendo 60 µl de la misma y 40 µl de buffer EIA. Cada muestra se analizó por duplicado.

Por último, se volvieron a tapar las placas y se dejaron incubar 2 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) y en agitación.

11.1.5 Tapizado de placas para el EIA de amplificación

En esta técnica, la hormona de la muestra y el conjugado no compiten por unirse al anticuerpo, por lo tanto, la realización del tapizado de la placa difiere en la metodología.

Una vez lavada la placa, se dispensaron 50 µl de estándares de cada hormona y 50 µl de buffer EIA, además de 60 µl de muestra y 40 µl de buffer EIA en los pocillos correspondientes por duplicado. A continuación, se cubrió la placa y se dejó incubando en agitación a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, sin lavar la placa, se añadieron 50 μ l de la dilución de conjugado correspondiente en todos los pocillos de la placa. Se taparon las placas y se dejaron incubando 2 horas a temperatura ambiente y agitación.

11.1.6 Adición del sustrato y del cromógeno

En primer lugar, se lavaron las placas; de esta forma, se tiene en la placa sólo la cantidad de hormona que se haya unido al anticuerpo.

Como sustrato se utilizó peróxido de hidrógeno que va diluido en un tampón sustrato que lleva el cromógeno timidilbencidina (Enhanced K Blue, Neogen, USA). Se añadieron 100 μ l del mismo en todos los pocillos. Posteriormente, se selló y se incubó a temperatura ambiente el tiempo necesario según la hormona (Tabla 6).

Transcurrido este tiempo, se frenó la reacción enzimática añadiendo 100 μ l de una solución de ácido sulfúrico al 10% en todos los pocillos de la placa.

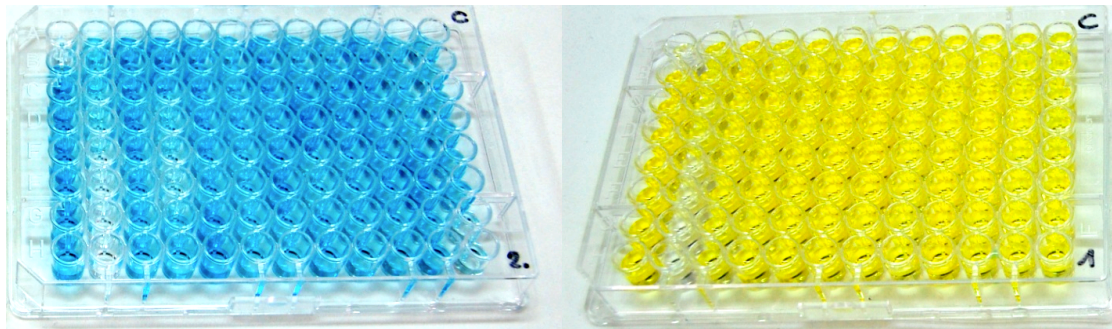


Figura 25: Placas de EIA antes y después del frenado de la placa.

11.1.7 Lectura de las placas.

Se basa en cuantificar la densidad óptica del color desarrollado en cada pocillo. Para ello se utilizó un lector automático EIA (Microplate Reader A4, Eurogenetics, Bélgica) con filtros de 450 y 600 nm, y de lectura bicromática, lo cual elimina el color producido por una posible reacción inespecífica de fondo.

11.1.8 Procesado de los resultados

Los resultados se evaluaron mediante un software diseñado por el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, EEUU) que traza las curvas patrón enfrentando en el eje de abscisas las concentraciones estándar de las hormonas y en el eje de ordenadas el porcentaje de unión de las muestras con el anticuerpo. Una vez calculadas las curvas patrón, el programa calcula las concentraciones hormonales de las muestras tomando como referencia estas curvas.

Para expresar las concentraciones en unidades correctas se introdujo un factor de corrección. En el caso de los medios de cultivo y sueros las concentraciones se expresaron en ng/ml, excepto las concentraciones de E2 en suero que se expresaron en pg/ml. Sin embargo, en el caso de los macerados, las concentraciones se expresaron en ng/g.

11.2 Parámetros de validación de la técnica EIA.

La validación de la técnica EIA se llevó a cabo determinando una serie de parámetros:

Especificidad: se estudian las reacciones cruzadas de los anticuerpos con distintos esteroides. La reactividad cruzada que presenta un esteroide frente a otro la podemos definir como: la concentración del esteroide problema que causa una reducción del 50% de la unión inicial al anticuerpo, dividido por la concentración del esteroide que presenta la reacción cruzada y que causa la misma reducción de la unión al anticuerpo (Abraham, 1975). Para la realización de estas pruebas se empleó un rango de concentración

de 0 a 5 ng de esteroide/pocillo (0 pg; 10 pg; 50 pg; 100 pg; 500 pg; 1 ng; 5 ng), para todas las hormonas testadas.

Límite de detección: es la concentración hormonal que se puede distinguir de cero.

Paralelismo: se realizó comparando diluciones seriadas de un conjunto de muestras (pool) y la curva estándar, demostrando que las curvas de unión de distintas diluciones del pool son paralelas a las curvas estándar en un rango de concentración de 1:1 a 1:50.

Linealidad: se realizaron diluciones seriadas del mismo pool de muestras y se compararon con el porcentaje de unión al anticuerpo.

Porcentajes de recuperación: se calcularon añadiendo cantidades conocidas de hormona a un pool de muestras con concentraciones bajas y altas de dicha hormona.

Precisión: se realizó calculando los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo. El coeficiente intra-ensayo se calculó analizando un pool de muestras 10 veces dentro de un mismo ensayo. El coeficiente inter-ensayo se calculó analizando el mismo pool 10 veces en ensayos consecutivos.

12. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el apoyo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el empleo de los programas estadísticos SAS 9.4 (Statistical Analysis Systems, SAS/STAT, Inst. Inc, Cary NC, EEUU) y Sigma Plot (Systat software Inc, Chicago, IL, EEUU).

Se analizaron variables estadísticas sobre:

- Líneas celulares IPC-366 y SUM149.
- Determinaciones histológicas e inmunohistoquímicas.
- Número de mamíferas cultivadas en sucesivos pases.
- Viabilidad celular en condiciones adherentes y no adherentes.
- Crecimiento de células adherentes y no adherentes *in vivo*.
- Crecimiento de células en ratones macho y hembra.
- Parámetros de crecimiento tumoral: % de tumores, tiempo de tumor palpable, tiempo en el que se alcanza un volumen tumoral de 1.500 mm³, % ulceraciones, % metástasis.
- Concentraciones de P4, T, A4, E1SO4 y E2 en macerados, sueros y medios de cultivo.
- Parámetros de validación de la técnica de EIA de amplificación: precisión, sensibilidad, coeficientes de variación y paralelismo.

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de todas las variables numéricas incluyendo los valores de media, desviación estándar y error estándar.

En el análisis descriptivo de las variables categóricas se obtuvieron las frecuencias y los porcentajes de las categorías. Las variables histológicas e inmunohistoquímicas son variables categóricas, por lo que para su análisis estadístico se empleó el test de chi-cuadrado (χ^2).

En el crecimiento de las mamíferas de las líneas celulares se establecieron 2 grupos: mamíferas de IPC-366 y mamíferas de SUM149. En primer lugar, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff para evaluar la distribución de los datos. Dado que los datos no seguían una normalidad, se

utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los datos y la prueba de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar las medias.

En el caso de la viabilidad celular medida por el análisis de MTS, los test estadísticos utilizados fueron los mismos.

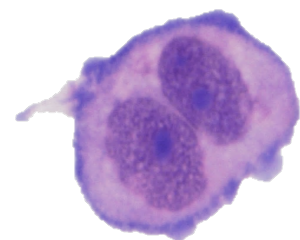
En las pruebas de tumorigenicidad o crecimiento de las células en ratones SCID, se realizó el test de Suma de Rangos de Wilcoxon para comparar las dos líneas celulares (IPC-366 y SUM149) en cada grupo (por un lado, células adherentes y no adherentes; y por otro lado, machos y hembras). Para las comparaciones entre grupos en cada línea, se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparaciones múltiples para ver las comparaciones por pares, en el caso de que el contraste general fuera significativo. Para las comparaciones entre las semanas en cada línea celular y grupo se realizó el test de Rangos Signados de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni.

Los resultados de niveles hormonales en sueros y macerados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias de los grupos se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA), seguido de las pruebas de comparaciones múltiples post hoc.

Para la estadística de los parámetros de validación de la técnica EIA de amplificación se utilizó el análisis ANCOVA. Para la comparación las concentraciones hormonales y las líneas celulares se utilizó un análisis de regresión lineal.

En todos los análisis estadísticos el nivel de confianza fue del 95% y se consideraron diferencias estadísticamente significativas para los valores $p < 0,05$. Los resultados han sido expresados como media \pm error estándar.

**CAPÍTULO I:
Establecimiento y caracterización
de la nueva línea celular de IMC:
IPC-366**



1. Resumen

El IMC comparte las características epidemiológicas, histopatológicas y clínicas con la enfermedad en los seres humanos y se ha propuesto como un modelo natural de IBC. Existen pocas líneas celulares disponibles para el estudio del IBC, siendo las más utilizadas: SUM149 y SUM190.

Por ello, el objetivo de este estudio es caracterizar una nueva línea celular de IMC (IPC-366) para el estudio comparativo de ambas enfermedades. Para lo cual, se recogieron muestras de tejido tumoral de una perra diagnosticada de IMC y se aislaron las células tumorales *in vitro*. El diagnóstico patológico fue confirmado en el Servicio de Patología Veterinaria del Hospital Clínico Veterinario de la UCM. Con el fin de caracterizar la nueva línea celular, se evaluaron las características de crecimiento, citológicas, ultraestructurales y de inmunohistoquímica (IHC) además de la capacidad tumorigénica y el potencial metastásico *in vivo* de IPC-366 así como su patrón cromosómico.

El examen histológico y citológico de los frotis y secciones ultrafinas para microscopía electrónica revelaron que IPC-366 está formada por células poligonales caracterizadas por marcada atipia, con núcleos grandes altamente malignos, nucleolos prominentes y la frecuente aparición de células multinucleadas. Ultraestructuralmente, se aprecian espacios vacíos citoplasmáticos, cubiertos por la membrana citoplasmática, en algunas células que se asemejan a las células endoteliales de los capilares, lo que anteriormente se ha descrito como VM. La caracterización IHC de IPC-366 reveló que se trata de una línea de subtipo basal, triple negativa con sobreexpresión de E-cadherina y COX-2 y un alto índice de proliferación Ki67 (87,15%). El análisis citogenético reveló que el 31% de las células presentaba

al menos una o más anormalidades cromosómicas, algunas de las cuales involucraban a los cromosomas X, 12 y 17. Además IPC-366 es altamente tumorigénica, originando tumores *in vivo* 2 semanas después de la inoculación de las células en ratones hembras SCID y, con capacidad de metastatizar en pulmón, hígado y ganglios linfáticos.

En resumen, la línea celular IPC-366 es una línea celular de IMC triple negativa, altamente maligna y postulada como un modelo de crecimiento rápido que, puede ser utilizada para el estudio comparativo en ambas especies: canina y humana.

2. Diseño Experimental

Este estudio se dividió en 2 partes:

- ✚ En primer lugar, el desarrollo de la línea celular IPC-366.
- ✚ Posteriormente, la caracterización de la misma.

Para el desarrollo de la línea celular, se recogió, en condiciones de esterilidad, el tumor diagnosticado como IMC en la necropsia realizada por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. A partir del tumor se realizó el cultivo primario de las células, y tras una sucesión de pases se estableció IPC-366 como una línea celular inmortal.

Para su caracterización se determinaron distintos parámetros:

- ✚ Morfología de las células por observación directa al microscopio invertido, en pellets teñidos con H&E y por microscopía electrónica.
- ✚ Establecimiento de una curva de crecimiento del cultivo celular.
- ✚ Caracterización del inmunofenotipo de las células mediante técnicas IHC: midiendo la expresión de los marcadores pancitoqueratinas, citoqueratina 14, vimentina, p63, RE, RP, HER-2, COX-2, Ki67 y E-cadherina.
- ✚ Determinación del patrón cromosómico de las células mediante análisis citogenéticos.
- ✚ Valoración de las condiciones de crecimiento *in vivo* al inocular las células en ratones hembra SCID.
- ✚ Estudio histológico de los tumores recogidos por H&E.

RESEARCH ARTICLE

Establishment and Characterization of a New Cell Line of Canine Inflammatory Mammary Cancer: IPC-366

Sara Caceres¹, Laura Peña², Paloma J. de Andres², Maria J. Illera¹, Mirtha S. Lopez³, Wendy A. Woodward³, James M. Reuben^{4*}, Juan C. Illera¹

1 Department of Animal Physiology, Surgery and Pathology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), Spain, **2** Department of Animal Medicine, Surgery and Pathology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), Spain, **3** Department of Radiation Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, United States of America, **4** Department of Hematopathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, United States of America

* jreuben@mdanderson.org



OPEN ACCESS

Citation: Caceres S, Peña L, de Andres PJ, Illera MJ, Lopez MS, Woodward WA, et al. (2015) Establishment and Characterization of a New Cell Line of Canine Inflammatory Mammary Cancer: IPC-366. PLoS ONE 10(3): e0122277. doi:10.1371/journal.pone.0122277

Academic Editor: Rajeew Samant, University of Alabama at Birmingham, UNITED STATES

Received: November 28, 2014

Accepted: February 17, 2015

Published: March 25, 2015

Copyright: © 2015 Caceres et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Funding was provided by the Spanish Ministry of Science and Education (research project no. SAF 2009-10572) to SC, LP, PJA, MJ, and JCI. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Canine inflammatory mammary cancer (IMC) shares epidemiologic, histopathological and clinical characteristics with the disease in humans and has been proposed as a natural model for human inflammatory breast cancer (IBC). The aim of this study was to characterize a new cell line from IMC (IPC-366) for the comparative study of both IMC and IBC. Tumors cells from a female dog with clinical IMC were collected. The cells were grown under adherent conditions. The growth, cytological, ultrastructural and immunohistochemical (IHC) characteristics of IPC-366 were evaluated. Ten female Balb/SCID mice were inoculated with IPC-366 cells to assess their tumorigenicity and metastatic potential. Chromosome aberration test and Karyotype revealed the presence of structural aberration, numerical and neutral rearrangements, demonstrating a chromosomal instability. Microscopic examination of tumor revealed an epithelial morphology with marked anisocytosis. Cytological and histological examination of smears and ultrathin sections by electron microscopy revealed that IPC-366 is formed by highly malignant large round or polygonal cells characterized by marked atypia and prominent nucleoli and frequent multinucleated cells. Some cells had cytoplasmic empty spaces covered by cytoplasmic membrane resembling capillary endothelial cells, a phenomenon that has been related to s vasculogenic mimicry. IHC characterization of IPC-366 was basal-like: epithelial cells (AE1/AE3+, CK14+, vimentin+, actin-, p63-, ER-, PR-, HER-2, E-cadherin, overexpressed COX-2 and high Ki-67 proliferation index (87.15 %). At 2 weeks after inoculating the IPC-366 cells, a tumor mass was found in 100 % of mice. At 4 weeks metastases in lung and lymph nodes were found. Xenograph tumors maintained the original IHC characteristics of the female dog tumor. In summary, the cell line IPC-366 is a fast growing malignant triple negative cell line model of inflammatory mammary carcinoma that can be used for the comparative study of both IMC and IBC.

Introduction

Inflammatory mammary cancer (IMC) is the most aggressive mammary neoplasia that affects female dogs [1, 2]. Its counterpart disease in humans is known as inflammatory breast cancer (IBC) and accounts for less than 6% of human breast cancer diagnoses with a poor survival in women [3, 4]. In both species, this type of cancer is highly angiogenic and angioinvasive [5–8]. The main histological characteristic of the disease in both species is the massive invasion of dermal lymphatic vessels by neoplastic cells which blocks lymph drainage causing the characteristic edema [1, 9].

There are considerable epidemiologic, clinical and histopathological similarities shared by IBC and IMC, therefore the latter is considered a good spontaneous model to study the human disease [2, 8]. The use of cell lines in cancer research offers advantages in the examination of cell growth and progression [10–12]. More than 33 human breast cancer cell lines from primary tumors, metastatic tumors and pleural effusion have been established [10, 11, 13]. However, for performing studies on IBC, the cell lines availability are limited to SUM149, SUM 190 and MDA-IBC-3, FC-IBC02 [12, 14, 15].

In the last years several canine mammary carcinoma cell lines have been developed [16–18] although, none of them is a canine inflammatory cell line. Thus, it is desirable to develop and establish a canine IMC cell line to compare the inflammatory breast cancer type in both species and to facilitate further in vitro studies. The aim of this study was to establish the first IMC cell line (IPC-366) and to characterize it in terms of immunophenotype and tumorigenicity.

Materials and Methods

Tumor specimen

An IMC cell line (IPC-366) was established from a canine primary IMC sample obtained immediately after euthanasia of a female dog clinically and histopathologically diagnosed with IMC, according to the previously IMC diagnostic features published for this species [1, 19]: rapidly growing disease in the mammary glands and overlaying skin, with erythema, firmness, warmth, edema, thickening, and signs of pain, according to the referring veterinary clinician. The original canine mammary tumor was diagnosed as a solid carcinoma with multiple tumor emboli in superficial dermal lymphatic vessels (Fig. 1), confirming the diagnosis of IMC [2, 20]. After euthanasia, tumor samples were rapidly obtained at necropsy and processed for histopathological confirmation of IMC and cell culture. Tumor fragments (1.5 cm) were placed in Modified Eagle's Medium (MEM) with penicillin-streptomycin solution (Sigma Aldrich, Madrid).

The histopathology and necropsy was performed at the Pathology Service of the Complutense Veterinary Clinical Hospital (Complutense University of Madrid). The Institutional Animal Care and Use Committee of the University Complutense of Madrid, Spain approved the clinical and experimental protocols for this study (number: 115). All procedures were completed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and conformed to the relevant EU Directive.

Establishment of the cell line

Tumor tissue was fragmented and washed (3 times) with Hank's Balanced Salt Solution with 1% of penicillin-streptomycin solution (Sigma Aldrich). Then, the tumor fragments were disaggregated with collagenase type 1A (Sigma Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide for 2 hours with continuous agitation. Thereafter, the disaggregated tissue suspension was centrifuged at 1000 rpm, 20°C for 5 min and the pelleted cells resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) containing

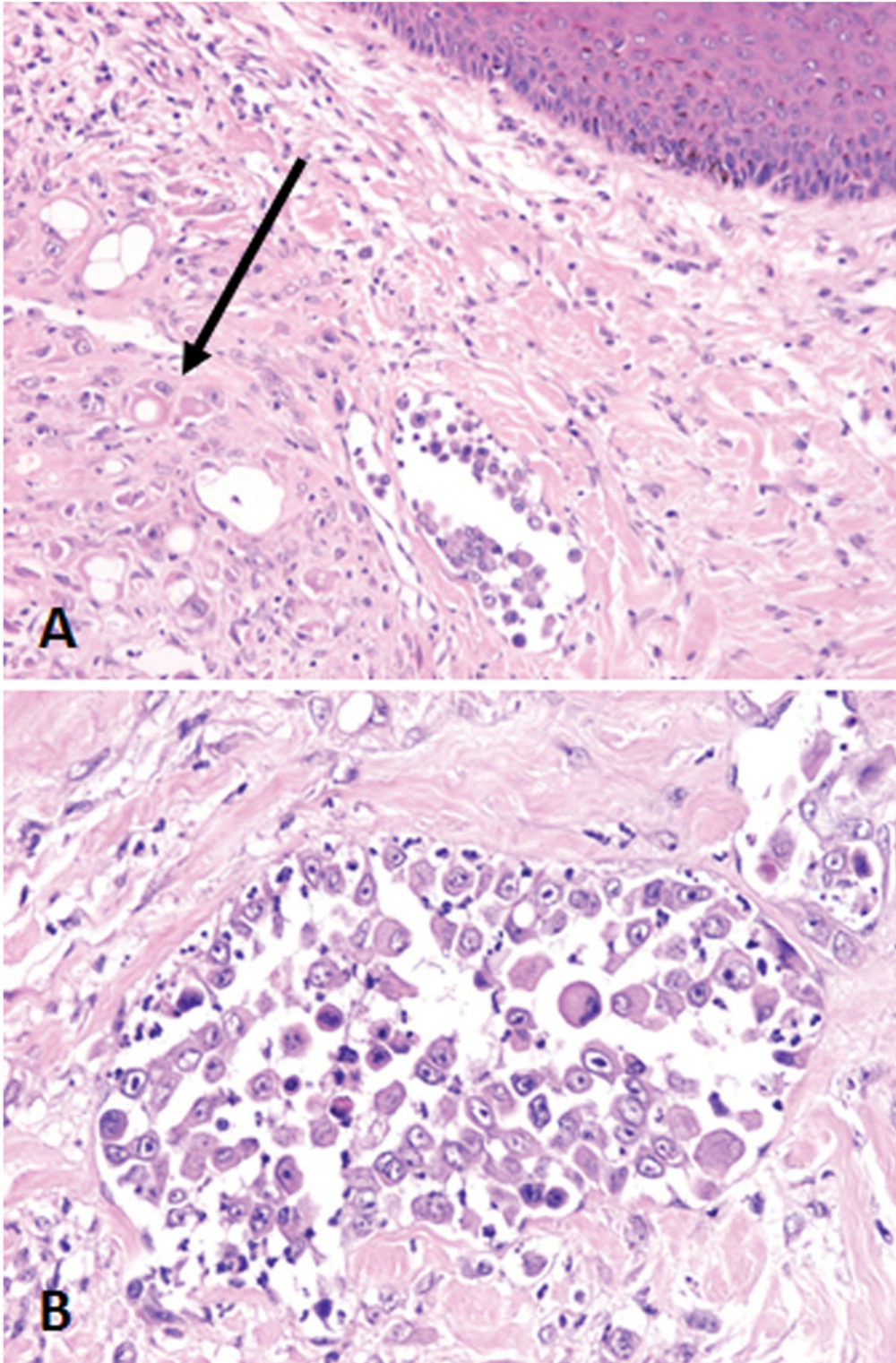


Fig 1. Primary canine inflammatory mammary carcinoma origin of the cell line IPC-366. Tumor paraffin sections, H&E. A (10X) y B (20X). Neoplastic emboli in superficial dermis. Tumor cells exhibit marked anisocytosis and anisokaryosis, and evident large nucleoli. Infiltrating tumor cells (arrow).

doi:10.1371/journal.pone.0122277.g001

10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich), 1% penicillin-streptomycin solution and 1% L-glutamine (Sigma Aldrich). The cell suspension was placed in 25-cm² culture flasks (Controltecnic Instruments, Madrid) and maintained in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C. Cell culture was observed daily by a phase-contrast microscopy.

Once the cultured cells reached 90% confluence they were washed with Hank's balanced salt solution supplemented with penicillin-streptomycin solution and dispersed in 0.25% trypsin (Sigma Aldrich) with PBS containing EDTA. Subcultures were prepared from dispersed cells by reseeding in new 25 cm² flasks at a concentration of 1x10⁵ cells/ml. Other dispersed cells were suspended in DMEM/F12 containing 20% FBS and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) and cryopreserved at -80°C. The establishment of IPC-366 was considered at passage 30th.

Growth Assay

Cells at passage 30th were seeded at 1x10⁵ cells in 25-cm² culture flasks and maintained in complete DMEM/F12 medium at 37°C for 7 days. Every 24 h, three replicative flasks were trypsinized and the cells were counted with a hemocytometer. A growth curve was established, and the cell growth doubling time was estimated from its exponential growth phase.

Tumorigenicity assay

Given the well-appreciated pros of murine xenograft models, a suspension of 10⁶ IPC-366 cells was subcutaneously inoculated in the ventral region of ten 8-weeks-old female Balb/SCID mice. The mice were inspected weekly for the development of tumors. When tumors were detected, they were weekly monitored by palpation and measured by calipers. Mice were sacrificed after 30 days of inoculation, and tumors and organs were collected at necropsy and placed in 4% paraformaldehyde (pH = 7.4) for histological examination.

Cytology, histopathology and immunohistochemistry

Cellular smears were prepared and stained using Diff-Quick for cytomorphological assessment. IPC-366 immunophenotyping was performed in canine original tumor and tumor pellets using the following markers (Table 1): pancytokeratin (AE1/AE3), cytokeratin 14 (CK14), p63,

Table 1. Technical data of specific antibodies and peroxidase-developing systems for immunohistochemistry.

Primary Antibody	Type, Clone*	Manufacturer**	Incubation	Detection system
Pancytokeratin	Mab AE1/AE3	Prediluted, MAD-001000QD	60min	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Cytokeratin 14	Mab LL02	AbD Serotec 1:1000 LL02	60 min	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
P63	Mab 4A4	Prediluted, MAD-000479QD	30 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Vimentin clone	Mab SP20	Prediluted, MAD-000326QD	20 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Smooth muscle actin	Mab 1A4	Prediluted, MAD-001195QD	30 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Estrogen Receptor	Mab 1D5	DAKO 1/30 M7047	60 min RT	Dako EnVision- HRP K4007
Progesterone Receptor	Mab 1E2	Prediluted Ventana 790–2223	90 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
HER-2	Pab	Dako A0485 1/1000	20 min RT	Dako EnVision-HRP K5007
COX-2	Mab SP21	Prediluted, MAD-000335QD	150 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
E-Cadherin	Mab EP700Y	Prediluted, MAD-000051QD	60 min RT	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK
Ki-67	Mab SP6	Prediluted, MAD 000310QD	90 min	UltraVision Quanto-HRP, MAD-021881QK

* Mab = monoclonal antibody, Pab = polyclonal antibody.

** MAD = Master Diagnostica.

doi:10.1371/journal.pone.0122277.t001

vimentin (vim), α -smooth muscle actin (sma), estrogen and progesterone receptors (ER and PR), Human Epidermal Receptor-2 (HER-2), cyclooxygenase-2 (COX-2), E-cadherin (E-Cad), and Ki-67 (proliferation marker). Paraffin sections were placed in a PT module (Lab Vision) containing an EDTA buffer solution (pH 8.0) (Master Diagnostica, MAD-004072R/D), heated for 20 minutes at 95°C and cooled down to 60°C. After this high temperature antigen retrieval protocol, slides were rinsed in warm tap water and placed in an automated Immunostainer device (Lab Vision Corporation, Fremont, CA) for immunohistochemistry using a peroxidase detection system (Table 1). After immunostaining the slides were counterstained with hematoxylin and permanently mounted with Depex. Corresponding negative control slides were processed by replacing the primary antibody with non-reactive antibody. Slides from human and canine mammary tumors with previously demonstrated reactivity to the primary antibody and tissue internal controls were used as positive controls.

The primary canine mammary tumor, the cell line and xenotransplanted tumors were considered positive for AE1/AE3, CK-14, p63, vimentin, actin, E-Cad and COX-2 when more than 10% of the neoplastic cells were positive [21]. Beside this, IPC-366 phenotype markers were scored in pellet sections by a computer assisted image analyzer (image J), counting up to 1000 cells. For HER-2 evaluation, 3+ positive scoring following the recommended guidelines of ASCO (American Society of Cancer Oncology, Her-2 3+) was considered. Ki-67 proliferation index (PI) was determined by counting Ki-67 positive and negative nuclei in 1000 neoplastic cells. Every immunostained nucleus was considered positive regardless of the intensity. The PI, or proportion of positive neoplastic cells in each sample, was calculated [22].

Electron microscopy

IPC-366 cells were harvested and fixed with 2.5% glutaraldehyde (Panreac, Barcelona, Spain) and 4% paraformaldehyde (Panreac) solution. Then the cells were incubated with 0.1 M cacodylate buffer at 4°C overnight. The fixed cells were treated with 2% osmium tetroxide (Panreac) and 3% ferrocyanide (Panreac) solution (diluted in PBS) for 1 h. They were then washed in distilled water and dehydrated in acetones of increasing percentage (30, 50, 70, 80, and 100%). The samples were gradually infiltrated in a Müllenhauer mixture resin (Lowicryl resin, Sigma Aldrich), and solidified at 60 8°C for 24 h. The embedded cells were sectioned at the National Electron Microscopy Center (Madrid). Images were obtained using a JEOL JEM 3000F transmission electron microscope.

Cytogenetic analyses

Chromosome preparation for aberration Chromosome (AC) and G banding, were obtained from short term cell culture with Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM-F12 (Lonza, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Atlanta Biologicals, USA), 1% penicillin-streptomycin solution and 1% L-glutamine (Gibco- life Technology, USA). The cell suspension was placed in 75 cm² culture flasks (Corning, USA) and was maintained in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C for 54h. Colcemid (Gibco- Life Thecnology,USA) was added for 2h before the cell suspension was harvested. The preparation followed methods for hypotonic treatment (KCL) (Sigma Aldrich, USA) and fixation with 3:1 methanol:glacial acetic acid (Sigma Aldrich, USA). Slides were allowed to age before the staining with Giemsa and G banding [23]. The results were processed with Applied Spectral Imaging, Version 6.0 for the review of the metaphases and Karyotyping.

Results

Microscopic morphology of IPC-366 and growth assay

IPC-366 cells adhered to culture flasks presented epithelium-like morphology and characteristics (Fig. 2A). Histological observation of IPC-366 cells in smears and H&E stained paraffin sections from pellets revealed large or very large round cells (mean diameter = 18.01 μm , minimum = 7.35 μm —maximum 583.33 μm). Cytoplasm was slightly basophilic and frequently contained basophilic aggregates. The nuclei were very large (minimum = 5.25 μm —maximum = 13.38 μm) with evident large and numerous nucleoli (minimum = 3.74 μm —maximum = and 8.24 μm). Anisocytosis and anisokaryosis were marked. Frequently, IPC-366 cells showed multiple coalescent cytoplasmic clear vacuoles and elongated eccentric nucleus. Some large cells presented morphological features of endothelial cells: a rim of elongated encircled cytoplasm containing elongated eccentric nuclei (endothelial-like cells, ELCs, suggestive of vasculogenic mimicry) (Figs. 2B, 3A and 3B). Highly malignant multinucleated cells were frequently seen (8.72% of multinucleated cells in a 20X microscopic field).

Tumorigenicity

Injected IPC-366 cells into the ventral side of female Balb/SCID mice originate tumors after 2 weeks of inoculation (100% of inoculated mice, $n = 10$, length: 0.6 and 0.9 cm^3 , width: 0.2 and 0.4 cm^3). Two weeks after the observation of the xenotransplanted tumors their size was up to 1.5 cm^3 and mice were euthanized (length: between 1.3 and 1.7 cm^3 , and width: between 0.8 and 1.2) (Fig. 5A). The histological examination revealed a highly infiltrating, poorly demarcated, unencapsulated densely cellular neoplastic growth, extending to the dermis and striated muscle. Neoplastic cells arranged in solid masses with scant stromal and had similar morphology and malignancy to that described for IPC-66. Mitotic index was very high and atypical mitoses were frequently observed. (Fig. 5B-C). The presence of emboli on dermis capillaries (Fig. 5D) confirmed the histological characteristic of inflammatory mammary carcinoma. The presence of vasculogenic mimicry (highly malignant tumor cells resembling endothelial cells and surrounding vascular spaces (vasculogenic mimicry) (Fig. 5E), was a frequent finding.

Immunohistochemical characterization of IPC-366 phenotype

Primary canine inflammatory mammary carcinoma and IPC-366 cells presented similar immunoreaction to the immunophenotype markers used. They were positive to a general epithelial cell marker (pancytokeratin, AE1/AE3), and a basal cell marker (CK14), with a 95.11% and 92.58% of positive cells in the pellet, respectively (Fig. 6A-B). All samples had also a positive reaction to vimentin, showing the IPC-366 an 81.14% of positive cells in the pellets. (Fig. 6C). Myoepithelial cell markers p63 and actin were negative (Fig. 6D-E), as well as hormonal receptors (ER, PR), and HER-2. (Fig. 6F-H). More than 90% of IPC-366 overexpressed E-Cad (Fig. 6I) and COX-2 (Fig. 6J-K). COX-2 immunolabelling was very strong in 10% of cells. All samples had a high proliferation rate measured with Ki-67. The mean Ki-67 proliferation index of IPC-366 in pellets was 87.15% (Fig. 6L).

Cytogenetic analyses

The analysis was made after two cell cycles, The cells were divided for chromosome aberration (AC) test and Karyotype. Four hundred cells were examined and 69% of the cells showed the normal karyotype ($2n = 78$). On the other hand, metaphases examined detected at least one or more abnormalities in 31% of the cells (Table 2). The autosomes chromosomes have similar

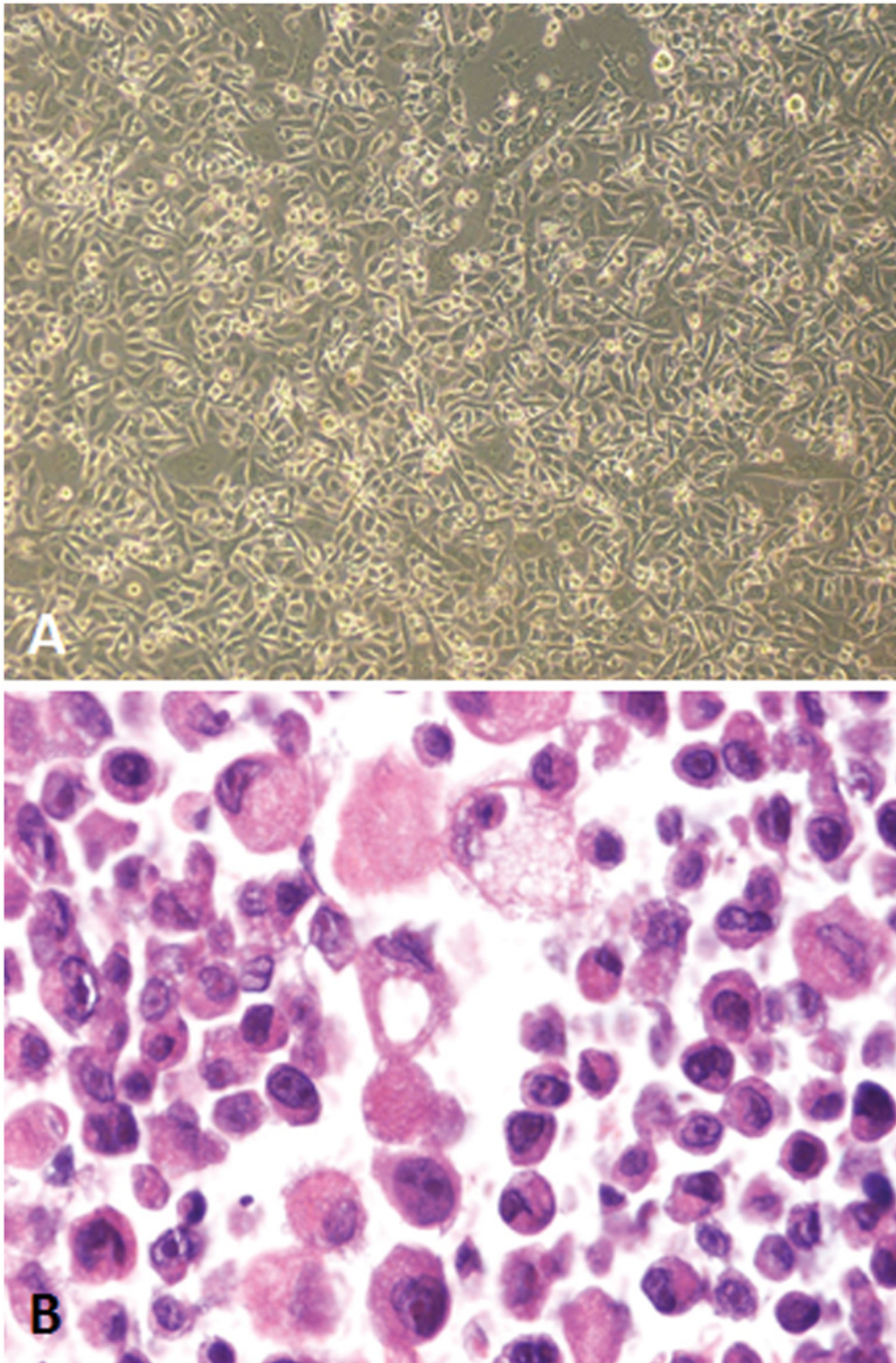


Fig 2. Morphology of IPC-366 cells. A) IPC-366 cells in culture at inverted microscopy (40X). B) IPC-366 pellet; paraffin section, H&E (40X). Highly malignant tumor cells with epithelial morphology; marked anisocytosis and anisokaryosis and evident nucleoli. Endothelial-like cell (ELC) showing cytoplasmic clear space (arrow). IPC-366 ultrastructural features were evaluated by electron microscopy. The cells had abundant cytoplasmic projections, numerous organelles and proteinaceous secretory products. By electron microscopy, the clear cytoplasmic vacuoles seen by optic microscopy, resulted empty spaces lined by cytoplasmic membranes that occasionally joined to form an internal lumen (ELCs, vasculogenic mimicry). ([Fig. 3C-H](#)).

doi:10.1371/journal.pone.0122277.g002

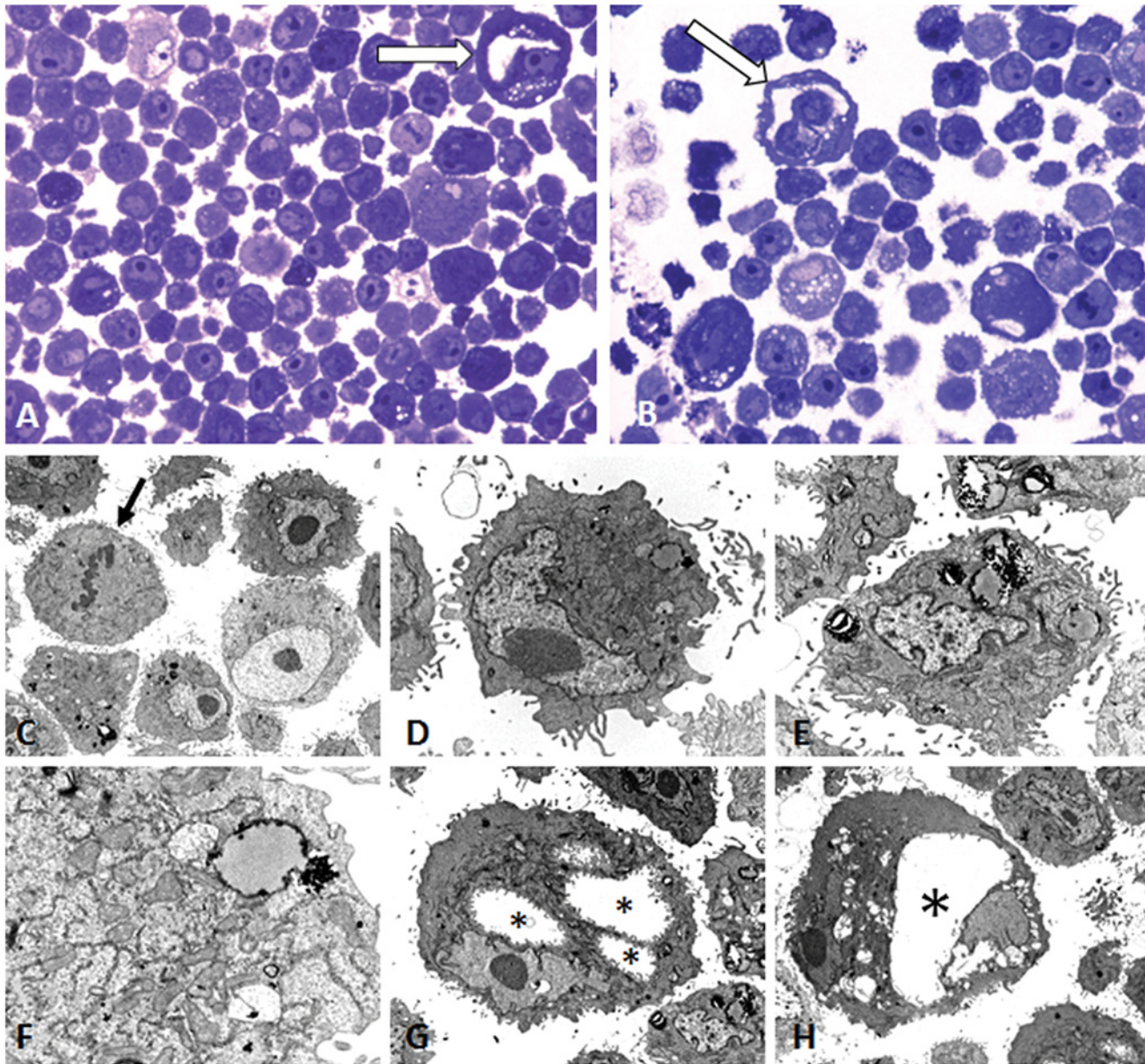


Fig 3. IPC-366 cells in pellet resin sections. A and B) Semithin sections stained with toluidin blue (40X); some endothelial-like cells are observed (arrows). C to H) Ultrastructure in ultrathin sections. C) Cells with large nuclei and evident nucleoli. Mitosis (arrow). D) Single cell with elongated nucleus, very evident nucleolus and numerous organelles, vacuoles and proteinaceous secretion. E) Tumor degenerated cell with shrunken nucleus and abundant proteinaceous secretion. F) Cytoplasm of a tumor cell containing numerous organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum) and a secretory vacuole. G) Tumor cell with three cytoplasmic empty spaces (asterisks) covered by cytoplasmic membrane; progression to a cytoplasmic "lumen" characteristic of endothelial-like cells. Evident nucleolus. H) Binucleate tumor cell with a cytoplasmic central empty space ("lumen", asterisk) (ELC) resembling a capillary vessel (vasculogenic mimicry). Figs. E and G show different fields from the same grid. At 25th passage, cells were cryogenic storage (-180°C). Re-cultured thawed cells presented similar growth and morphological characteristics with a viability of 95–99%. The doubling time of IPC-366 cells at 30th passage was approximately 24 hours and the cells reached a plateau on day 6 (Fig. 4).

doi:10.1371/journal.pone.0122277.g003

morphology, the number and all of them are Acrocentric, and the chromosome X metacentric. 2% of the observed cells have numerical aberration involving chromosomes X, 12 and 17 using the ideogram for the G banding analysis in Dog [24, 25]. The AC test reveals that 30% of the cell viewed have breaks: 15% chromatic, 8% chromosomal aberration and 6% gaps.

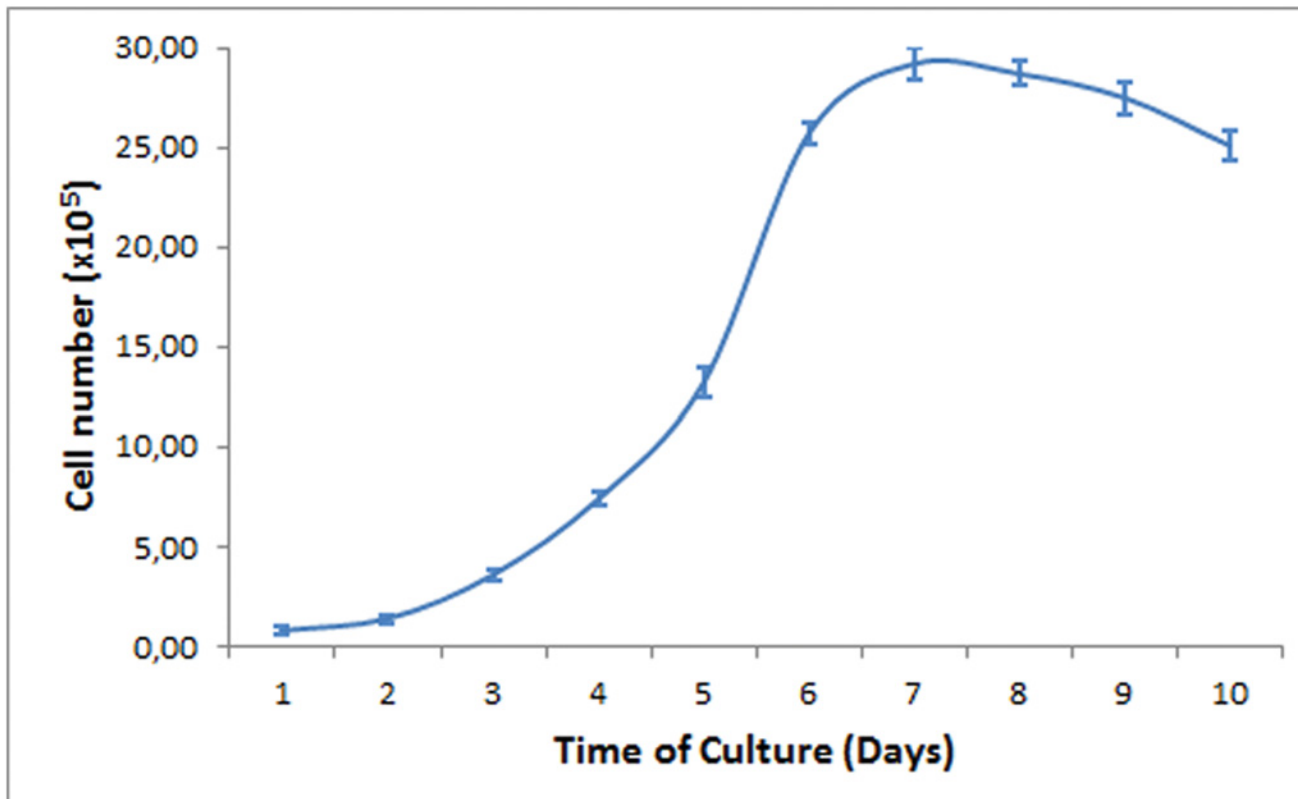


Fig 4. Growth curve of IPC-366 at 30th passage.

doi:10.1371/journal.pone.0122277.g004

Discussion

IMC and IBC are a subtype of aggressive mammary cancer that affects female dogs and humans, respectively [1, 2, 26]. *In vitro* studies using established cancer cell lines offer knowledge about the progression and growth of breast cancer in general and IBC in particular [11, 12]. There are few models available for the study of the biology of IBC [10, 12, 15]. Most studies have been carried out using cell lines such as SUM190 and SUM149. SUM149 is a triple negative cell line whereas SUM190 is ER/PR negative and HER-2 positive. Other less studied IBC cell lines are: MDA-IBC3, KPL4 and WIBC-9 (all ER/PR negative and HER-2 positive). In the past year, it has been described and characterized the new FC-IBC02 cell line [15]. Canine IMC shares many clinical, biological and pathological characteristics with the disease in humans, therefore it has been proposed as a good spontaneous animal model for the study the human disease [2]. Nevertheless, to the best of our knowledge, IPC-366 is the first canine IMC cell line established.

IPC-366 cell line reproduced the histological features of the canine primary tumor. It is a very aggressive, highly malignant cell line that inoculated to Balb/SCID mice can originate tumors that reproduce the histological features of the primary canine IMC: a very infiltrative tumor composed by anaplastic cells with lymphatic invasion of the superficial dermal lymphatics, being this latter characteristic the histological hallmark for both IBC and IMC histological diagnoses [2, 5, 26]. IPC-366 also preserved the original canine mammary IMC immunophenotype. According to the immunohistochemical results, IPC-366 is positive for panCK, CK14 and vimentin, and negative for actin, p63, ER, PR, HER-2, indicating that this cell line is a basal epithelial cell line.

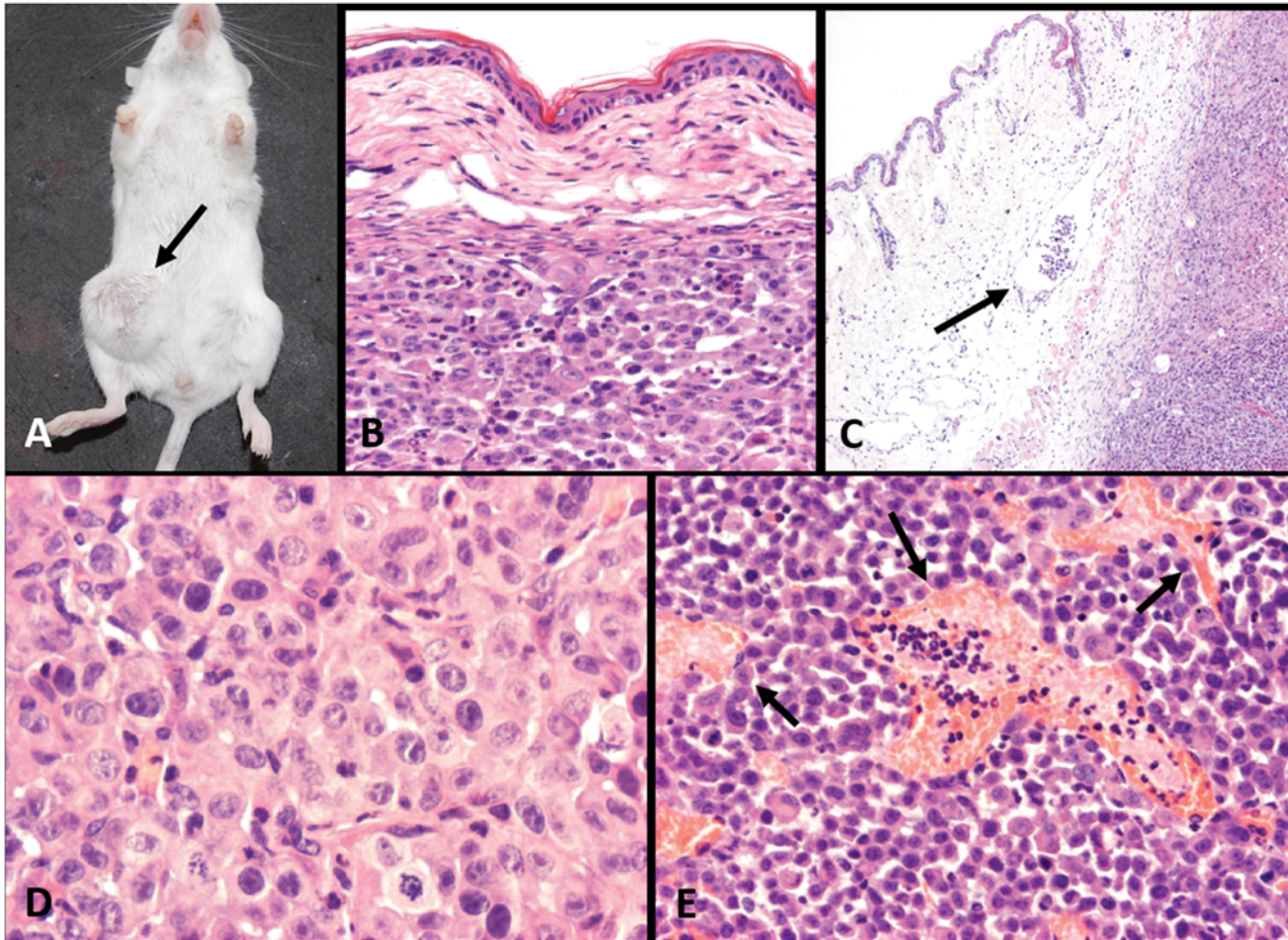


Fig 5. Tumors from mice inoculated with IPC-366. A) IPC-366 mouse xenografts at four weeks (arrow). B to E: tumor paraffin sections H&E. B) Solid tumor infiltrating the dermis (10X). C) Neoplastic embolus in a superficial dermal lymphatic vessel (arrow) and solid tumor; marked edema in dermis (4X). D) Highly malignant tumor cells with marked anisocytosis and anisokaryosis; evident nucleoli (40X). E) Microvascular channels lined up by neoplastic cells (vasculogenic mimicry, arrows) (20X).

doi:10.1371/journal.pone.0122277.g005

Multimodal treatment for patients with IBC includes chemotherapy, followed by aggressive radiotherapy and surgery. As in other non-IBC breast cancers, anti-HER-2 or anti-hormonal targeted therapy are used in positive patients to these molecules [4]. In spite of this, survival of patients with IBC is very short [4]. Survival is even shorter in triple negative IBC cases (TN IBC, negative tumors to ER, PR and HER-2) that are especially resistant to the therapies [27].

Triple negative breast cancer (TNBC) accounts for approximately 10–15% of breast cancers and has a poorer prognosis than positive hormone receptor patients [28–30]. This type of breast cancer also an outcome characteristic of aggressiveness, invasiveness, early metastases and unresponsive to therapeutic targets [28], and is treated mostly with chemotherapy [30].

In vitro research on TN-IBC is conducted mainly on the triple negative cell line SUM149. This cell line has been used to identify genetic factors of the IBC phenotype [10]. Immunohistochemical results revealed that IPC-366 lacked ER, PR and HER-2 expression, being another novel triple negative cell line that can be used for the research of novel therapeutic targets.

The cell line IPC-366 is presented as a basal epithelial cell line with mesenchymal characteristics: positive immunoeexpression to pancytokeratins (AE1/AE3) (general epithelial cell

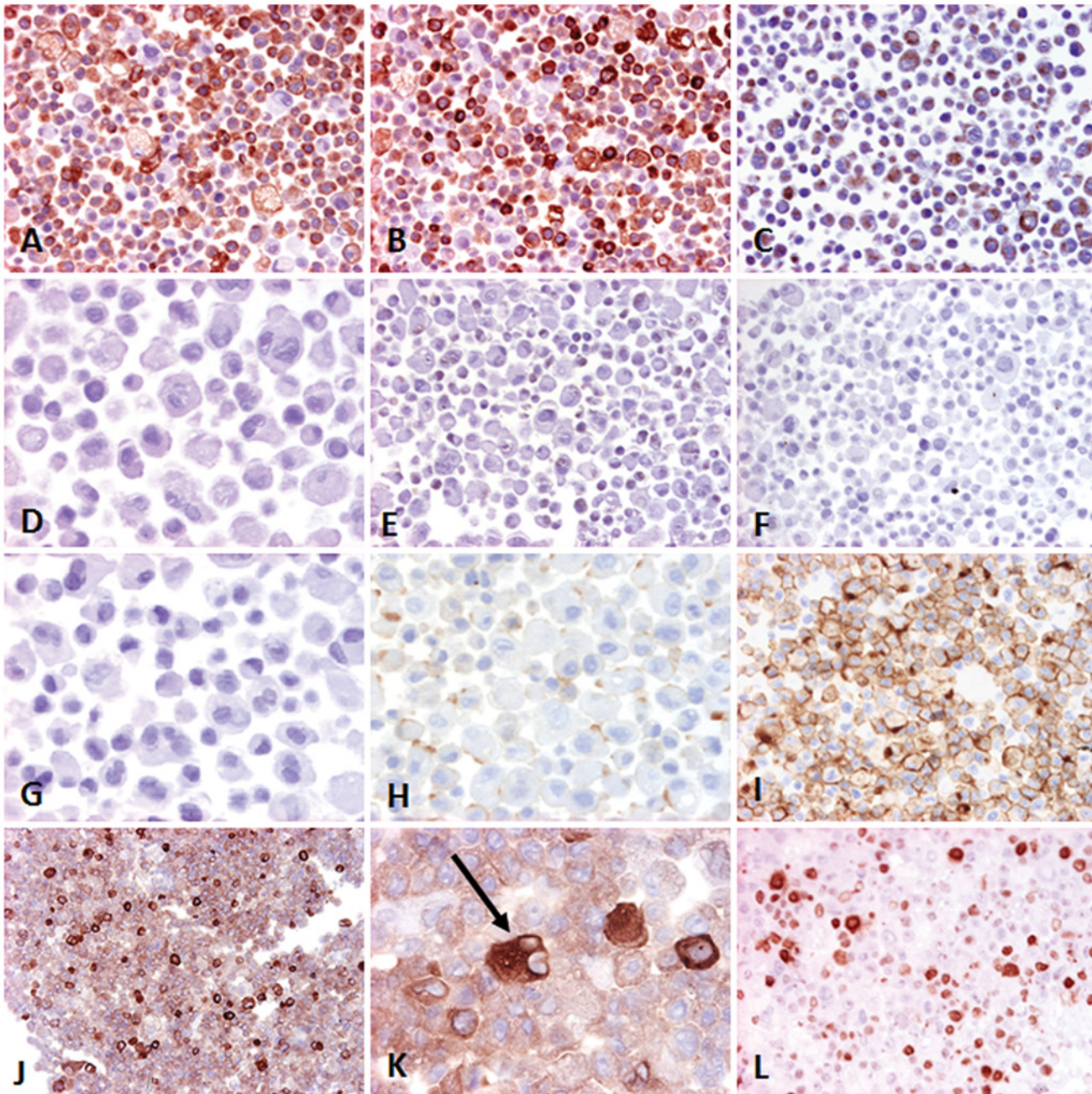


Fig 6. Immunohistochemistry of IPC-366 pellet, paraffin sections. A) Pancytokeratin (AE1/AE3) (10X); intense immunolabeling and numerous positive cells. B) CK14; intense immunolabeling and numerous positive cells (10X). C) Vimentin; moderate immunolabeling and numerous positive cells (10X). D) p63; negative (20X). E) α -smooth muscle actin, negative cells (10X). F) Estrogen receptor; negative cells (20X). G) Progesterone receptor; negative cells (20X). H) HER-2; negative cells (20X). I) E-Cadherin; intense membranous immunolabeling in numerous cells (20X). J) COX-2; most of the cells are moderately positive; some cells are intensely positive (10X). K) COX-2; some cells strongly positive showing features of malignancy (binucleated cell, arrow) (40X). L) Ki-67 proliferation marker; many nuclei are positive (10X).

doi:10.1371/journal.pone.0122277.g006

marker), cytokeratin 14 (for basal epithelial cells) and vimentin (general mesenchymal marker). The co-expression of cytokeratins and vimentin has been described in breast tumors associated to malignancy [31, 32]. Vimentin expression is also associated with an increase of malignancy of the cells in culture [31]. Thus, immunoexpression profile revealed that IPC-366

Table 2. Aberration found in the Karyotype.

Break point	dm	Gain	Deletion	Inversion
X (23)	12	17 (12–14)	del 12 (21–23)	inv 9 (12:14)
17 (21)	11	34 (221–23)	del 16 (21–24)	inv 17 (11:14)
11 (13)	16	18 (221–23)	del 11 (12–16)	inv 2 (12:23)
15 (15)	5	16 (12–14)	del 26 (21–23)	inv 3 (22:34)
26 (13)	9	9 (11–12)	del 22 (11–12)	
27 (13)	6	8 (11–12)	del 5 (21–33)	
5 (34)		3 (11–12)	del 20 (14–16)	
20 (12)		1 (11–12)	del 25 (21–24)	
9 (22)		24 (11–12)	del 17 (12–16)	
		13 (11–12)	del 19 (22–24)	
			del 26 (21–23)	
			del X (21–26)	

doi:10.1371/journal.pone.0122277.t002

comprised in a basal-like subtype cell line with epithelial-mesenchymal transition (EMT) [33]. The basal-like subtype is characterized by a negative expression of ER, PR and HER2 completed with a CK14 and vimentin positive [28]. SUM149, a well-established IBC cell line, is also of basal like subtype [12]. The fact that canine IPC-366 cell line shares phenotypic characteristics with the human SUM149 cell line will allow comparative pre-clinical studies in a future. Negative immunopresion to the myoepithelial cell markers p63 and actin indicates that IPC-366 is not of myoepithelial origin. In contrast with human breast cancer, canine mammary cancer has frequent myoepithelial proliferations leading to complex and mixed tumors [20]. The absence of a myoepithelial cell lineage in IPC-366 will further facilitate proper comparative studies. These results demonstrated the epithelial origin of IPC-366 and its acquisition of mesenchymal characteristics as well as the absence of myoepithelial cells in this cell line. Thus, IPC-366 cells are an example of epithelial-mesenchymal transition. EMT is a process implicated in the tumor progression leading epithelial cells turning into mesenchymal cells [34, 35]. The acquisition of the mesenchymal phenotype involved the loss in epithelial markers expression as well as gain cell motility and tumor invasion increased [36]. IPC-366 overexpressed COX-2 in 90% of the cells. Recently, the overexpression of COX-2 has been related to EMT and invasiveness in breast cancer cell lines [37].

E-cadherin overexpression in IPC-366 has been also demonstrated. E-cadherin is a cell-cell adhesion protein in epithelial tissues encoded by the tumor suppressor gene CDH1. It is known that mutations in CDH1 increased proliferation and tumor invasion and metastasis [38–40]. Thus, the loss of function of E-cadherin plays a very important role in EMT and tumor survival [40, 41]. It is known that in IBC E-cadherin is overexpressed and localized around the tumor cell membrane, which accounts for the formation of lymphovascular embolus [42, 43].

IPC-366 is also characterized by a high proliferation measured by a growth assay and a Ki-67 index (87.15%), which ensures in vitro studies. Ki-67 expression has been associated with poor prognosis in malignant mammary tumors both in women and dogs [22, 44]. IPC-366 had higher proliferation index than the original tumor, suggesting an increase of proliferative capacity, probably by selection of the most malignant cells. The cytogenetic analysis shows the presence of structural aberration, numerical and neutral rearrangements, demonstrating a chromosomal instability. These data can be correlated with the results in patients with inflammatory breast cancer and using more sensitive and specific methods such as SKY, CGH Southern blot analysis and studies of expression pattern with Cdna microarray chips would increase

the knowledge regarding genetic aberration and conserved segments who can open the window to found genetic markers. Histological features of malignancy in the primary canine mammary tumor and the cell line were similar with marked anisokaryosis and anisocytosis. The typical morphology of endothelial-like cells, which has been related to the vasculogenic mimicry (VM) phenomenon [7, 8] was observed similarly in the primary tumor and the derived cell line. The presence of ELCs should be considered as an interesting initial result that deserves further specific research. In the derived mice tumors, besides the observation of ELCs, it was possible to find large channels of VM. The higher proportion of highly malignant multinucleated cells found in IPC-366 and in the transplanted tumor in mice could represent also early stages of VM in highly undifferentiated ELCs, although further studies are needed to confirm this affirmation. This phenomenon defined as vasculogenic mimicry was first described in human melanoma and [45] consists in the generation of vascular channels by malignant tumor cells that acquire endothelial characteristics and provides de blood supply required for tumor growth and metastasis. The generation of functional vascular channels by the tumor is a marker of malignancy tumor cell phenotype [45, 46]. Vasculogenic mimicry does not appear in all types of cancer, but it frequently occurs in IBC [47] and IMC [7]. Recently, it was also identified in xenografts from IMC [48].

Ninety percent of IPC-366 cells were positive for COX-2. Some cells, including ELCs, were intensely positive for COX-2. COX-2 has a role in the invasive and angiogenic phenotype of IBC [49] and it has been related with lymphangiogenic pathway stimulation in IMC [8]. The relationship of COX-2 with tumor extravasation, tumor cell survival and distant metastasis re-initiation has been described [50]. COX-2 has been indicated to be a marker for ELCs involved in VM [7, 8, 51]. Although more studies are necessary to characterize the angiogenic characteristics of IPC-366, this cell line could represent a very interesting model for the study of VM and other angiogenic properties of IMC.

A role for COX-2 as a stem cell marker has been postulated recently [52]. The stem cell properties of IPC-366, under investigation, are not the purpose of the present study, but the high proportion of COX-2 positive cells and the presence of numerous ELCs seem to indicate that the rate of stem cells could be high. Complete future studies on stem cell phenotype will dilucidate this aspect of the IPC-366 cell line.

Fast tumorigenicity is another very important characteristic of IPC-366. This cell line is able to reproduce tumors *in vivo* very rapidly, without losing its original characteristics, which permit to study neoplastic growth in a biological animal environment. Although it is a much appreciated characteristic, not all the established cell lines are capable to reproduce tumors *in vivo*. MCF7 does not grow in mice, although other tumorigenic IBC cell lines such as SUM149 or SUM190 produce tumors in SCID mice xenografts after 6–8 weeks of injection of cells into mammary fat pad [53]. Xenografts from IPC-366 in Balb/SCID mice grew in 3 weeks with a frequency of 100%, showing that this cell line had a faster growth *in vivo*. IBC and IMC have a strong tendency to metastasize and invade lymphatic vessels [1, 5, 42]. IPC-366 xenografts in mice showed spontaneous metastases in lung and lymph nodes with a frequency of 100% (all injected animals suffer metastases). Therefore, IPC-366 could be considered a good model for the study of the metastatic mechanisms *in vitro* and *in vivo*. There are no IBC or breast cancer cell lines with this high capacity of metastases in the corresponding xenotransplanted mice; as an example, SUM149 produce metastases in lungs with a frequency of 2/3 [53].

In the last years, several canine mammary cancer cells lines have been established: DTK-E and DTK-SME [17], CMT1, CMT-U27, CMT9, P114, CNMp and CIPp [54], KTOSA5 and CSKOS [55], CHMp [56], CMT-W1 and CMT-W2 [16]. The reported tumorigenicity of the other canine mammary cancer cell lines indicate the tumor formation between 6 to 8 weeks after inoculation in SCID mice. The faster growth *in vivo* of IPC-366 cell line (4 weeks)

represents an advantage compared with the other canine mammary cancer cell lines. IPC-366 is the first canine inflammatory mammary cancer cell line established. After inoculation in Balb/SCID mice, IPC-366 originated tumors that reproduced the characteristic tumor invasion of superficial dermal vessels, indicating that IPC-366 could be also used as a model of canine inflammatory mammary cancer *in vivo*.

Tumor cell lines are useful for enhancing our understanding of cancer development and treatment. We have established the first IMC cell line (IPC-366). IPC-366 is a new IMC triple negative epithelial basal cell line, highly malignant, that exhibits fast proliferation *in vitro* and fast growth (3 weeks) and distant metastases *in vivo*, that reproduces histological characteristics of IMC *in vivo*, and possess properties of VM *in vitro* and *in vitro*.

According to its malignancy, tumorigenicity and tumor marker profile, this new established IMC cell line IPC-366 should become a useful cell model not only for basic tumor biology studies but also for the development of potential therapeutic agents and for future interspecies comparative new therapeutical strategies against IMC/IBC.

Acknowledgments

We are grateful to Pedro Aranda for his histological technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SC LP PJA MJI MSL WAW JMR JCI. Performed the experiments: SC LP PJA MJI JCI. Analyzed the data: SC LP PJA MJI MSL WAW JMR JCI. Contributed reagents/materials/analysis tools: SC LP PJA MJI MSL WAW JMR JCI. Wrote the paper: SC LP PJA MJI MSL WAW JMR JCI.

References

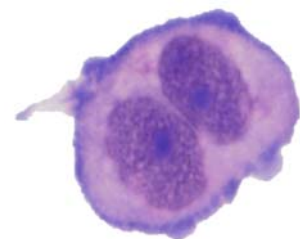
1. Pérez-Alenza MD, Tabanera E, Peña L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). *J Am Vet Med Assoc*. 2001; 219: 1110–1114. PMID: [11700710](#)
2. Peña L, Pérez-Alenza MD, Rodríguez-Bertos A, Nieto A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 78: 141–148. PMID: [12725414](#)
3. Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA, Levine PH. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 966–975. PMID: [15998949](#)
4. Yamauchi H, Woodward WA, Valero V, Alvarez RH, Lucci A, Buchholz TA, et al. Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn. *Oncologist*. 2012; 17: 891–899. doi: [10.1634/theoncologist.2012-0039](#) PMID: [22584436](#)
5. Kleer CG, van Golen KL, Merajver SD. Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Res*. 2000; 2: 423–429. PMID: [11250736](#)
6. Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, van Dam P, Colpaert CG, et al. Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 7965–71. PMID: [15585631](#)
7. Clemente M, Pérez-Alenza MD, Peña L (2010) Metastasis of Canine Inflammatory versus Non-Inflammatory Mammary Tumours. *J Comp Path* 143: 157–163. doi: [10.1016/j.jcpa.2010.02.002](#) PMID: [20427049](#)
8. Clemente M, Sánchez-Archidona AR, Sardon D, Díez L, Martín-Ruiz A, Caceres S, et al. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *Vet J*. 2013; 97: 427–432.
9. Giordano SH, Hortobagyi GN. Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. *Breast Cancer Res*. 2003; 5: 284–288. PMID: [14580242](#)
10. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 83: 249–289. PMID: [14758095](#)

11. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006; 10: 515–527. PMID: [17157791](#)
12. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011; 13: 215. doi: [10.1186/bcr2889](#) PMID: [21884641](#)
13. Martinez-Carpio PA, Navarro Moreno MA. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol*. 2003; 5: 184–91.
14. Klopp AH, Lacerda L, Gupta A, Debeb BG, Solley T, Li L, et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Mammosphere Formation and Decrease E-Cadherin in Normal and Malignant Breast Cells. *PLoS One*. 2010; 5:e12180. doi: [10.1371/journal.pone.0012180](#) PMID: [20808935](#)
15. Fernandez SV, Robertson FM, Pei J, Aburto-Chumpitaz L, Mu Z, Chu K, et al. Inflammatory breast cancer (IBC): clues for targeted therapies. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 140: 23–33. doi: [10.1007/s10549-013-2600-4](#) PMID: [23784380](#)
16. Majchrzak K, Lo Re D, Gajewska M, Bulkowska M, Homa A, Pawlowski K, et al. Migrastatin analogues inhibit canine mammary cancer cell migration and invasion. *PLoS One*. 2013; 8:e76789. doi: [10.1371/journal.pone.0076789](#) PMID: [24116159](#)
17. Hsiao YL, Hsieh TZ, Liou CJ, Cheng YH, Lin CT, Chang CY, et al. Characterization of protein marker expression, tumorigenicity, and doxorubicin chemoresistance in two new canine mammary tumor cell lines. *BMC Vet Res*. 2014; 10: 229. doi: [10.1186/s12917-014-0229-0](#) PMID: [25267010](#)
18. Król M, Mucha J, Majchrzak K, Homa A, Bulkowska M, Majewska A, et al. Macrophages mediate a switch between canonical and non-canonical Wnt pathways in canine mammary tumors. *PLoS One*. 2014; 9:e83995. doi: [10.1371/journal.pone.0083995](#) PMID: [24404146](#)
19. Susaneck SJ, Allen TA, Hoopes J, Withrow SJ, Macy DW. Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1983; 9: 971–976.
20. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011; 48: 117–131. doi: [10.1177/0300985810393258](#) PMID: [21266722](#)
21. Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2014; 51: 127–145. doi: [10.1177/0300985813509388](#) PMID: [24227007](#)
22. Peña L, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest*. 1998; 10: 237–246. PMID: [9683072](#)
23. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971; 2: 971–972. PMID: [4107917](#)
24. Yang F, O'Brien PCM, Milne BS, Graphodatsky AS, Solanky N, Trifonov V, et al. A complete comparative chromosome map for the dog, red fox and Human and its integration with canine genetic maps. *Genomics*. 1999; 62: 189–202. PMID: [10610712](#)
25. Thomas R, Duke SE, Bloom SK, Breen TE, Young AC, Feiste E, et al. A cytogenetically characterized, genome-anchored 10-Mb BAC set and CGH array for the domestic dog. *J Hered*. 2007; 98: 474–484. PMID: [17702974](#)
26. Tavassoli FA. Inflammatory carcinoma. Infiltrating carcinomas: special types. In: *Pathology of the breast*. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill. 1999; p. 538–541.
27. Carkaci S, Sherman CT, Ozkan E, Adrada BE, Wei W, Rohren EM, et al. (18)F-FDG PET/CT predicts survival in patients with inflammatory breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013; 40: 1809–16. doi: [10.1007/s00259-013-2506-8](#) PMID: [23877633](#)
28. Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009; 9: 73–81.
29. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol*. 2012; 23: 7–12. doi: [10.1093/annonc/mdr567](#) PMID: [22190670](#)
30. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*. 2010; 32: 35–48. doi: [10.3233/BD-2010-0307](#) PMID: [21778573](#)
31. Heatley M, Whiteside C, Maxwell P, Toner P. Vimentin expression in benign and malignant breast epithelium. *J Clin Pathol*. 1993; 46: 441–445. PMID: [7686566](#)
32. Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, Mehta SV, Brahmhatt BV, Shah MJ, et al. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2009; 24: 38–46. PMID: [19404921](#)

33. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Tumor-Initiating Cells and Its Clinical Implications in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010; 15: 253–260. doi: [10.1007/s10911-010-9173-1](https://doi.org/10.1007/s10911-010-9173-1) PMID: [20354771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20354771/)
34. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers*. 2011; 3: 716–729. doi: [10.3390/cancers30100716](https://doi.org/10.3390/cancers30100716) PMID: [21643534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21643534/)
35. Lee JM, Debhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling development and disease. *J Cell Biol*. 2006; 172: 973–981. PMID: [16567498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16567498/)
36. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008; 133: 704–715. doi: [10.1016/j.cell.2008.03.027](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027) PMID: [18485877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18485877/)
37. Bocca C, Ievolella M, Autelli R, Motta M, Mosso L, Torchio B, et al. Expression of Cox.2 in human breast cancer as a critical determinant of epithelial to mesenchymal transition and invasiveness. *Expert Opin Ther Targets*. 2014; 18: 121–135. doi: [10.1517/14728222.2014.860447](https://doi.org/10.1517/14728222.2014.860447) PMID: [24325753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24325753/)
38. Hiraguri S, Godfrey T, Nakamura H, Graff J, Collins C, Shayesteh L, et al. Mechanisms of Inactivation of E-Cadherin in Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 1998; 58: 1972–1977. PMID: [9581841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9581841/)
39. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JWF, Zimmerman RME, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *British J Cancer*. 2006; 94: 661–671. PMID: [16495925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16495925/)
40. Chen A, Beetham H, Black MA, Priya R, Telford BJ, Guest J, et al. E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer*. 2014; 14: 552. doi: [10.1186/1471-2407-14-552](https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-552) PMID: [25079037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25079037/)
41. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009; 139: 871–890. doi: [10.1016/j.cell.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007) PMID: [19945376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945376/)
42. Tomlinson JS, Alpaugh ML, Barsky SH. An intact overexpressed E-cadherin/alpha, beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma. *Cancer Res*. 2001; 61: 5231–5241. PMID: [11431364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11431364/)
43. Ye Y, Tellez JD, Durazo M, Belcher M, Yearsley K, Barsky SH. E-cadherin accumulation within the lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer is due to altered trafficking. *Anticancer Res*. 2010; 30: 3903–3910. PMID: [21036701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21036701/)
44. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008; 17: 323–334. doi: [10.1016/j.breast.2008.02.002](https://doi.org/10.1016/j.breast.2008.02.002) PMID: [18455396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18455396/)
45. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999; 155: 739–752. PMID: [10487832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10487832/)
46. Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ. Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol*. 2000; 156: 361–381. PMID: [10666364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10666364/)
47. Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, et al. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Inter J Cancer*. 2002; 99: 821–828.
48. Camacho L, Peña L, González Gil A, Caceres S, Diez L, Illera JC. Establishment and characterization of a canine xenograft model of inflammatory mammary carcinoma. *Res Vet Sci*. 2013; 95: 1068–1075. doi: [10.1016/j.rvsc.2013.07.017](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.07.017) PMID: [23972378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23972378/)
49. Robertson FM, Simeone AM, Mazumdar A, Shah AH, McMurray JS, Ghosh S, et al. Molecular and pharmacological blockade of the EP4 receptor selectively inhibits both proliferation and invasion of human inflammatory breast cancer cells. *J Experiment Therap Oncol*. 2008; 7: 299–312.
50. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Rev Cancer*. 2009; 9: 274–284.
51. Markosyan N, Chen EP, Evans RA, Ndong V, Vonderheide RH, Smyth EM. Mammary Carcinoma Cell Derived Cyclooxygenase 2 Suppresses Tumor Immune Surveillance by Enhancing Intratumoral Immune Checkpoint Activity. *Breast Cancer Res*. 2013; 15: R75. PMID: [24004819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24004819/)
52. Thanan R, Murata M, Ma N, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, et al. Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. *Mediators Inflamm*. 2012; 2012: 165879. doi: [10.1155/2012/165879](https://doi.org/10.1155/2012/165879) PMID: [22577245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22577245/)
53. Kuperwasser C, Dessain S, Bierbaum BE, Garnet D, Sperandio K, Gauvin GP, et al. A Mouse Model of Human Breast Cancer Metastasis to Human Bone. *Cancer Res*. 2005; 65: 6130–6138. PMID: [16024614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024614/)
54. Gracanin A, Timmermans-Sprang EP, van Wolferen ME, Rao NA, Grizelj J, et al. Ligand-independent canonical Wnt activity in canine mammary tumor cell lines associated with aberrant LEF1 expression. *PLoS One*. 2014; 9:e98698. doi: [10.1371/journal.pone.0098698](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098698) PMID: [24887235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24887235/)

55. Pang LY, Argyle SA, Kamida A, Morrison K, Argyle DJ. The long-acting COX-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil™) has anti-proliferative and pro-apoptotic effects on canine cancer cell lines and cancer stem cells. *Vet Res.* 2014; 10: 184–195. doi: [10.1186/s12917-014-0184-9](https://doi.org/10.1186/s12917-014-0184-9) PMID: [25190452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190452/)
56. Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H, Katsumoto T, Ichikawa H, et al. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res Vet Sci.* 2011; 91: 254–260. doi: [10.1016/j.rvsc.2010.11.016](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.11.016) PMID: [21190702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21190702/)

CAPÍTULO II:
Comparación entre las líneas
celulares IPC-366 y SUM149:
validación de IPC-366 como buen
modelo de estudio de IBC e IMC



1. Resumen

El IBC es un tipo agresivo de cáncer con baja supervivencia en las mujeres. Por su parte, el IMC de la especie canina es muy similar a la enfermedad humana y se ha propuesto como un buen modelo sustituto para el estudio de la ésta.

El objetivo de este estudio es determinar si la línea celular canina IPC-366 comparte características con la línea celular humana SUM149. Dicha comparación se lleva a cabo en términos de capacidad de las células de crecer en condiciones adherentes y no adherentes, inmunofenotipo de expresión por citometría de flujo, la producción de proteínas por técnicas de western blot, además del estudio de la capacidad tumorigénica de ambas líneas celulares en las dos condiciones de cultivo.

Nuestros resultados revelan que ambas líneas celulares son capaces de formar masas a largo plazo, con una morfología en forma de racimo. Las células procedentes de los dos sistemas de cultivo también exhibieron un crecimiento rápido *in vivo* generando tumores (IPC-366: 2 semanas; SUM149: 4 semanas), cuya histología es muy similar entre ambas líneas. Por otra parte, el inmunofenotipo de expresión muestra que IPC-366 y SUM149, en condiciones adherentes y no adherentes, presenta características mesenquimatosas y se observa que las proteínas E-cadherina y N-cadherina están más expresadas en los cultivos adherentes que en los no adherentes. Por lo tanto, las líneas celulares IPC-366 y SUM149 comparten muchas características *in vitro*, por lo que la línea celular IPC-366 puede ser un buen modelo para el estudio, tanto de la enfermedad humana como de la canina.

2. Diseño Experimental

Este estudio se lleva a cabo para determinar las diferencias y semejanzas de las líneas celulares de IBC e IMC, SUM149 e IPC-366, respectivamente.

Para ello la comparativa se basa en los siguientes aspectos:

- ✚ Cultivo en condiciones adherentes y no adherentes para determinar las diferencias en cuanto a morfología celular entre ambas líneas celulares.
- ✚ Inoculación de las líneas celulares en ratones hembra SCID observando el crecimiento de los tumores y realizando el posterior examen histológico de los tumores generados.
- ✚ Examen histológico de los pellets procedentes del cultivo *in vitro* de las líneas celulares.
- ✚ Caracterización del inmunofenotipo de las células de ambos sistemas de cultivo, mediante la expresión de marcadores de células madre (CD24, CD44, CD326, CD133, CD146 y CD45).
- ✚ Expresión de proteínas características de EMT (E-cadherina, N-cadherina, fibronectina) y de angiogénesis (VEGFA), para la determinación de las diferencias y semejanzas entre ambas líneas celulares mediante técnicas de western blot
- ✚ Expresión de RhoC GTPasa y WISP3 (proteínas cuyo patrón de expresión es crucial para el diagnóstico de IBC) de las líneas celulares mediante western blot.
- ✚ Comparación entre los parámetros estudiados en las dos líneas celulares y en los dos sistemas de cultivo: adherente y no adherente.

Canine cell line, IPC-366, as a good model for the study of inflammatory breast cancer

S. Caceres¹, L. Peña², L. Lacerda³, M. J. Illera¹, P. J. de Andres², R. A. Larson³, H. Gao⁴, B. G. Debeb³, W. A. Woodward³, J. M. Reuben⁴ and J. C. Illera¹

¹Department of Animal Physiology, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain

²Department of Animal Medicine, Surgery and Pathology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain

³Department of Radiation Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

⁴Department of Hematopathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Abstract

Inflammatory breast cancer (IBC) is an aggressive type of cancer with poor survival in women. Inflammatory mammary cancer (IMC) in dogs is very similar to human IBC and it has been proposed as a good surrogate model for study the human disease. The aim was to determine if IPC-366 shared characteristics with the IBC cell line SUM149. The comparison was conducted in terms of ability to grow (adherent and nonadherent conditions), stem cell markers expression using flow cytometry, protein production using western blot and tumorigenic capacity. Our results revealed that both are capable of forming long-term mammospheres with a grape-like morphology. Adherent and nonadherent cultures exhibited fast growth *in vivo*. Stem cell markers expressions showed that IPC-366 and SUM149 in adherent and nonadherent conditions has mesenchymal-like characteristics, E-cadherin and N-cadherin, was higher in adherent than in nonadherent cultures. Therefore, this study determines that both cell lines are similar and IPC-366 is a good model for the human and canine disease.

Keywords

Canine, IBC, IMC, IPC-366, stem cells, SUM149

Introduction

Human inflammatory breast cancer (IBC) and its analogous disease in dogs, canine inflammatory mammary cancer (IMC), are similar forms of a special type of a very aggressive cancer that affects women^{1,2} and female dogs,^{3,4} respectively. In both species, this type of cancer is highly angiogenic and angioinvasive.^{4–7} IBC accounts for less than 6% of human breast cancer diagnoses with the poorest survival.^{2,8} The main histological characteristic of inflammatory breast cancer in both species, canine and human, is the massive invasion of superficial dermal lymphatic vessels by neoplastic cells which block lymph drainage and cause the characteristic edema.^{3,9} Owing to the low prevalence of IBC, the use of alternative animal models and IBC

cell lines are necessary for the study of this disease. Canine IMC is more prevalent than human IBC³ and has been proposed as the best spontaneous animal model for the study of human IBC.⁴ Several human IBC cell lines have been established in order to study the mechanisms of this special type of breast cancer *in vitro* such as SUM149, SUM190, MDA-IBC-3 and FC-IBC02.^{10,11} IPC-366 cell line, the first canine IMC cell line that has been established and characterized,¹² it is a triple negative receptor cell line, with high capacity of tumorigenicity *in vivo* and high rates of metastases.

In breast cancer cell lines, cell culture in non-adherent conditions is a widely used tool to identify and isolate breast cancer stem cells (BCSC), to study the mechanisms of growth

Correspondence address
J. C. Illera, DVM, PhD,
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense
de Madrid Avda
Puerta de Hierro s/n
28040 Madrid
Spain
e-mail:
jcillera@ucm.es

under nonadherent conditions, and to investigate the mechanisms involved in stem cells survival.¹³ BCSC are capable of surviving and proliferating in such conditions and form clusters of cells defined as mammospheres.¹³ Mammosphere cells are multipotent cells that have the abilities of self-renewal, differentiation, unlimited propagation and can develop phenotypically distinct cells among the tumor population.¹⁴ It has also been suggested that mammosphere cells are responsible for metastases and recurrences of malignant tumors whilst being more resistant to therapeutic agents than cells in adherent conditions.¹⁵

Stem cells can be characterized by specific cell surface marker expression patterns, such as CD44⁺/CD24^{-/low} or ALDH1 expression.^{13,14,16,17} CD44 and CD24, with different expression in the tumorigenic process, are surface markers used to isolate cancer stem cells from solid tumors.¹⁷ They are used in combination with other markers such as CD326 (EpcAM, a malignant epithelial tumor marker),¹⁸ CD45 (a hematopoietic marker that is absent in the mesenchymal stem cells phenotype)¹⁹ and CD133 (a specific surface marker of cancer stem cells).²⁰

Previous studies have indicated that only BCSC have the ability to proliferate in suspension as mammospheres in nonadherent cultures, and that mammospheres derived from CD44⁺/CD24^{-/low} BCSC population^{14,16} are able to form tumors that reproduce the heterogeneity of the original primary tumor when injected into immune deficient mice.¹⁴ The prevalence of CD44⁺/CD24^{-/low} cells population within breast tumors and the association with clinical characteristics is under study; it is known that breast tumors with a high proportion of CD44⁺/CD24^{-/low} cells develop more distant metastases.²¹ CD146, another stem cell marker and epithelial–mesenchymal transition inducer,²² is implicated in cell adhesion; it is strongly expressed in the metastases and plays a critical role in tumor angiogenesis.²³ Therefore, mammary stem cell phenotype has been associated with metastatic potential,¹⁴ enhanced invasive properties,²⁴ radiation resistance²⁵ and adverse prognosis.²⁶

The aim of this study was to compare the recently established cell line IPC-366 (canine inflammatory mammary carcinoma cell line) and SUM149

(human inflammatory breast carcinoma cell line) in terms of stem cell markers expression, protein production and their capacity to form tumors *in vivo*, in order to validate the canine model for the research of IBC and IMC, as well as provide new tools for the study of both diseases.

Materials and methods

Cell lines culture

Triple negative (ER–, PR–, HER-2–) canine inflammatory mammary carcinoma cell line IPC-366 was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F12) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin solution and 1% L-glutamine (Sigma Aldrich, Madrid, Spain).

SUM149 (triple negative human inflammatory breast carcinoma cell line) cells from Asterand, plc (Detroit, MI, USA) were maintained in Ham's F-12 media supplemented with 10% FBS (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), 1 µg mL⁻¹ hydrocortisone, 5 µg mL⁻¹ insulin and 1% penicillin–streptomycin solution and 1% amphotericin B (Sigma Aldrich, Madrid, Spain).

Both cell lines were cultured in 25-cm² culture flasks and were maintained in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide at 37 °C. The cell cultures were observed daily by a phase-contrast microscopy to check cell viability and growth.

Mammosphere formation assay

To generate primary mammospheres, IPC-366 and SUM149 cells were grown in serum-free, growth factor enriched media in 6-well ultra-low attachment plates (Corning; New York, NY, USA).^{10,13,27} Briefly, adherent cells were trypsinized, and the resultant single cells were seeded in 6-well ultra-low attachment plates (1 × 10⁴ and 2 × 10⁴ cells mL⁻¹) in serum-free MEM supplemented with 20 ng mL⁻¹ bFGF (basic fibroblast growth factor), 20 ng mL⁻¹ EGF (epidermal growth factor) and 1 × B27 (serum-free supplement) (Invitrogen, Madrid, Spain) and incubated for 7 days. Then, mammospheres were stained with MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Invitrogen, Madrid, Spain) to improve

visualization before they were counted using a Gel-count colony counter (Oxford Optronix, Oxford, UK). After 1 week of culture, first generation of mammospheres was harvested from the cultures and counted with a minimum size of 50 μm . The resulting mammospheres were dissociated into single cells, re-cultured through passages and counted every week.

To evaluate the survival time of the spheres, a mammosphere formation efficiency (MFE) assay was performed.¹³ Single cells (1×10^4 and 2×10^4 single cells mL^{-1}) were plated in ultra-low attachment plates. After 7 days in culture, mammospheres were collected by centrifugation and dissociated enzymatically (with trypsin solution 0.25%; Sigma Aldrich, Madrid, Spain) and mechanically (passing cells through a 25G needle). Single cells were re-plated at a density of 10^4 cells mL^{-1} and 2×10^4 cells mL^{-1} , respectively. This method was used for every mammosphere subsequent passage. The number of spheres (diameter $> 50 \mu\text{m}$) for each well was evaluated under microscope on days 7, 14 and 21, respectively. MFE was calculated as the number of spheres divided by the original number of seeded cells and expressed as percentage means ($\pm\text{SD}$).

Cell viability assay (MTS assay)

Adherent and nonadherent cells from IPC-366 and SUM149 cell lines were assayed for cell viability utilizing the CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay according to the manufacturer's instructions (Promega, Madrid, Spain). Briefly, media was removed and 100 μL of media containing 20 μL MTS was added to each well and incubated for 3 h at 37°C and 5% CO_2 . Absorbance was read at 490 nm with a 96-well SpectraMax 190 UV/Vis plate reader. Adherent cells were taken to represent 100% proliferation and nonadherent cells were expressed relatively to this.

Tumorigenicity

To compare the ability of IPC-366 and SUM149 adherent cells and mammospheres to grow *in vivo* conditions, tumorigenicity assays were carried out. IPC-366 and SUM149 mammospheres were collected and disaggregated as single cells; 2×10^4 mammosphere cells and adherent cells of both cells

lines (IPC-366 and SUM149) were subcutaneously inoculated in the ventral region of 10 8-week-old female Balb/SCID mice, respectively. Mice ($n = 40$) were inspected by palpation twice/week for the development of tumors. If tumors were detected, they were weekly monitored by palpation and measured by calipers. Mice were sacrificed when tumor volume was up to 1500 mm^3 by cervical dislocation. Then, tumors and organs were collected at necropsy for histological examination.

The Institutional Animal Care and Use Committee of the University Complutense of Madrid, Spain approved the clinical and experimental protocols of this study (number: PROEX 065/15). All procedures were completed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and conformed to the relevant EU Directive.

Histological examination

Pellets from IPC-366 and SUM149 of adherent and nonadherent culture cells and their corresponding xenograft tumors were fixed in 10% buffered formalin (pH = 7.4), embedded in paraffin wax, routinely processed for histology and stained with H&E. The pellets were obtained after centrifugation of cells at $112 \times g$, 20°C for 5 min.

Flow cytometry analysis

Adherent and nonadherent cells (SUM149 and IPC-366) were interrogated for aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity using the Aldefluor assay following the manufacturer's protocol (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada). Briefly, 1×10^6 cells from cell lines and mammospheres were suspended in Aldefluor buffer, which contains a proprietary ATP-binding cassette transport inhibitor. One-third of the cells were reacted with 5 μL of the ALDH inhibitor di-ethylamino-benzaldehyde as a negative control. Both, the test reaction and the negative control, were incubated for 35 min at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Preconjugated antibodies to CD44 (PerCP), CD24 (PE-Cy5), CD45 (PE-Cy7), CD326 (FITC), CD133 (APC) and CD146 (PE) from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), were used to label cells (protected from light) at room temperature for 30 min. An additional tube of Aldefluor

labeled cells was stained with the appropriate isotype-matched controls. The stained cells were spun down, and the cell pellet was suspended in 250 μL of Aldefluor buffer prior to analysis on a LSR-II flow cytometer capable of discriminating 6-color fluorescence (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Results were expressed as a percentage of Aldefluor positive cells.

Western blot analysis

Western blot cell protein analyses were carried out to better know and compare EMT markers (adhesion markers, cadherins and extracellular matrix production, fibronectin) and angiogenesis (VEGF-A) in both cell lines. This technique was also performed to define molecular characteristics of IPC-366 and SUM149 adherent cells by WISP3 and RhoC GTPase expression. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER-2 were also assayed by this technique to validate the triple negative status of IPC-366 and SUM149 cell lines. IPC-366 and SUM149 adherent cells and mammospheres were lysed in radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol L^{-1} NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 μM phenylmethane-sulfonylfluoride (PMSF). The adherent cell lysates were scraped off the plate while lysed mammospheres were collected and centrifuged at $112 \times g$ for 20 min. Supernatants were used in the western blot analyses. Aliquots of the supernatants containing 40 μg of protein were subjected to standard sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (10%) gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) under reducing conditions. The proteins were electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Biorad, Hercules, California, USA). The membranes were washed 3 times with TBS (Tris buffered saline) for 5 min each and then incubated for 30 min in TBST (5% nonfat milk in TBS). The primary antibodies (monoclonal, Mab or polyclonal, Pab) to the following proteins were used: E-cadherin (mouse, Mab, cat No. 610181), fibronectin (mouse, Mab, cat No. 610077), actin (mouse, Mab, cat No. 612656) (used as control) (BD Bioscience; San Jose, CA), ER (rabbit, Mab, ab32063), PR (mouse, Mab, ab2764),

(Abcam, Cambridge, UK), N-cadherin (rabbit, Pab, sc-7939), VEGF A (rabbit, Pab, sc-507) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), HER-2 (mouse, Mab, orb101953), Rho C GTPase (rabbit, Pab, orb11335) and WISP-3 (rabbit, Pab, orb159209) (Biorbyt Ltd, Cambridge, UK). All antibodies were diluted in TBST and membranes were incubated for 16 h at 4°C . Then membranes were washed 3 times with TBS for 5 min each and then exposed to peroxidase-conjugated anti-IgG (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) for 2 h at room temperature and the film development was performed with developing solution (Thermo Scientific, Waltham, MA USA). Membranes were scanned using a Kodak densitometer. For this technique, breast cancer cell lines such as SUM149 or MCF7 were used as positive controls.

Data analysis

The statistics software used for data analysis was SAS 9.4 (UCM, Madrid, Spain). To compare both cell lines (IPC-366 and SUM149) in each group the Wilcoxon rank-sum test was performed. For comparisons between groups on each line, we used the Kruskal-Wallis test followed by a pairwise non-parametric multiple comparisons test when the overall contrast was significant. Wilcoxon signed ranks test with Bonferroni correction was used for comparisons between weeks on each group and cell line.

Results

Mammosphere formation assay

IPC-366 and SUM149 had the capacity to grow in nonadherent conditions forming mammospheres when a suspension of 10^4 cells mL^{-1} and 2×10^4 cells mL^{-1} were plated. IPC-366 mammospheres started growing at the second day and SUM149 mammospheres at the fourth day of culture. The morphology of the formed spheres of both cell lines appeared as solid round cell groups (Figure 1). Sphere size was very similar in both cell lines with an average of $132.33 \mu\text{m} \pm 31.63 \mu\text{m}$ in IPC-366, and $128.16 \mu\text{m} \pm 36.52 \mu\text{m}$ in SUM149 cell lines.

In both cell lines MFE increased in first and second passages and followed a similar pattern in

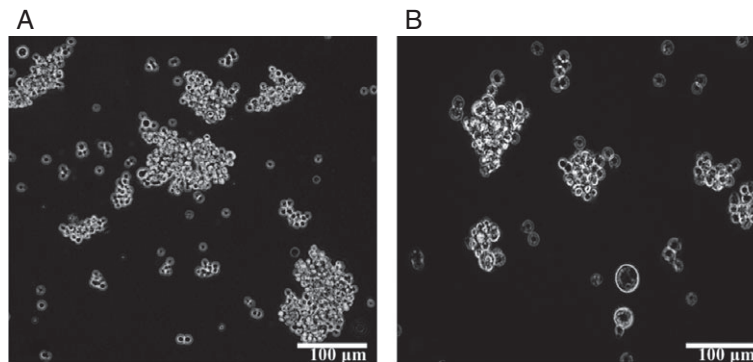


Figure 1. IPC-366 and SUM149 cell lines growing in suspension culture (nonadherent culture). (A) Morphology of IPC-366 first generation of mammospheres ($\times 10$). (B) Morphology of SUM149 first generation of mammospheres ($\times 10$).

mammospheres formation (Table 1). MFE stopped increasing significantly at the third (IPC-366) and second (SUM149) passages, so the mammosphere's proliferation tended to be maintained. Second generation of mammospheres appeared to be significantly more numerous than the first generation in both suspensions and there were several mammospheres with higher diameter than the average (around $150 \mu\text{m}$). IPC-366 and SUM149 mammospheres were capable of surviving after at least six passages. When comparing MFE between cell lines significant differences were found from third passages been higher in IPC-366.

MTS assay results from both cell lines in adherent and nonadherent conditions (Figure 2) showed a significant reduction in the proliferation capability of nonadherent culture cells compared with adherent culture cells in each cell line. There were no statistical differences in proliferation rates between IPC-366 and SUM149 cell lines.

Tumorigenicity

Tumor growth results after the injection of mammospheres or adherent cells into the ventral side of female Balb/SCID mice are summarized in Table 2.

IPC-366 adherent cells developed tumors after 2 weeks of inoculation (100% of inoculated mice). Six weeks p. i., tumor size was up to 1.5 cm^3 and mice were euthanized; 90% of transplanted mice showed metastases in lymph nodes and lung. Mice transplanted with IPC-366 nonadherent cells developed tumors after 4 weeks of inoculation with a frequency of 100%, significantly later than

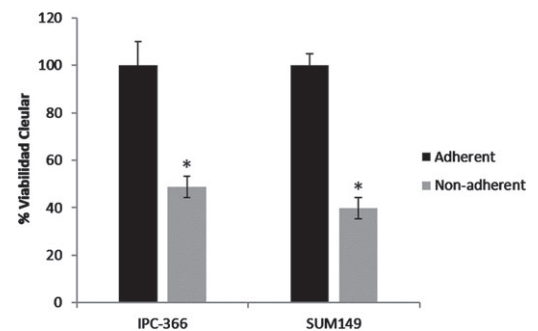


Figure 2. Cell proliferation measured by MTS assay of IPC-366 and SUM149 adherent and nonadherent culture systems. Nonadherent cultures showed a reduction in cell proliferation compare with adherent cultures. Results shown are the average of three separate MTS assays each one done in quadruplicate. * $p < 0.05$; significant differences between adherent and nonadherent culture on each cell line.

IPC-366 adherent tumors. Eight weeks p. i., tumors reached a volume up to 1.5 cm^3 and 10% of mice showed metastasis.

SUM149 adherent and nonadherent cells developed tumors in 80 and 60% of mice, respectively approximately 4 weeks after cell injection. Significant differences in the frequency of tumor development were found between adherent and nonadherent tumors. Eight weeks after injection, tumor size was up to 1.5 cm^3 and 80% (adherent tumors) and 20% (nonadherent tumors) of mice showed metastases in lymph nodes and lungs.

Frequency of metastases was significantly lower in nonadherent tumors than in adherent tumors for both cell lines (10 versus 90%, respectively).

When comparing tumor growth progression in both cell lines (Figure 3), a similar pattern of tumor

Table 1. IPC-366 and SUM149 mammosphere formation efficiency (MFE) expressed as percentage (mean \pm SD) calculated for six mammospheres generations

Cell line	Generation	% Mammosphere formation efficiency					
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
IPC-366	10 000 cells mL ⁻¹	0.12 \pm 0.04	0.20 \pm 0.07*	0.36 \pm 0.05*	0.38 \pm 0.03	0.40 \pm 0.02	0.37 \pm 0.04
	20 000 cells mL ⁻¹	0.64 \pm 0.11	0.84 \pm 0.06*	0.96 \pm 0.07*	0.98 \pm 0.05	1.02 \pm 0.05	0.97 \pm 0.01
SUM149	10 000 cells mL ⁻¹	0.09 \pm 0.01	0.15 \pm 0.04*	0.12 \pm 0.03 ^a	0.13 \pm 0.06 ^a	0.14 \pm 0.04 ^a	0.15 \pm 0.05 ^a
	20 000 cells mL ⁻¹	0.55 \pm 0.09	0.76 \pm 0.1*	0.72 \pm 0.08 ^a	0.64 \pm 0.03 ^a	0.66 \pm 0.07 ^a	0.67 \pm 0.01 ^a

*p < 0.05, significant differences between each pair of consecutive generations.

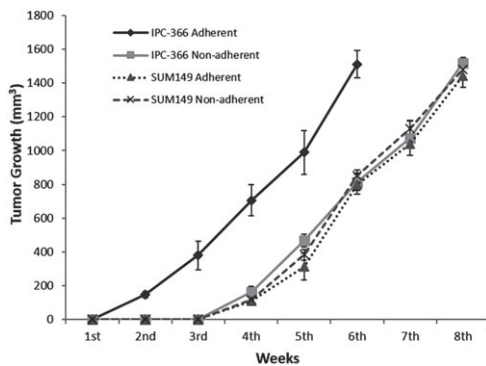
^aSignificant differences (p < 0.05) between cell lines within generations.

Table 2. Tumor growth parameters of IPC-366 and SUM149 adherent and nonadherent cells injected into SCID mice

Cell line	Frequency of tumor appearance	Time of tumor emergence	Time of tumor volume 1.5 cm ³	Frequency of metastasis in lymph nodes and lungs
IPC-366 adherent	100%	2 weeks	6 weeks	90%
IPC-366 nonadherent	100%	4 weeks*	8 weeks*	30%*
SUM149 adherent	80% ^a	4 weeks ^a	8 weeks ^a	80%
SUM149 nonadherent	60%* ^a	4 weeks	8 weeks	20%*

*p < 0.05, significant differences between adherent and nonadherent culture on each cell line.

^aSignificant differences (p < 0.05) between cell lines.

**Figure 3.** Tumor growth progression of IPC-366 and SUM149, in adherent and nonadherent cultures. Both cell lines followed a fast pattern of tumor growth progression. Tumor development is faster in adherent cultures than in nonadherent cultures. Bar represents means \pm SD. *p < 0.05; significant differences between adherent and nonadherent cell inoculations on each cell line.

volume progression was found in nonadherent and adherent cells injections, being fast in both cell lines. However there seems to be a slight but insignificant increase in progression of nonadherent tumors, when compared with adherent tumors.

Histopathology of cell lines and tumors

Histological results revealed that pellets from IPC-366 and SUM149 adherent cultures were very

similar (Figure 4A–D). Both cell lines were formed by isolated round cells of two cell size populations: large and small cells. The signs of malignancy were marked: meganuclei, evident nucleoli, marked anisocytosis and anisokaryosis, and aberrant mitoses. Among the large cells population, the presence of highly malignant multinucleated cells was very common. Also, as a common finding, some large cells, multinucleated or not, contained a rim of peripheral cytoplasm and showed a unique cytoplasmic clear space/vacuole and elongated eccentric nuclei, resembling the cytological morphology of endothelial cells (endothelial-like cells, ELCs; vasculogenic mimicry).

IPC-366 and SUM149 nonadherent cell pellets histopathology (Figure 4E–H) showed similar characteristics and differed from their adherent counterpart in the presence of more abundant ELCs and the formation of groups by tumor cells with an occasional central lumen (similar to mammary acini), interpreted as mammospheres. These structures were observed clearest in IPC-366 than in SUM149.

The histopathology of adherent (Figure 4I–L) and nonadherent (Figure 4M–P) tumors in mice revealed that IPC-366 and SUM149 share histological characteristics. Tumors were highly infiltrative,

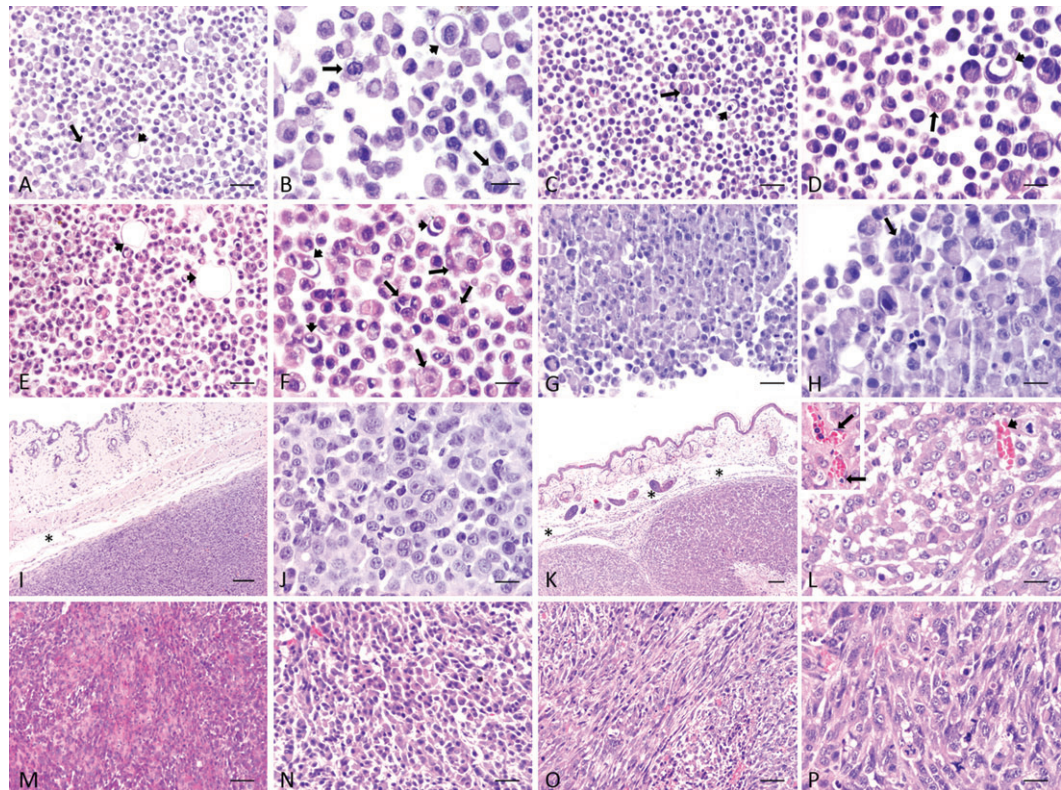


Figure 4. Pellets and tumors histology of IPC-366 and SUM149 cell lines, paraffin sections, H&E. (A–D) pellets adherent: (A) IPC-366, bar = 30 μ m; (B) IPC-366, bar = 15 μ m; (C) SUM149, bar = 30 μ m; (D) SUM149, bar = 15 μ m. Both cell lines present similar epithelial morphology with highly malignant tumor cells, multinucleated cells (large arrows) and endothelial-like cells (ELCs, short arrows). (E–H) pellets nonadherent: (E) IPC-366, bar = 30 μ m; (F) IPC-366, bar = 15 μ m; (G) SUM149, bar = 30 μ m; (H) SUM149, bar = 15 μ m. The presence of ELCs (short arrows) and the formation of structures similar to mammary acini (large arrows) are more frequent in IPC-366 cell line. (I–L) tumors adherent: (I) IPC-366, bar = 100 μ m; (J) IPC-366, bar = 15 μ m; (K) SUM149, bar = 100 μ m; (L) SUM 149, bar = 15 μ m. Solid, infiltrative tumors formed by neoplastic cells with marked atypia (anisokaryosis and anisocytosis); edema and lymphangiectasias in dermis (asterisks); in L, blood capillary formed by tumor cells (vasculogenic mimicry, short arrow) and blood capillary formed by endothelial cells (inset: large arrows). (M–P) Tumors nonadherent: (M) IPC-366, bar = 60 μ m; (N) IPC-366, bar = 30 μ m; (O) SUM149, bar = 60 μ m; (P) SUM149, bar = 30 μ m. Abundant spindle cells (with mesenchymal morphology).

poorly demarcated, unencapsulated, densely cellular and extended to the dermis and striated muscle. The neoplastic cells were arranged in solid masses and frequently isolated. In nonadherent tumors groups of elongated cells arranged in bundles were also seen. The neoplastic cells were round and large with eosinophilic cytoplasm and a large central nucleus with one or more evident nucleoli. Anysokariosys and anisocytosis were marked. Mitotic index was very high and atypical mitoses were frequently observed. Multinucleated cells were seen occasionally. Frequently, the presence of emboli in dermis capillaries and vascular spaces lined by highly malignant neoplastic

cells (vasculogenic mimicry phenomenon) were observed. Abundant areas of necrosis/apoptosis and hemorrhage were also observed.

Flow cytometry

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity (Figure 5) and immunophenotype (Figure 6) were measured in SUM149 and IPC-366 adherent and nonadherent cultures. Results revealed a slight ALDH activity in IPC-366 adherent culture (approximately 10%) but no ALDH activity in IPC-366 nonadherent. ALDH activity was up to 40% in SUM149 adherent cells and decreased fold-10 to approximately 4% in SUM149

nonadherent cells. The proportion of CD44⁺/CD24⁻ in adherent culture of IPC-366 (approximately 85%) was higher than in nonadherent culture (75%). However, SUM149 adherent and nonadherent culture CD44⁺/CD24⁻ phenotype showed an expression of approximately 60 and 88%, respectively, being higher in nonadherent culture than in adherent culture. There were differences in CD326 expression between cell lines. IPC-366 adherent and nonadherent cultures showed no CD326 expression; however, SUM149 adherent and nonadherent showed a high expression of CD326 (up to 95%) in both culture systems. IPC-366 and SUM149 adherent and nonadherent cultures were negative for CD133 and CD45. Both cell lines exhibited a CD146⁺ phenotype. CD146 expression was similar in both culture systems resulting in higher expression in SUM149 cell line (around 60%) than in IPC-366 cell line (around 15%).

Western blot

Differences in expression of various EMT markers were found between adherent and nonadherent cultures by western blot analysis (Figure 7). SUM149 and IPC-366 followed the same pattern of expressions in both cultures. E-cadherin expression (120 kDa) was higher in adherent culture than in nonadherent culture in both cell lines, and a similar expression pattern was observed in N-cadherin expression (130 kDa) that was higher in adherent culture than in nonadherent culture. Another EMT marker performed was fibronectin (240 kDa) that had a higher expression in nonadherent culture cells than in adherent culture.

Expression of VEGF-A (an angiogenic marker) (42 kDa) was found in both cell lines being higher in nonadherent cultures than in adherent cultures. Indeed, IPC-366 and SUM149 exhibited the inflammatory breast cancer characteristics: RhoC GTPase expression and WISP3 lack of expression. Also, it have been verified the lack of expression on the hormone receptors: ER, PR and HER-2 of both cell lines.

Discussion

IBC is a very aggressive type of breast cancer with poor prognosis; spontaneous canine IMC has been

proposed as a natural model for the study of this disease from clinical and histological point of view.⁴ Due to the low prevalence of IBC, research on this disease is complex and is based mainly on the use of few cell lines and *in vivo* models, thus there is a need to find new tools for its study. IPC-366 canine cell line, has been recently established¹² and so this study aims to validate this new cell line for its use in IBC and IMC research.

According to our results, IPC-366 shared several characteristics with its human counterpart the IBC cell line SUM149. Both cell lines are epithelial basal-like, triple negative and reproduce the typical histological 'inflammatory' phenotype in xenotransplanted SCID mice.^{12,28} Triple negative breast cancer (TNBC) accounts for approximately 10–15% of breast cancers, with a poorer prognosis than positive hormone receptor patients and present characteristics as aggressiveness, invasiveness, early metastases and unresponsive to therapeutic targets.²⁹ *In vitro* research on TN-IBC is conducted mainly on the triple negative cell line SUM149 and therefore, the canine IMC triple negative cell line, IPC-366, can be used for the research of novel therapeutic targets.¹² Alterations in RhoC GTPase and WISP3 genes were identified in IBC. The overexpression of RhoC GTPase and loss of WISP3 is commonly observed in IBC tumors when compared with non-IBC tumors.^{30,31} In this study, we observed that the canine cell line, IPC-366 also shared these molecular characteristics with its human counterpart SUM149. Therefore, IPC-366 resembles the molecular characteristics of IBC.

Tumors are composed of various types of cells. There is a small fraction of cells with the ability of self-renewal, multipotent differentiation, unlimited propagation and resistant to therapy, called cancer stem cells (CSCs) that give rise to the different type of cells within the tumor and are responsible for tumor formation and progression.¹³ Breast cancer stem cells (BCSC) were first identified by Al-Hajj *et al.*¹⁶ BCSC are capable of surviving and proliferating in nonadherent *in vitro* systems, forming clusters of cells called mammospheres.^{13,14} Originally, the mammosphere assay was developed as a method to propagate mammary stem cells in suspension culture (nonadherent culture).³² There are several human breast cancer cell lines that have the

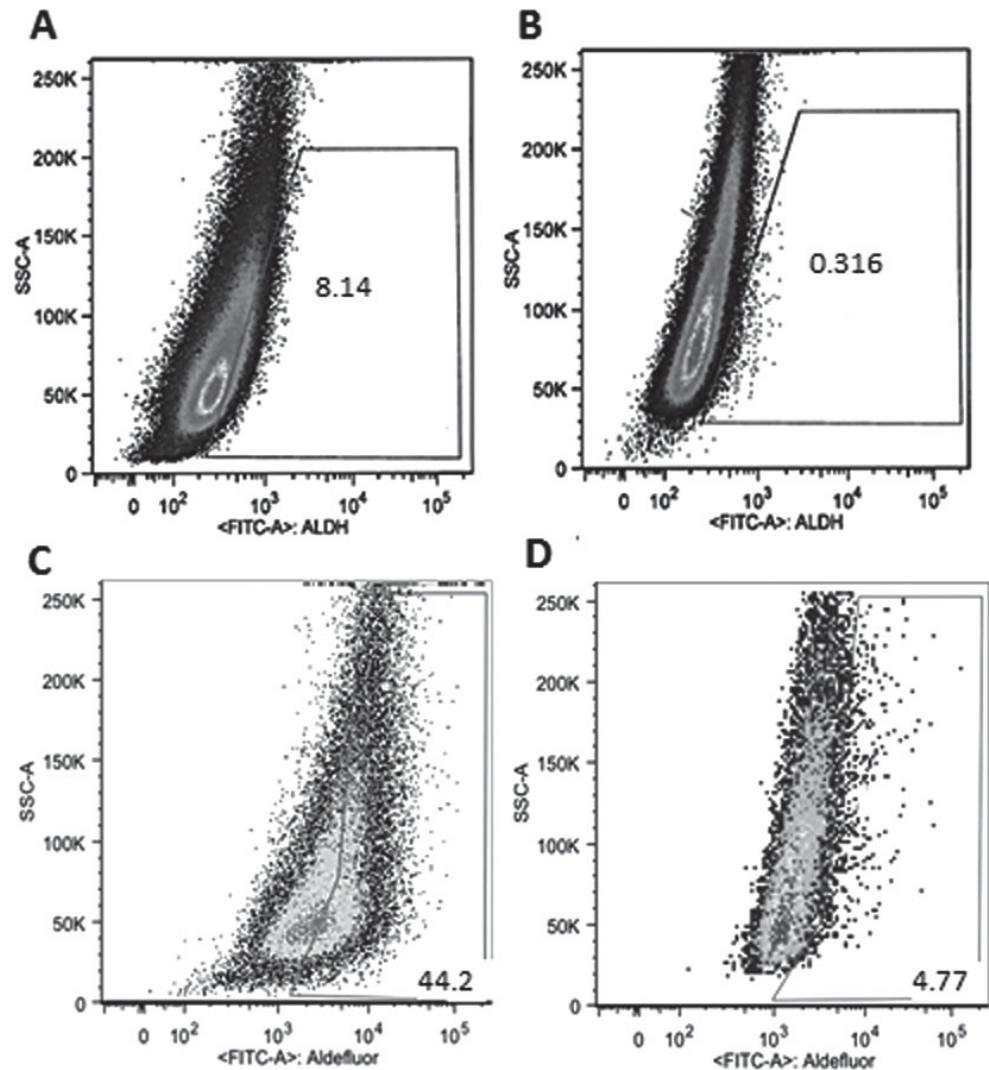


Figure 5. ALDH activity measured by Aldefluor Assay in IPC-366 adherent (A) and nonadherent cells (B) and SUM149 adherent (C) and nonadherent cells (D). Results show a reduced ALDH expression in nonadherent culture systems respect to adherent culture systems in both cell lines. Statistical differences ($p < 0.05$) were found between IPC-366 and SUM149 cultures systems.

ability to grow as mammospheres, such as MCF-7, MDA-MB-436, T47D, BT474,³² and also, the IBC cell lines, SUM149 and MDA-IBC-3.¹¹ It has been shown that canine mammary tumors contain cells that are able to generate mammospheres³³ and also, canine mammary cancer cell lines such as D17 osteosarcoma and REM134 mammary carcinoma, are also capable of growing as mammospheres.³⁴

IPC-366 and SUM149 were able to grow in non-adherent conditions forming mammospheres with a solid round spheres appearance. Breast cancer cell lines generally form colonies with distinctive

morphologies.³⁵ Following the Kenny *et al.*³⁵ morphological description, mammospheres originated from IPC-366 and SUM149 had a grape-like morphology, and form colonies with reduced cell-cell adhesion that were distinguished by their grape-like appearance, similar to mammospheres formed from the MDA-MB-468 breast cancer cell line. Research on BCSCs has the main disadvantage that nonadherent culture systems fail to develop after a number of serial passages.^{15,30,36} Mammospheres from different breast cancer cell lines, such as MCF-7 cell line (ER+/PR+/Her-2-), survive

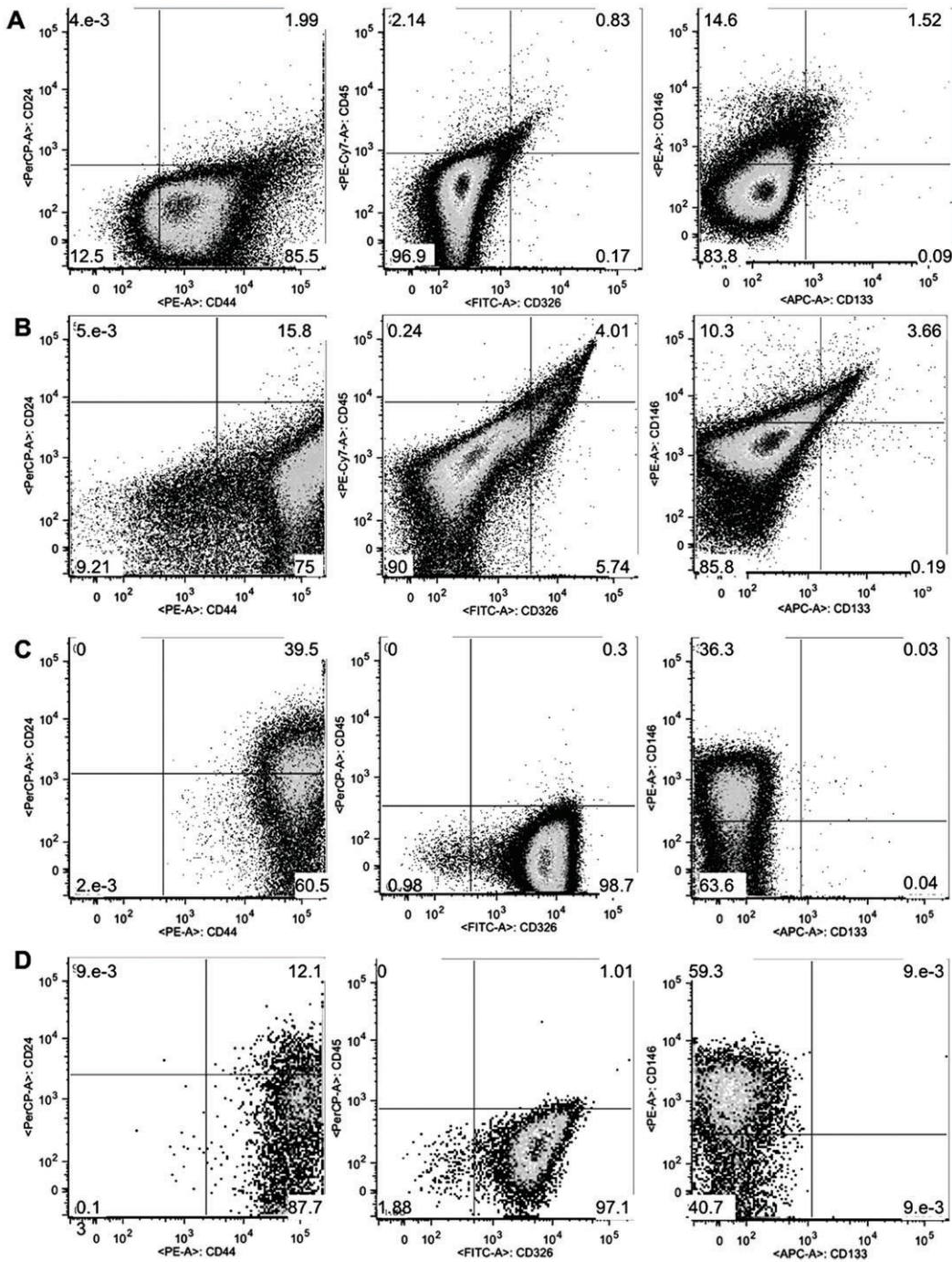


Figure 6. Immunophenotype from IPC-366 adherent cells (A), IPC-366 nonadherent cells (B), SUM149 adherent cells (C) and SUM149 nonadherent cells (D). Subpopulations defined by expression of different stem cell markers: CD24/CD44, CD45/CD326 and CD146/CD133 (from left to right). IPC-366 adherent cells showed a CD44+/CD24- cell population significant ($p < 0.05$) than SUM149 adherent cells. Statistical differences were also found in CD326 and CD146 positive expression between IPC-366 and SUM149 in both culture systems, being the expression higher in SUM149.

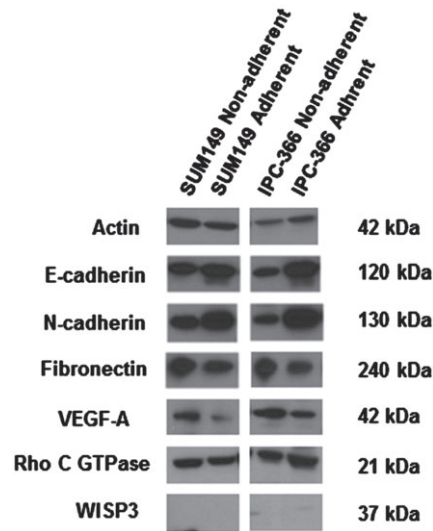


Figure 7. (A) SUM149 and IPC-366 (adherent and nonadherent culture) western blots protein expression of EMT markers (E-cadherin, N-cadherin, fibronectin), the angiogenic factor VEGF-A, and the characteristic IBC markers Rho C GTPase and WISP3. E-cadherin, N-cadherin and VEGF-A expressions were higher in adherent cultures; however, fibronectin expression was higher in nonadherent cultures. (B) Rho C GTPase and WISP3 expression of IPC-366 and SUM149 cell lines. IPC-366 exhibited IBC molecular expression of Rho C GTPase and the lack of expression of WISP3.

in suspension over more than five passages, but others such as MDA-MB-231 triple negative cell line, does not reach these number of passages.^{13,33} Ponti *et al.*¹⁴ observed that cultures from estrogen receptor-positive lesions could generate long-term spheres cultures for more than 40 passages. According to our results, IPC-366 and SUM149 are capable of surviving over six passages without altering their stem cell characteristics. Also, mammospheres from both cell lines have a long-term self-renewal potential and the MFE ratio slightly increased through passages. Few studies support data about SUM149 MFE; however, it seems that according to our results, SUM149 is capable of produce long-term mammospheres.³⁷ Therefore, IPC-366 and SUM149 mammospheres shared morphological and proliferative characteristics.

Proliferation rates of nonadherent and adherent culture cells are usually different, and depend on the cell line and matrix of the culture cells.³⁸ In this study a reduction in proliferation rates on mammospheres in IPC-366 and SUM149 cell lines

were found compared with adherent cells. According to our results, other studies with MCF10A cell line showed a reduction in proliferation rates in nonadherent cultures compared with adherent cultures that could be due to the capability of stromal cells to alter the differentiation status of the epithelial cells.³⁹ However other authors attribute this difference on the structure of spheroids, which may result in the lack of oxygen and nutrients, and the accumulation of waste at the core of the spheroid as they grow larger.^{38,40}

IPC-366 and SUM149 mammospheres had also the ability to form tumors in SCID mice after 4 weeks, indicating that these cells have a high tumorigenic capacity. Some authors observed that a minimum number of BCSC (between 100 and 1000 cells) could form tumors in SCID mice.^{14,16} Moreover, a correlation between the mammospheres size and their tumorigenicity has been previously indicated.³⁸ Histologically, we have found that tumors from nonadherent cells presented fusiform morphology characteristic of mesenchymal cells, which is consistent with the immunohistochemistry results previously obtained.¹²

Histological study of adherent and nonadherent pellets and tumors revealed a high similarity between the two cell lines studied. There are few references on mammosphere tumor histology and, to the best of our knowledge, there are no previous studies on the histology of paraffin embedded pellet mammospheres. Interestingly, both cell lines showed two distinct formations in nonadherent pellets: groups of epithelial cells arranged in acini-like structures and frequent cells with endothelial-like morphology. These structures were observed clearest in IPC-366 than in SUM149 and this could be due to a faster development of these structures in dog.

This pattern could represent the image of an 'early' mammary tumor, which would include 'true' mammary neoplastic cells and the corresponding initial vascular supply, in this case derived from neoplastic cells (vasculogenic mimicry). Other authors found hollow and solid structures in mammospheres derived from MUC1+ or CD10+ progenitors from reduction mamplasties, although the hollow structures were interpreted as

myoepithelial-like. In tumors from nonadherent cells of both cell lines the presence of vasculogenic mimicry (VM) was observed occasionally.⁴¹ Therefore, IPC-366 showed histological characteristics that resemble to those found in SUM149.

BCSC phenotype can be characterized by CD44⁺/CD24^{-/low} or ALDH1 expression^{13,14,16} and it is widely accepted that mammosphere forming potential resides in those cells with CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype.^{16,36} The literature regarding stem cells in canine mammary tumors is very scarce,⁴² but expression of CD44 in canine cancer cell lines is associated with proliferative status.⁴³ Expression of ALDH is also correlated with the development of distant metastasis and has been described as a marker of normal and malignant breast stem cells.^{34,44,45}

IPC-366 and SUM149 immunophenotype also shared several characteristics but differed in others. These cell lines showed a CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype in adherent and nonadherent conditions. However, SUM149 ALDH expression was found to be higher than IPC-366 in adherent and nonadherent culture systems. It is highly accepted that CD44⁺/CD24^{-/low} exhibit stem cell and basal/mesenchymal cell properties.^{17,32} Separately, CD44⁺ have been associated with mesenchymal stem cell characteristics.⁴⁶ Its positivity in adherent and nonadherent cultures of IPC-366 and SUM149 showed that these cell lines presented stem cell-like properties.

In adherent and nonadherent conditions, IPC-366 and SUM149 cells showed no expression of CD45 marker, which corroborates their mesenchymal-like phenotype since CD45 is a hematopoietic marker that is absent in mesenchymal stem cells (MSC).¹⁹ Several studies have suggested that MSC provoke breast cancer cells to form mammospheres by secreting different factors¹⁰ and that CD45⁻ cells are related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis^{10,45} according to our results. CD326 (EpCAM) is considered a marker for epithelial tumors, absent in mesenchymal, muscular, or neuroendocrine tissues,⁴⁶ and its overexpression is associated with poor survival in triple negative breast cancer patients.¹⁸ However, regarding the literature no studies have shown the implication of

this marker in canine mammary tumors. According to our results, CD326 is highly expressed in some epithelial cell lines such as SUM149.⁴⁷ Although further studies are necessary to elucidate the role of CD326 in IPC-366, the lack of its expression in this cell line suggests that the mesenchymal-like characteristics are more preserved in IPC-366 than SUM149.

CD133, another cancer stem cell surface marker,²⁰ has been found overexpressed in some studies on mammospheres derived from human breast cancer cell lines⁴⁸ and canine adenocarcinoma cell lines²⁷ and also it has been related with the vasculogenic mimicry phenomenon.⁴⁹ According to our results, IPC-366 and SUM149 in adherent and nonadherent conditions did not express CD133. However, it has been shown that both cell lines have vasculogenic mimicry characteristics^{12,50} and pellets sections from both cell lines revealed the presence of cells resembled endothelial cells in adherent and nonadherent conditions. On the contrary, both cell lines expressed CD146, a cell adhesion molecule considered a specific stem cell marker for endothelial cell lineage.⁵¹ CD146 is strongly expressed in metastatic lesions, plays a critical role in tumor angiogenesis and increase the motility and invasiveness of many tumor cells²³ by promoting EMT.⁵² Thus, the expression of CD146 in IPC-366 and SUM149 could be due to the presence of cells with endothelial-like properties in relation with the vasculogenic mimicry phenomenon that was found. This subpopulation of endothelial-like cells would exhibit characteristics of endothelial cells and MSCs and could be responsible of the angioinvasive phenotype characteristic of the 'inflammatory' phenotype of breast cancer. According to these results and the characteristic angiogenic phenotype of IBC^{6,53} and IMC,⁷ this study showed an expression of VEGF-A of IPC-366 and SUM149 adherent and nonadherent cultures. VEGF-A is one of the most potent promoters of angiogenesis and lymphangiogenesis; is involved in endothelial cell growth, motility, and blood vessel permeability⁵⁴ and is overexpressed in IBC⁵⁵ and IMC.⁷ Ponti *et al.* suggested that breast cancer-initiating cells grown in nonadherent conditions have a high angiogenic activity associated with the amount of VEGF-A expression.¹⁴ These

authors have also observed that VEGF was secreted in higher concentrations in nonadherent cells compared with adherent cells.⁵⁶ Our results are in accordance as previously described that nonadherent cells expressed more VEGF-A than adherent cells, being angiogenesis more frequent in nonadherent cells.

EMT is a process involved in tumor progression, leading epithelial cells to turn into mesenchymal-like cells⁵⁷ mediating tumor invasion and metastasis.³² The acquisition of the mesenchymal phenotype involved the loss of epithelial markers expression.^{32,58} In addition to the previous results of the mesenchymal-like characteristics of IPC-366 and SUM149 cells, the expression of the EMT markers N-cadherin and E-cadherin was higher in adherent culture than in nonadherent culture. The decrease in E-cadherin expression observed in nonadherent cultures, is associated with the loss of epithelial phenotype and the consequent acquisition of a mesenchymal phenotype, which has been shown to promote sphere formation.¹⁰ Contrarily, IBC typically overexpresses E-cadherin and this is one of the unique characteristics of this disease.⁵⁹ Similarly to the spontaneous disease, the IBC cell line SUM149⁴¹ and IMC cell line IPC-366,¹² overexpressed E-cadherin. Also, fibronectin expression was higher in nonadherent culture, which correlates with the acquisition of a mesenchymal phenotype⁵⁷ and also could be in relation to the extracellular matrix formation more 'realistic' in nonadherent than in adherent cultures system.

In this study we evaluated the histology, tumorigenicity, cell populations and protein production found in nonadherent and adherent cultures of a novel canine mammary cancer cell line and its human counterpart, showing their similarities in most of the aspects studied. This work is of significance because there are currently very few cell lines to study IBC. As such, we believe that this canine IMC cell line with similarities to its human IBC counterpart will provide a useful tool to conduct basic tumor biology studies on IBC and aggressive metastatic cancer in general, but also to provide an opportunity for the development of potential therapeutic agents and for future interspecies comparative new therapeutic strategies against IBC/IMC.

Acknowledgments

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Education (research project no. SAF 2009-10572). We are grateful to Pedro Aranda for his histological technical assistance and Carmen Garcia-Velasco for animal maintenance.

References

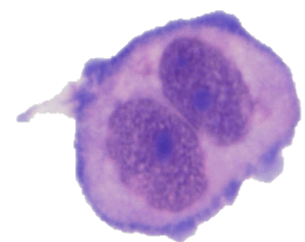
- Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA and Levine PH. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; **97**: 966–975.
- Yamauchi H, Woodward WA, Valero V, Alvarez RH, Lucci A, Buchholz TA, *et al.* Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn. *The Oncologist* 2012; **17**: 891–899.
- Pérez-Alenza MD, Tabanera E and Peña L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; **219**: 1110–1114.
- Peña L, Pérez-Alenza MD, Rodríguez-Bertos A and Nieto A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003; **78**: 141–148.
- Kleer CG, van Golen KL and Merajver SD. Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Research* 2000; **2**: 423–429.
- Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, van Dam P, Colpaert CG, *et al.* Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clinical Cancer Research* 2004; **10**: 7965–7971.
- Clemente M, Sánchez-Archidona AR, Sardón D, Díez L, Martín-Ruiz A, Caceres S, *et al.* Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *Veterinary Journal* 2013; **97**: 427–432.
- Tavassoli FA. Inflammatory Carcinoma. Infiltrating Carcinomas: Special Types. In: *Pathology of the Breast*. 2nd edn., New York, Mc Graw-Hill, 1999: 538–41.
- Giordano SH and Hortobagyi GN. Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main

- problems that must be addressed. *Breast Cancer Research* 2003; **5**: 284–288.
10. Klopp AH, Lacerda L, Gupta A, Debeb BG, Solley T, Li L, et al. Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. *PLoS One* 2010; **16**;5(8):e12180. doi: 10.1371/journal.pone.0012180.
 11. Holliday DL and Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 2011; **13**: 215.
 12. Caceres S, Peña L, de Andres PJ, Illera MJ, Lopez MS, Woodward WA, et al. Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366. *PLoS One* 2015; **10**: e0122277. doi:10.1371/journal.pone.0122277.
 13. Wang R, Lv Q, Meng W, Tan Q, Zhang S, Mo X, et al. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *Journal of Thoracic Disease* 2014; **6**: 829–837.
 14. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Research* 2005; **65**: 5506–5511.
 15. Yamada KM and Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007; **130**: 601–610.
 16. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**: 3983–3988.
 17. Jaggupilli A and Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clinical & Developmental Immunology* 2012. doi:10.1155/2012/708036.
 18. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK and Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treatment Reviews* 2012; **38**: 68–75.
 19. Calloni R, Cordero EA, Henriques JA and Bonatto D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells and Development* 2013; **22**: 1455–1476.
 20. Irollo E and Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *American Journal of Translational Research* 2013; **5**: 563–581.
 21. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M and Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical Cancer Research* 2005; **11**: 1154–1159.
 22. Zeng Q, Li W, Lu D, Wu Z, Duan H, Luo Y, et al. CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; **109**: 1127–1132.
 23. Wang Z and Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Letters* 2013; **330**: 150–162.
 24. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research* 2006; **8**: R59.
 25. Phillips TM, McBride WH and Pajonk F. The response of CD24 (-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; **98**: 1777–1785.
 26. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007; **11**: 259–273.
 27. Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H, Katsumoto T, Ichikawa H, Ohkusu-Tsukada K, et al. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Research in Veterinary Science* 2011; **91**: 254–60.
 28. Hoffmeyer MR, Wall KM and Dharmawardhane SF. In vitro analysis of the invasive phenotype of SUM 149, an inflammatory breast cancer cell line. *Cancer Cell International* 2005; **5**: 11.
 29. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Annals of Oncology* 2012; **23**: 7–12.
 30. van Golen KL, Davies S, Wu ZF, Wang Y, Bucana CD, Root H, et al. A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. *Clinical Cancer Research* 1999; **5**: 2511–2519.
 31. Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, van Golen KL, Wu ZF, Livant D, et al. WISP3 is a novel tumor suppressor gene of inflammatory breast cancer. *Oncogene* 2002; **21**: 3172–3180.
 32. Iglesias JM, Beloqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguirra A, et al. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS One* 2013; **8**(10): e77281. doi:10.1371/journal.pone.0077281.

33. Cocola C, Anastasi P, Astigiano S, Piscitelli E, Pelucchi P, Vilardo L, *et al.* Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reproduction in Domestic Animals* 2009; **44**: 214–217.
34. Blacking TM, Waterfall M and Argyle DJ. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011; **141**: 46–57.
35. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, *et al.* The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology* 2007; **1**: 84–96.
36. Dey D, Saxena M, Paranjape AN, Krishnan V, Giraddi R, Kumar MV, *et al.* Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture. *PLoS One* 2010; **4**: e5329. doi:10.1371/journal.pone.0005329.
37. Hu K, Law JH, Fotovati A and Dunn SE. Small interfering RNA library screen identified polo-like kinase-1 (PLK1) as a potential therapeutic target for breast cancer that uniquely eliminates tumor-initiating cells. *Breast Cancer Research* 2012; **14**: R22.
38. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF and Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technology* 2014; **12**: 207–218.
39. Wang X, Sun L, Maffini MV, Soto A, Sonnenschein C and Kaplan DL. A complex 3D human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function. *Biomaterials* 2010; **31**: 3920–3929.
40. Khaitan D, Chandna S, Arya MB and Dwarakanath BS. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line. Implications for tumor therapy. *Journal of Translational Medicine* 2006; **4**: 12.
41. Smart CE, Morrison BJ, Saunus JM, Vargas AC, Keith P, Reid L, *et al.* In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. *PLoS One* 2013; **8**(6):e64388. doi: 10.1371/journal.pone.0064388.
42. Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Satnke L, *et al.* Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 2008; **10**: R52.
43. Magalhães GM, Terra EM, de Oliveira Vasconcelos R, de Barros Bandarra M, Moreira PR, Rosolem MC, *et al.* Immunodetection of cells with a CD44+/CD24- phenotype in canine mammary neoplasms. *BMC Veterinary Research* 2013; **9**: 205.
44. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2010; **16**: 45–55.
45. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; **449**: 557–563.
46. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, *et al.* Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology* 2004; **35**: 122–128.
47. Gadalla SE, Öjemalm K, Vasquez PL, Nilsson IM, Ericsson C, Zhao J, *et al.* EpCAM associates with endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (ERAP2) in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; **439**: 203–208.
48. Nadal R, Ortega FG, Salido M, Lorente JA, Rodríguez-Rivera M, Delgado-Rodríguez M, *et al.* CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: potential role in resistance to chemotherapy. *International Journal of Cancer* 2013; **133**: 2398–2407.
49. Wu S, Yu L, Wang D, Zhou L, Cheng Z, Chai D, *et al.* Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer* 2012; **12**: 535.
50. Pradip D, Jennifer C, Brian LJ and Nandini D. Wnt- β -catenin pathway regulates vascular mimicry in triple negative breast cancer. *Journal of Cytology & Histology* 2013; **4**: 198. doi:10.4172/2157-7099.1000198.
51. Kraan J, van den Broek P, Verhoef C, Grunhagen DJ, Taal W, Gratama JW, *et al.* Endothelial CD276 (B7-H3) expression is increased in human malignancies and distinguishes between normal and tumour-derived circulating endothelial cells. *British Journal of Cancer* 2014; **111**: 149–156.
52. Zeng G, Cai S, Liu Y and Wu GJ. METCAM/MUC18 augments migration, invasion, and tumorigenicity of human breast cancer SK-BR-3 cells. *Gene* 2012; **492**: 229–238.
53. Robertson FM, Simeone AM, Lucci A, McMurray JS, Ghosh S and Cristofanilli M. Differential regulation of the aggressive phenotype of inflammatory breast cancer cells by prostanoid receptors EP3 and EP4. *Cancer* 2010; **116**: 2806–2814.

54. Kowanetz M and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clinical Cancer Research* 2006; **12**: 5018–5022.
55. Arias-Pulido H, Chaheer N, Gong Y, Qualls C, Vargas J and Royce M. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer* 2012; **12**: 298.
56. Sung KE, Su X, Berthier E, Pehlke C, Friedl A and Beebe DJ. Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models. *PLoS One* 2013; **8**: e76373. doi:10.1371/journal.pone.0076373.
57. Kong D, Li Y, Wang Z and Sarkar FH. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (emt)-phenotypic cells: are they cousins or twins? *Cancers* 2011; **3**: 716–729.
58. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704–715.
59. Ye Y, Tellez JD, Durazo M, Belcher M, Yearsley K and Barsky SH. E-cadherin accumulation within the lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer is due to altered trafficking. *Anticancer Research* 2010; **30**: 3903–3910.

CAPÍTULO III:
**Determinación del microambiente
tumoral de hormonas esteroides en
machos y hembras de modelos
murinos de xenotrasplantes de líneas
celulares de IBC e IMC**



1. Resumen

Tanto el IBC como el IMC presentan un fenotipo muy agresivo. Se ha observado que líneas celulares procedentes de ambos tipos de cáncer inflamatorio presentan un rápido crecimiento cuando son inoculadas en ratones inmunodeprimidos.

Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar la capacidad tanto de ratones hembra como de ratones macho, para reproducir tumores de IBC e IMC, e identificar las diferencias en la producción de hormonas esteroides en los tumores originados. Para llevar a cabo el estudio se utilizan 60 ratones (30 machos y 30 hembras) de 6-8 semanas de edad a los cuales se les inoculan 10^6 células por vía subcutánea de las líneas celulares IPC-366 y SUM149. Se observa el crecimiento tumoral y cuando el volumen tumoral alcanza los $1,5 \text{ cm}^3$ de crecimiento, se sacrifican los animales y se recogen muestras de sangre y los tumores generados. El análisis hormonal, tanto en suero como en homogenizado de los tumores, se realiza mediante un EIA de competición validado para esta especie.

Los resultados revelan que IPC-366 reproduce tumores en el 90% de los machos 2 semanas después de ser inoculadas las células, en comparación con el 100% de las hembras que reproducen el tumor en el mismo tiempo. En cambio, SUM149 reproduce tumores en el 40% de los machos a diferencia del 80% de tumores encontrados en las hembras, ambos, desarrollados a las 4 semanas post-inoculación. Ambas líneas celulares producen metástasis a distancia en pulmones, presentando las hembras mayores tasas metastásicas. El análisis hormonal revela que los tumores de los machos presentaban mayores concentraciones de T y

E1SO4 en comparación con los tumores de las hembras. Por otro lado, los niveles de esteroides en suero son más bajos que los encontrados en los tumores. En conclusión, podemos deducir que los ratones de ambos sexos son un buen biomodelo que sirve como herramienta para la investigación del IBC e IMC. Además, los niveles hormonales intratumorales son cruciales en el desarrollo y progresión de estos tumores.

2. Diseño experimental

En este estudio se determinan los niveles hormonales del ambiente tumoral de ratones macho y hembras inoculados con las líneas celulares IPC-366 y SUM149. Para ello, se utilizan un total de sesenta ratones (30 machos y 30 hembras) divididos cada uno en 3 grupos de 10 animales: grupo control; grupo de animales inoculados con IPC-366; y grupo de animales inoculados con SUM149.

Cada semana, se mide la progresión del tumor con calibre de precisión. En el momento del sacrificio de los animales, se procede a realizar extracciones de sangre del plexo venoso submandibular y, a la recogida de los tumores. Una vez realizado el experimento se determina:

- ✚ Parámetros de frecuencia de aparición de tumores, frecuencia de aparición de metástasis y curvas de crecimiento tumoral en los ratones machos y hembras.
- ✚ Validación del uso de un biomodelo de IBC e IMC realizado en ratones macho para el estudio de ambas enfermedades.
- ✚ Determinación de los niveles esteroides (P4, A4, T, E1SO4 y E2) en suero de los animales inoculados con las líneas celulares comparándolos con los del grupo control.
- ✚ Determinación de los niveles hormonales (P4, A4, T, E1SO4 y E2) intratumorales en homogeneizados de los tumores encontrados en machos y hembras.

✚ Análisis de las diferencias de crecimiento tumoral entre machos y hembras así como los niveles hormonales intratumorales y sus diferencias.

Research Article

Steroid Tumor Environment in Male and Female Mice Model of Canine and Human Inflammatory Breast Cancer

Sara Caceres,¹ Laura Peña,² Gema Silvan,¹ Maria J. Illera,¹ Wendy A. Woodward,³
James M. Reuben,⁴ and Juan C. Illera¹

¹Department of Animal Physiology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

²Department of Animal Medicine, Surgery and Pathology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

³Department of Radiation Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

⁴Department of Hematopathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

Correspondence should be addressed to Sara Caceres; sacacere@ucm.es

Received 30 December 2015; Revised 27 March 2016; Accepted 31 March 2016

Academic Editor: Sumanta Chatterjee

Copyright © 2016 Sara Caceres et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Canine inflammatory mammary cancer (IMC) shares clinical and histopathological characteristics with human inflammatory breast cancer (IBC) and has been proposed as a good model for studying the human disease. The aim of this study was to evaluate the capacity of female and male mice to reproduce IMC and IBC tumors and identify the hormonal tumor environment. To perform the study sixty 6–8-week-old male and female mice were inoculated subcutaneously with a suspension of 10^6 IPC-366 and SUM149 cells. Tumors and serum were collected and used for hormonal analysis. Results revealed that IPC-366 reproduced tumors in 90% of males inoculated after 2 weeks compared with 100% of females that reproduced tumor at the same time. SUM149 reproduced tumors in 40% of males instead of 80% of females that reproduced tumors after 4 weeks. Both cell lines produce distant metastasis in lungs being higher than the metastatic rates in females. EIA analysis revealed that male tumors had higher T and SO4E1 concentrations compared to female tumors. Serum steroid levels were lower than those found in tumors. In conclusion, IBC and IMC male mouse model is useful as a tool for IBC research and those circulating estrogens and intratumoral hormonal levels are crucial in the development and progression of tumors.

1. Introduction

Human inflammatory breast cancer (IBC) is the most aggressive mammary neoplasia that affects women [1, 2]. IBC accounts for less than 6% of human breast cancer diagnoses with the poorest survival in women [2, 3]. Canine inflammatory mammary cancer (IMC) has been proposed as the best spontaneous animal model for the study of human IBC [4]. The main histological characteristic of the disease in both species is the massive invasion of dermal lymphatic vessels by neoplastic cells which blocks lymph drainage causing the characteristic edema [5, 6]. In both species, this type of cancer is highly angiogenic and angioinvasive [4, 7–9].

Several human IBC cell lines have been established in order to study the mechanisms of this special type of breast cancer *in vitro* such as SUM149, SUM190, and MDA-IBC-3

[10–12]. Recently IPC-366, an IMC triple negative cell line, has been established [13].

On the other hand, male breast cancer (MBC) is a rare disease that accounts for less than 1% of all breast carcinomas [14] and male inflammatory breast cancer is extremely rare [15]; however, the incidence of MBC is increasing [16]. MBC appears to be biologically similar to female breast cancer [16] and it has been found that clinical and histological features in male and female inflammatory breast cancer are also similar [15]. Hormone imbalance between estrogens and androgens levels is one of the main risk factors for MBC [14], as it is known that androgens exert inhibitory effects in hormone-dependent breast cancer cells [14, 17], but the role of androgens in breast cancer development is still unclear.

Several studies have demonstrated that the tumor tissues have a local steroid synthesis [18]. Biologically active

estrogens are locally produced by estrogen-producing enzymes, such as aromatase that converts circulating androstenedione to estrone or testosterone to estradiol in breast carcinoma [19]. Also intratumoral androgens concentrations were reported to be significantly higher in breast carcinoma [20], and androgen-producing enzymes, such as 17 β HSD5 that converts circulating androstenedione to testosterone, and 5 α -reductase type 1, which reduces testosterone to DHT, were expressed [21].

The development of xenografts has been a useful tool for improving our understanding of breast cancer progression and metastasis [22–24]. The majority of breast cancer xenografts are performed on female mice. Therefore, the aim of this study was to conduct a male mouse model of IBC and IMC to determine the similarities and differences between female and male tumor progression and tumor hormonal environment.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture. Canine inflammatory mammary carcinoma cell line, IPC-366, was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) containing 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, and 1% antibiotic-antimycotic (Sigma Aldrich). Its human counterpart, SUM149 cell line, was obtained from Asterand plc (Detroit, MI) and was cultured in Ham's F12 (Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum, 5 μ g/mL insulin, 1 μ g/mL hydrocortisone, and antibiotic-antimycotic (Sigma Aldrich).

All cell lines were cultured in 25 cm² culture flasks and were maintained in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C. Cell culture was observed daily by a phase-contrast microscopy.

2.2. Animals. A total of sixty 6–8-week-old female (F) mice and male (M) mice BALB/cJHan[®]Hsd-Prkdcscid (SCID) (Harlan Laboratories Models, SL, Barcelona, Spain) were used in this study, divided into the following groups: 20 (10 F and 10 M) as serum control group and 40 (F and M) inoculated with IPC-366 ($n = 20$) and SUM149 ($n = 20$) as experimental groups (serum and tumor homogenates). The animals were housed in a flexible-film isolator (Isotec, Harlan Laboratories Models, SL) in cages (1–2 animals per cage), in a room with controlled environmental conditions (20–22°C; 50–55% relative humidity; 10–15 air changes per hour; and a 12:12-hour light:dark cycle). Food and water, previously sterilized, were provided ad libitum. Prior to all procedures, animals were anesthetized with isoflurane (IsoVet) at 4% for induction and 1.5% for maintaining sedation, supplied in a fresh gas flow rate of 0.5 L of oxygen/minute, and were observed until fully recovered. Animals were sacrificed by a lethal dose of isoflurane.

Clinical and experimental protocols of this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University Complutense of Madrid, Spain (number: 115). All procedures were completed in accordance with

the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and conformed to the relevant EU Directive.

2.3. Mice Cell Inoculation. A suspension of 10⁶ IPC-366 cells and 10⁶ SUM149 cells were implanted subcutaneously into the fourth inguinal mammary gland. Mice were inspected twice/week for the development of tumors. If tumors were detected, they were weekly monitored by palpation and measured by calipers. Mice were sacrificed when tumor volume was up to 1500 mm³. Blood samples were taken from the submandibular venous sinus. Tumors were collected at necropsy for homogenates.

2.4. Steroid Determinations in Serum and Tumor Homogenates. Tumors were homogenized in 4 mL of PBS (pH 7.2) and centrifuged at 1200 g, for 20 min at 4°C. Supernatants were collected and aliquoted individually (–80°C) until hormone assays. Blood samples were centrifuged at 1200 g and 4°C for 20 min and serum was separated and stored frozen at –20°C until assayed. Estrone sulphate (SO4E1: ab R522-2), 17 β -estradiol (E2: ab C6E91), androstenedione (A4: ab C9111), testosterone (T: R156), and progesterone (P4: C914) levels of tumor homogenates and serum samples were assayed by enzyme-immunoassay (EIA) previously validated [25]. All antibodies were developed in the Department of Animal Physiology (UCM, Spain).

All hormone concentrations were expressed in ng/g (for tumor homogenates) and ng/mL (for serum samples), except serum E2 concentrations that were expressed in pg/mL.

2.5. Statistics. The statistics software used for data analysis was SAS 9.4 (UCM, Madrid, Spain). The results were expressed as the means \pm SD. For tumor progression analysis, to compare both cell lines (IPC-366 and SUM149) in each group the Wilcoxon rank-sum test was performed. For comparisons between groups on each cell line, we used the Kruskal-Wallis test followed by a pairwise nonparametric multiple comparisons test when the overall contrast was significant. Wilcoxon signed ranks test with Bonferroni correction was used for comparisons between weeks on each group and cell line. Differences in hormonal concentrations between group means were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by appropriate *post hoc* tests for similar variances (Duncan Test) or different ones (Games Howell test). In all statistical comparisons, $p < 0.05$ was accepted as denoting significant differences.

3. Results

3.1. Tumor Growth Progression in Male and Female Mice. IPC-366 and SUM149 cells were injected subcutaneously on female and male SCID mice to observe if there were differences in tumor growth parameters (Table 1). All female mice inoculated with IPC-366 cells reproduced a tumor that was appreciable approximately two weeks after cell injection (16.64 \pm 1.72 days). However, 80% of female mice inoculated with SUM149 cells reproduced a tumor with significant

TABLE 1: Tumor growth parameters of female and male mice inoculated with IPC-366 and SUM149 cells.

Cell line	Gender	% of animals with tumor	Time of palpable tumor (days)	Time of 1500 mm ³ volume (days)	% of animals with ulceration	% of animals with metastasis
IPC-366 (<i>n</i> = 20)	Female	100%	16.64 ± 1.72	42.02 ± 2.35	50%	90%
	Male	90%	15.16 ± 2.60	39.66 ± 3.29	0%*	20%*
SUM149 (<i>n</i> = 20)	Female	80%	26.82 ± 2.19 ^a	53.40 ± 4.86 ^a	30%	80%
	Male	40% ^{*,a}	24.50 ± 3.5 ^a	51.33 ± 3.66 ^a	10%	50% ^{*,a}

* $p < 0.05$, significant differences between females and males inoculated with each cell line. ^aSignificant differences ($p < 0.05$) between cell lines.

TABLE 2: Serum steroid concentrations in female (F) and male (M) mice in control group, inoculated with IPC-366 and SUM149 cells.

Steroid hormone	Gender	Control	IPC-366	SUM149
SO4E1 (ng/mL)	F	1.30 ± 0.03 ^a	0.11 ± 0.12 ^{b,1}	0.12 ± 0.01 ^{b,1}
	M	0.29 ± 0.04 ^{*,a}	0.07 ± 0.02 ^{b,1}	0.09 ± 0.03 ^{b,1}
E2 (pg/mL)	F	42.79 ± 3.64 ^a	6.73 ± 0.37 ^{b,1}	8.67 ± 0.71 ^{b,1}
	M	6.00 ± 0.26 ^{*,a}	2.11 ± 0.12 ^{*,b,1}	2.91 ± 0.22 ^{*,b,1}
A4 (ng/mL)	F	0.21 ± 0.03 ^a	0.64 ± 0.13 ^{b,1}	0.78 ± 0.18 ^{b,1}
	M	0.14 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.09 ^{b,1}	0.56 ± 0.11 ^{b,1}
T (ng/mL)	F	0.5 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.09 ^{a,1}	0.45 ± 0.12 ^{a,1}
	M	2.3 ± 0.6 ^{*,a}	1.66 ± 0.39 ^{*,a,1}	1.72 ± 0.28 ^{*,a,1}
P4 (ng/mL)	F	3.59 ± 0.04 ^a	0.48 ± 0.22 ^{b,1}	0.57 ± 0.07 ^{b,1}
	M	1.10 ± 0.32 ^{*,a}	0.18 ± 0.03 ^{*,b,1}	0.32 ± 0.05 ^{b,1}

* $p < 0.05$, significant differences between females and males. Different letters denoted statistical differences ($p < 0.05$) between control and cell lines. Different numbers denoted statistical differences ($p < 0.05$) between cell lines.

difference ($p < 0.05$) in tumor appearance that was in approximately 4 weeks after cell injection (26.82 ± 2.19 days).

Male mice showed similar results on each cell line. Results revealed that 90% and 40% of male mice inoculated with IPC-366 and SUM149, respectively, originated tumors. In SUM149, frequency of tumor appearance in males was halved with respect to females, being a significant difference ($p < 0.05$). IPC-366 and SUM149 males showed no statistically significant differences with respect to females in time of tumor occurrence and time in which tumor volume of 1500 mm³ was reached.

Results of frequency of mice that developed ulceration and metastasis also differed between males and females inoculated with both cell lines. The percentage of ulcerations and metastasis found in males was reduced in contrast to the females. Frequency of ulceration was significantly higher ($p < 0.05$) in females (IPC-366 50%; SUM149 30%) than in males (IPC-366 10%; SUM149 0%). Also, both models developed spontaneous distant metastasis with significantly higher ($p < 0.05$) frequency in females (IPC-366 90%; SUM149 80%) than males (IPC-366 20%; SUM149 50%).

Tumor growth progression in males and females of IPC-366 and SUM149 cell lines followed a similar pattern (Figure 1). Both models exhibited rapid growth *in vivo* reaching a volume of 1500 mm³ approximately 6–8 weeks after cell inoculation and no statistical differences were found in tumor progression results.

3.2. Hormonal Tumor Environment. Steroid determinations in tumor homogenates revealed that tumors from males and females differed on estrogen and androgen levels (Figure 2).

P4 levels were lower in males compared with female P4 levels but not significantly. However, A4 and T levels were significantly higher ($p < 0.05$) in males than in females. Estrogen levels were higher in female tumors than in males with this difference being significant ($p < 0.05$) in SO4E1 levels, but E2 levels did not show any significant difference.

3.3. Serum Hormonal Concentrations. Results from serum steroid concentrations (Table 2) in control and experimental groups showed that control mice had significantly higher ($p < 0.05$) steroid levels than IPC-366 and SUM149, except A4 concentrations that were significantly higher ($p < 0.05$) in IPC-366 and SUM149 mice than in control mice. Differences between females and males in control and experimental mice were also found. SO4E1, E2, and P4 were significantly higher ($p < 0.05$) in female mice than in males. SUM149 mice did not show any statistical differences in these steroid concentrations. However, IPC-366 mice showed statistical differences ($p < 0.05$) in E2 and P4 levels but not in SO4E1, being higher in females than males. Besides, T levels were significantly higher ($p < 0.05$) in males than females in control, IPC-366, and SUM149 mice, but in A4 concentrations any statistical difference between females and males was found.

4. Discussion

IMC and IBC are considered the most malignant and aggressive subtypes of breast cancer that affect female dogs and humans, respectively, [3–5] and IMC has been suggested as a model to study the human disease [4, 5]. Recently, a triple

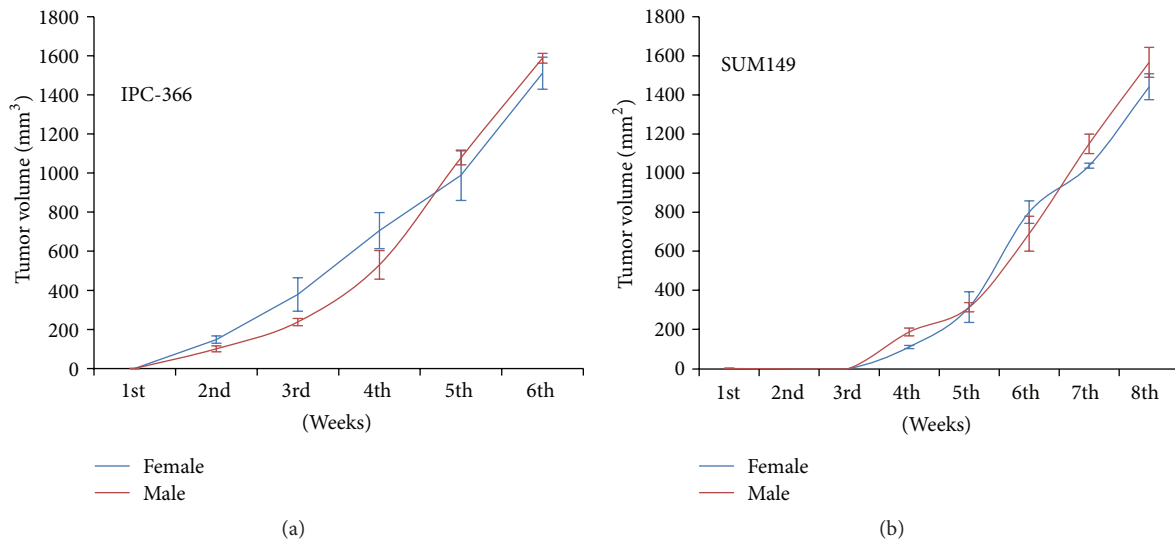


FIGURE 1: *In vivo* tumor growth progression of (a) IPC-366 and (b) SUM149 male and female mice. Tumor growth followed the same pattern in males and females in both cell lines. Lines represent means \pm SD. There were no statistical differences between groups.

negative IMC cell line (IPC-366) has been established as a useful tool for breast cancer research [13].

Animal models are of great value in cancer research. However, the microenvironment around the tumor is crucial for tumor development [26] and hormonal secretion plays an important role.

This study was intended to develop a male animal model for elucidating which endocrine factors may be involved in breast carcinogenesis, comparing tumor growth and intratumoral steroids levels in female and male mice inoculated with IBC and IMC cell lines (SUM149 and IPC-366 cell lines, resp.).

Our results revealed that both cell lines were capable of reproducing tumors in male mice at the same time compared to female mice, but the frequency of tumor appearance was lower than in female mice. The reason of the lower frequency rates found in male mice could be due to the androgen environment that male mice provide as it is known that androgens exert inhibitory effects in hormone-dependent breast cancer cells [17]. To our knowledge, this is the first male animal model for breast cancer research, as male breast cancer development is still unclear. We also found that metastases and ulceration rates were also lower in males. Tumor metastasis comprises different processes that lead tumor cells move away from the tumor to a distant location [27] and some authors suggested that stromal cells regulate the production of various factors implicated in metastasis process such as COX2, TNF- α , IL-6, and IL-11 [28]. However, hormone levels could also exert an influence on metastatic process. In point of fact, several authors' associate levels of expression of SO4E1 with lymph node metastases [29] that is also in agreement with our results in female mice, where we found higher amount levels of intratumoral SO4E1 and metastatic rates.

In ER positive breast carcinomas, androgens are well known to suppress cell proliferation but there is poor knowledge of the roles of androgens in triple negative carcinomas [30]. It is known that ER/PR negative carcinomas are associated with decreased hormone levels of androgens and estrogens when compared to ER/PR positive cancers [18]; this hypothesis was supported by Blankenstein et al. that observed significant estradiol levels in ER-negative tumors [31].

Wiebe suggested that P4 metabolites produced within breast tissues might function as cancer promoting or inhibiting agents, since P4 serves as the precursor for the major steroid hormones (androgens and estrogens). Tumor progression could be related to changes in local P4 levels [32]. Our results revealed that intratumoral P4 levels were decreased in male mice compared to those found in females. The decrease of intratumoral levels of P4 in males compared to females might be due to the low frequency of metastasis found in males, as it is proposed that P4 metabolites might play a role in the acquisition of metastatic potential [32].

Estrogens are known to be responsible for development and progression of breast cancer by stimulating cell proliferation [33]. E2 is the most potent estrogen whose effects are mediated by binding to the estrogen receptor (ER) [27, 34]. Likewise, it is known that androgens suppress cell proliferation in breast cancer cells [17]; however, their role in carcinogenesis on breast tissue is still unclear and there is some controversy on their effects on breast cancer [35]. Some studies revealed that androgens mediated cell growth via aromatization in epithelial breast cancer cells [36].

In situ production of steroids plays an important role on steroid signaling in hormone-dependent carcinomas. These tumors do not depend on circulating steroid levels but produce steroid hormones locally from circulating precursors [37]. Additionally, the local synthesis of steroids has been proposed in the canine mammary gland [38] and the ability of

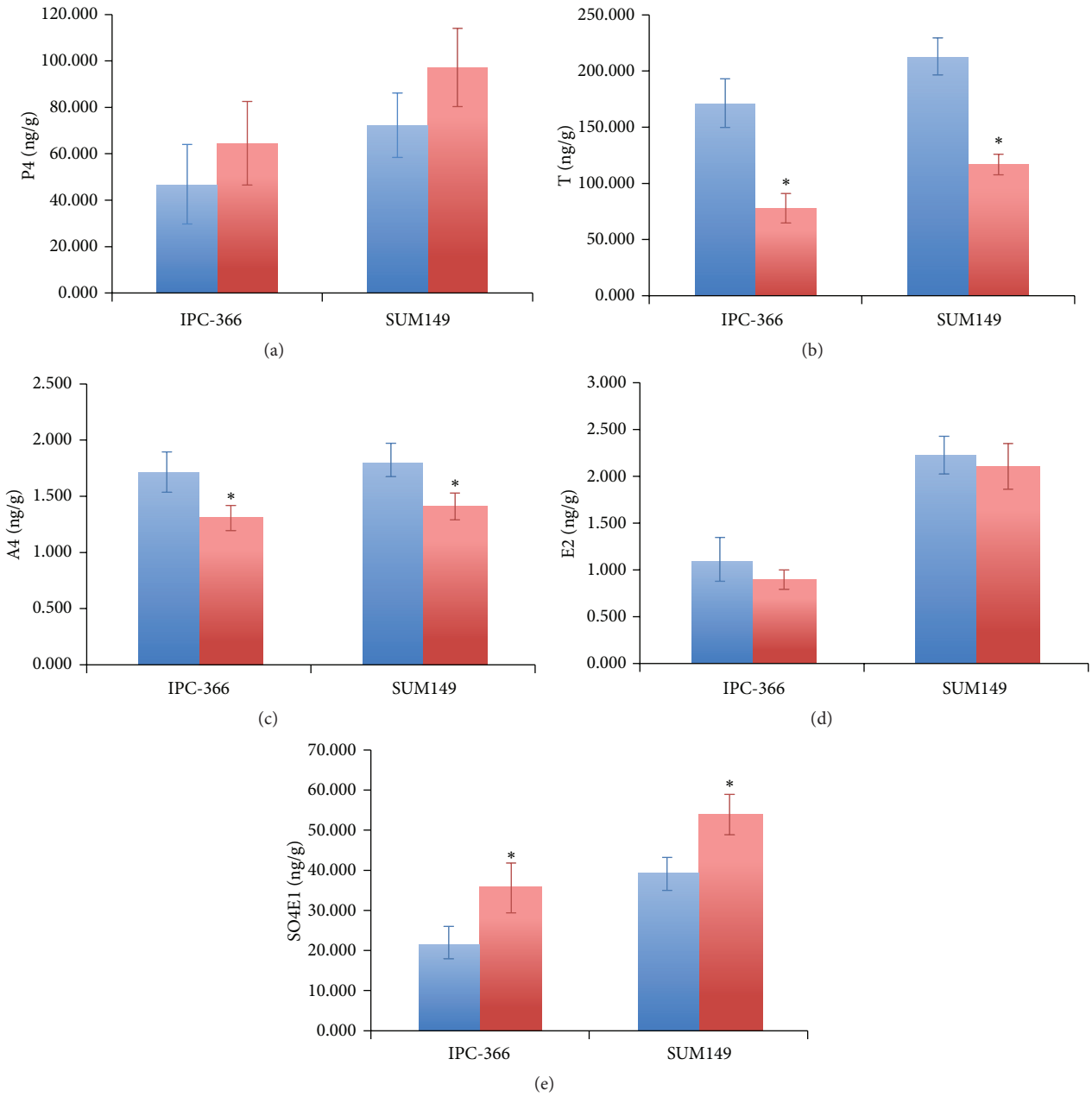


FIGURE 2: Hormonal levels of (a) P4, (b) T, (c) A4, (d) E2, and (e) SO4E1 of male and female IPC-366 and SUM149 tumors homogenates. Estrogens were higher in female tumors than in males instead of androgens that were higher in males tumors than females tumors. Bar represents means \pm SD. * $p < 0.05$ denoted significant differences between females and males.

canine and human breast cancer cell lines to produce steroid hormones in *in vitro* conditions [39].

Serum hormone levels were lower than those found in control group, suggesting that estrogens and androgens locally produced in tissues act without being released into the bloodstream [20]. These results provide evidence that tumoral tissue uptake plasma steroid from circulation and also produce the biosynthesis of them [31, 38]. Estrogens tissue levels will be the result of biosynthesis and degradation of the estrogenic enzymes. Apart from the enzyme activity, estrogen biosynthesis will also depend on the availability of

substrate. The breast does not have the precursor steroids such as androstenediol or testosterone, which directly convert to E2, DHEA, and A4, and can contribute to E2 biosynthesis via estrone [31].

In this study we found several differences in intratumoral estrogen and androgen levels between females and males. Males had higher levels of intratumoral androgens instead of females that presented higher levels of estrogens. Our study confirms the hypothesis of estrogen local production in IMC and IBC [38, 40, 41] because higher SO4E1 and E2 concentrations were found in tumor than in serum. As

androgens suppress cell proliferation, the high intratumoral androgen levels found in males could be associated with the low frequency of tumors in males inoculated with SUM149 and also the low metastases rates in both cell lines. Probably, intratumoral androgens exert an effect on the stromal cells by blocking the metastatic process in male mice. Planas-Silva and Waltz found that E2 promotes reversible epithelial-to-mesenchymal transition in ER α -positive cells [42] and these changes in the cells could lead to metastasis [27]. Thus, the high estrogen intratumoral levels found in female mice could also be implicated on the metastatic process and the malignancy of the cells. We have found that in females SO4E1 intratumoral levels were significantly higher than in males, and E2 levels were similar in both models. Probably, the amounts of SO4E1 found in females could act as a reservoir of estrogens [43]. In the case of males, to counteract high T intratumoral levels and promote tumor progression, tumor cells use SO4E1 reservoirs to produce biologically active estrogens (E2) and thus promote cell proliferation.

5. Conclusions

In this study we determined an IBC and IMC male mouse model useful for male and women inflammatory breast cancer. We also have found that hormonal tumor environment is crucial for tumor development and progression; high amounts of intratumoral androgens could be associated with a low risk of metastatic capacity.

Competing Interests

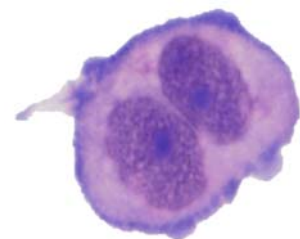
The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

References

- [1] K. W. Hance, W. F. Anderson, S. S. Devesa, H. A. Young, and P. H. Levine, "Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 97, no. 13, pp. 966–975, 2005.
- [2] H. Yamauchi, W. A. Woodward, V. Valero et al., "Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn," *Oncologist*, vol. 17, no. 7, pp. 891–899, 2012.
- [3] F. A. Tavassoli, "Inflammatory carcinoma. Infiltrating carcinomas: special types," in *Pathology of the Breast*, pp. 538–541, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 2nd edition, 1999.
- [4] L. Peña, M. D. Pérez-Alenza, A. Rodríguez-Bertos, and A. Nieto, "Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 78, no. 2, pp. 141–148, 2003.
- [5] M. D. Pérez-Alenza, E. Tabanera, and L. Peña, "Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999)," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 219, no. 8, pp. 1110–1114, 2001.
- [6] S. H. Giordano and G. N. Hortobagyi, "Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed," *Breast Cancer Research*, vol. 5, no. 6, pp. 284–288, 2003.
- [7] C. G. Kleer, K. L. van Golen, and S. D. Merajver, "Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants," *Breast Cancer Research*, vol. 2, no. 6, pp. 423–429, 2000.
- [8] I. Van der Auwera, S. J. Van Laere, G. G. Van den Eynden et al., "Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 23, pp. 7965–7971, 2004.
- [9] M. Clemente, M. D. Pérez-Alenza, and L. Peña, "Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours," *Journal of Comparative Pathology*, vol. 143, no. 2–3, pp. 157–163, 2010.
- [10] A. H. Klopp, L. Lacerda, A. Gupta et al., "Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-Cadherin in normal and malignant breast cells," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 8, Article ID e12180, 2010.
- [11] D. L. Holliday and V. Speirs, "Choosing the right cell line for breast cancer research," *Breast Cancer Research*, vol. 13, no. 4, article 215, 2011.
- [12] S. V. Fernandez, F. M. Robertson, J. Pei et al., "Inflammatory breast cancer (IBC): clues for targeted therapies," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 140, no. 1, pp. 23–33, 2013.
- [13] S. Caceres, L. Peña, P. J. DeAndres et al., "Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, Article ID e0122277, 2015.
- [14] C. Gómez-Raposo, F. Zambrana Tévar, M. Sereno Moyano, M. López Gómez, and E. Casado, "Male breast cancer," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 36, no. 6, pp. 451–457, 2010.
- [15] T. Yamamoto, K. Iriyama, and T. Araki, "Male inflammatory breast cancer," *Surgery Today*, vol. 27, no. 7, pp. 669–671, 1997.
- [16] A. Agrawal, A. A. Ayantunde, R. Rampaul, and J. F. R. Robertson, "Male breast cancer: a review of clinical management," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 103, no. 1, pp. 11–21, 2007.
- [17] T. Hanamura, T. Niwa, S. Nishikawa et al., "Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor-positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 139, no. 3, pp. 731–740, 2013.
- [18] K. M. McNamara, T. Yoda, K. Takagi, Y. Miki, T. Suzuki, and H. Sasano, "Androgen receptor in triple negative breast cancer," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 133, no. 1, pp. 66–76, 2013.
- [19] K. Takagi, Y. Miki, S. Nagasaki et al., "Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 17, no. 2, pp. 415–430, 2010.
- [20] T. Suzuki, Y. Miki, T. Moriya et al., "In situ production of sex steroids in human breast carcinoma," *Medical Molecular Morphology*, vol. 40, no. 3, pp. 121–127, 2007.
- [21] T. Suzuki, A. D. Darnel, J.-I. Akahira et al., "5 α -reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 86, no. 5, pp. 2250–2257, 2001.
- [22] M. Lelekakis, J. M. Moseley, T. J. Martin et al., "A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone," *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 17, no. 2, pp. 163–170, 1999.
- [23] A. Fantozzi and G. Christofori, "Mouse models of breast cancer metastasis," *Breast Cancer Research*, vol. 8, article 212, 2006.

- [24] B. A. Ruggeri, F. Camp, and S. Miknyoczki, "Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery," *Biochemical Pharmacology*, vol. 87, no. 1, pp. 150–161, 2014.
- [25] F. L. Queiroga, M. D. Pérez-Alenza, G. Silvan, L. Peña, C. Lopes, and J. C. Illera, "Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 94, no. 1–3, pp. 181–187, 2005.
- [26] M. De Jong and T. Maina, "Of mice and humans: are they the same?—implications in cancer translational research," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 51, no. 4, pp. 501–504, 2010.
- [27] S. S. Roy and R. K. Vadlamudi, "Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis," *International Journal of Breast Cancer*, vol. 2012, Article ID 654698, 8 pages, 2012.
- [28] E. R. Simpson and S. R. Davis, "Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives," *Endocrinology*, vol. 142, no. 11, pp. 4589–4594, 2001.
- [29] V. N. Kristensen and A. L. Børresen-Dale, "Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism," *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 462, no. 2–3, pp. 323–333, 2000.
- [30] R. Shibuya, T. Suzuki, Y. Miki et al., "Intratamoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 113–124, 2008.
- [31] M. A. Blankenstein, J. Van de Ven, I. Maitimu-Smeele et al., "Intratamoral levels of estrogens in breast cancer," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 69, no. 1–6, pp. 293–297, 1999.
- [32] J. P. Wiebe, "Progesterone metabolites in breast cancer," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 13, no. 3, pp. 717–738, 2006.
- [33] B. Xie, S. W. Tsao, and Y. C. Wong, "Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in female Noble rats: the role of androgens," *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 8, pp. 1597–1606, 1999.
- [34] G. S. Chetrite, J. Cortes-Prieto, J. C. Philippe, F. Wright, and J. R. Pasqualini, "Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 72, no. 1–2, pp. 23–27, 2000.
- [35] J. P. Garay and B. H. Park, "Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer," *American Journal of Cancer Research*, vol. 2, no. 4, pp. 434–445, 2012.
- [36] J. Jensen, J. W. Kitlen, P. Briand, F. Labrie, and A. E. Lykkesfeldt, "Effect of antiestrogens and aromatase inhibitor on basal growth of the human breast cancer cell line MCF-7 in serum-free medium," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 84, no. 4, pp. 469–478, 2003.
- [37] K. M. McNamara and H. Sasano, "The intracrinology of breast cancer," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 145, pp. 172–178, 2015.
- [38] L. Peña, G. Silván, M. D. Pérez-Alenza, A. Nieto, and J. C. Illera, "Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 84, no. 2–3, pp. 211–216, 2003.
- [39] J. C. Illera, S. Caceres, L. Peña et al., "Steroid hormone secretion in inflammatory breast cancer cell lines," *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, vol. 24, no. 3, pp. 137–145, 2015.
- [40] J. C. Illera, M. D. Pérez-Alenza, A. Nieto et al., "Steroids and receptors in canine mammary cancer," *Steroids*, vol. 71, no. 7, pp. 541–548, 2006.
- [41] A. R. Sánchez-Archidona, M. A. Jiménez, D. Pérez-Alenza et al., "Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 104, no. 3–5, pp. 93–99, 2007.
- [42] M. D. Planas-Silva and P. K. Waltz, "Estrogen promotes reversible epithelial-to-mesenchymal-like transition and collective motility in MCF-7 breast cancer cells," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 104, no. 1–2, pp. 11–21, 2007.
- [43] S. F. Wong, K. Reimann, and L. C. Lai, "Effect of transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II on cell growth and oestrogen metabolism in human breast cancer cell lines," *Pathology*, vol. 33, no. 4, pp. 454–459, 2001.

CAPÍTULO IV:
Secreción de hormonas esteroideas
en líneas celulares de IMC e IBC:
nuevo método de detección
mediante un EIA amplificado



1. Resumen

El IBC y el IMC son dos tipos de cáncer de mama con tasas de supervivencia muy bajas. Se ha descrito que estos tumores son capaces de sintetizar hormonas esteroides de forma local. Sin embargo, todavía no se ha documentado si las líneas celulares de IBC y de IMC son capaces de realizar, en condiciones *in vitro*, dicha producción de hormonas, ya que son líneas celulares triple negativo y no expresan receptores de esteroides.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio son en primer lugar validar una técnica de EIA amplificado con alta sensibilidad, fiable y precisa para la detección de las hormonas P4, A4, E1SO4, E2 y T en medios de cultivo celular. Por otra parte, evaluar el perfil de producción de hormonas esteroides de ambas líneas celulares.

La validación de la técnica se realiza en base a los resultados obtenidos de exactitud, precisión, sensibilidad y paralelismo. El límite de detección de la técnica para cada una de las hormonas esteroides estudiadas es: P4 = 13,2 pg / pocillo, A4 = 2,3 pg / pocillo, T = 11,4 pg / pocillo, E2 = 1,9 pg / pocillo y SO4E1 = 4,5 pg / pocillo. Los coeficientes intra e inter-ensayo son menores del 10%; y la tasa de recuperación media de la hormona, añadida al medio de cultivo, es mayor del 90%. Los perfiles hormonales de las líneas celulares revelan que, en todas las hormonas estudiadas, SUM149 presenta niveles más altos que IPC-366 (1,4 veces mayor, pero no estadísticamente significativo). Los índices de correlación entre las concentraciones de cada hormona de SUM149 y de IPC-366 son mayores del 97%. Por lo tanto, podemos concluir señalando que, las células de ambas líneas celulares, IPC-366 y SUM149, son capaces de producir

hormonas esteroides cuando se cultivan *in vitro* y que, la técnica de EIA de amplificación validada es una herramienta muy valiosa para la detección de la producción de esteroides en medios de cultivo.

2. Diseño experimental

Al haberse estudiado que los tumores de IMC e IBC son capaces de producir hormonas esteroides de forma local, también se quiere observar, si las células en condiciones *in vitro* son capaces de producir hormonas esteroides. Para ello, se estandariza una técnica de EIA amplificado no competitivo para la cual se realiza:

- ✚ Validación de la técnica de EIA, para cada una de las hormonas mencionadas, mediante la obtención de parámetros de límites de detección de la técnica, precisión, sensibilidad y paralelismo.
- ✚ Detección de hormonas esteroides (P4, A4, E1SO4, E2 y T) en medios de cultivo de las líneas celulares IPC-366 y SUM149.
- ✚ Determinación de un perfil hormonal para cada línea celular, con los resultados obtenidos de las concentraciones de estas hormonas.
- ✚ Comparación de la producción de hormonas esteroides en ambas líneas celulares, para establecer la similitud entre la línea canina y la human

Juan Carlos Illera*, Sara Caceres, Laura Peña, Paloma J. de Andres, Beatriz Monsalve, Maria J. Illera, Wendy A. Woodward, James M. Reuben and Gema Silvan

Steroid hormone secretion in inflammatory breast cancer cell lines

DOI 10.1515/hmbci-2015-0024

Received June 10, 2015; accepted September 4, 2015

Abstract: Inflammatory breast carcinoma (IBC) is a special type of breast cancer with a poor survival rate. Though several IBC cell lines have been established, recently a first IMC cell line was established. The aims of this study were: (1) to validate a highly sensitive, reliable, accurate and direct amplified enzyme immunoassay (EIA) to measure several cell-secreted steroid hormones: progesterone (P4), androstenedione (A4), testosterone (T), 17 β -estradiol (E2) and estrone sulfate (SO4E1) in the culture medium. (2) To assess whether hormone production profile by IPC-366 cells validates the IMC model for human IBC. We validated a non-competitive amplified EIA for inflammatory breast cancer cell lines based on the results of accuracy, precision, sensitivity and parallelism. The low detection limits of the technique were: P4=13.2 pg/well, A4=2.3 pg/well, T=11.4 pg/well, E2=1.9 pg/well and SO4E1=4.5 pg/well. Intra- and inter-assay coefficient of variation percentages were <10%. The mean recovery rate of hormone added to the culture medium was >90%. In all hormones studied SUM149 have higher levels (1.4 times, but not significant) than IPC-366, and the correlation index between SUM149 and IPC-366 concentrations were >97%. We can conclude

that cells of both cell lines, IPC-366 and SUM149, are capable to produce steroid hormone in culture media. The presented EIA methodology is very valuable for the detection of steroid production in culture media and could be used in hormone regulation studies and therapeutic agents in cell lines of inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma or other cancer cell lines in preclinical studies.

Keywords: androgens; EIA; estrogens; IBC; IMC; progestogens; steroids hormones.

Introduction

Inflammatory breast carcinoma (IBC) is a special type of breast cancer with a poor survival rate [1–3], and accounts for 6% of diagnosed breast cancers. Given that nodules are often absent and that chemotherapy is usually rapidly started before surgery, it is difficult to obtain untreated IBC specimens for research purposes and the use of alternative models is needed. Spontaneous canine inflammatory mammary cancer (IMC) has been proposed as a good model for the study of the human disease [4]. Though several IBC cell lines have been established [5], only recently, a first IMC cell line was established [6].

The clinical presentation of IBC or IMC resembles that of an inflammatory process such as dermatitis or mastitis [7]. The only distinctive feature for a histological diagnosis is massive invasion of superficial dermal lymphatic vessels by neoplastic cells [4, 8].

Overall normal and neoplastic mammary glands are considered as endocrine tissue due to the local biosynthesis of steroid hormones [4, 9]. Two principal pathways are implicated in the last steps of 17 β -estradiol formation in breast cancer tissues: the aromatase pathway [10, 11], mediated by the enzyme CYP19-aromatase (Arom) which transforms androgens into estrogens, and the sulfatase pathway which converts estrone into estrone sulfate by the enzyme sulfotransferase [12–14], and/or the sulfatase pathway converts estrone sulfate to estrone and estradiol sulfate to estradiol [12–14]. Nevertheless the local

*Corresponding author: Juan Carlos Illera, DVM, PhD, ECAR diplomat, MLAS, Dpto. Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain, Phone: +913943867, E-mail: jcillera@ucm.es; and Department of Animal Physiology, Surgery and Pathology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), Spain

Sara Caceres, Beatriz Monsalve, Maria J. Illera and Gema Silvan: Department of Animal Physiology, Surgery and Pathology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), Spain

Laura Peña and Paloma J. de Andres: Department of Animal Medicine, Surgery and Pathology, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), Spain

Wendy A. Woodward: Department of Radiation Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

James M. Reuben: Department of Hematopathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

secretion of steroid hormones by tumor cells is poorly documented.

The significant role played by the sulfotransferase pathway in human breast cancers has long been suggested by several authors, who demonstrated estrone sulfate concentrations to be higher in cancerous than in non-cancerous breast tissue [15, 16].

Further studies have shown that oestrogens that are locally produced in human breast cancer tissue may contribute to tumour progression [9] leading to metastasis, to the extent that sulfotransferase mRNA expression correlates well with disease-free survival and is an independent prognostic factor for human breast cancer.

It is not known if IBC and IMC cell lines are capable of steroid hormone production since these cells do not express steroid receptors. Thus, to increase current knowledge on this particular type of breast cancer we propose using IBC and IMC cell lines (SUM 149 and IPC-366), to address the following aims of this study: (1) to validate a highly sensitive, reliable, accurate and direct amplified enzyme immunoassay (EIA) to measure several cell-secreted steroid hormones [progesterone (P4), androstenedione (A4), testosterone (T), 17 β -estradiol (E2) and estrone sulfate (SO4E1)] in the culture medium of these cell lines to be enlightened about the possible role of steroids in the growth of IBC and IMC cancer cells that do not express hormonal receptors (ER and PR); (2) to compare the hormone production profile between IPC-366 and the human cell line SUM149.

Materials and methods

Reagents

Horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7, RZ=3, type VI) was obtained from Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). Sephadex G-25 was purchased from Pharmacia Fine Chemicals (Barcelona, Spain). Bovine serum albumin (BSA, Cohn Fraction V) source was purchased from Sigma (San Louis, MO, USA), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB) was purchased from Pierce Europe B.V. (Oud Beijerland, The Netherlands). All steroids were purchased from Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA). The rest of the solvents and reagents were analytical grade and were purchased from Merck (Madrid, Spain) and Panreac (Barcelona, Spain). The microplate reader was obtained BioTeck Instruments Inc. (Winooski, VT, USA).

Selection of the microtiter plate for the assay

Three different brands of microtiter plates were evaluated to determine low, medium and high binding. After several assessments, the high binding plates from Biohit (Finland) were selected.

Cell Lines culture

IPC-366 was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F12) containing 10% FBS (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), 1% penicillin-streptomycin solution, 1% amphotericin B and 1% L-glutamine (Sigma Aldrich, Madrid, Spain).

SUM149 was obtained from Asterand, plc (Detroit, MI, USA) and maintained in Ham's F-12 media supplemented with 10% FBS (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), 1 μ g/mL hydrocortisone, 5 μ g/mL insulin and 1% penicillin-streptomycin solution and 1% amphotericin B (Sigma Aldrich, Madrid, Spain).

The cells were cultured in 25-cm² culture flasks and were maintained in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide at 37 °C. The cell cultures were observed daily by a phase-contrast microscopy to check cell viability and growth.

Polyclonal antiserum and enzyme conjugate

Polyclonal antisera raised in male rabbits against: 11 α -hydroxyprogesterone 11 α hemisuccinate: BSA for P4, androstenedione 3-carboxymethylxime: BSA for A4, testosterone 3-carboxymethylxime: BSA for T, 6-keto-17 β -estradiol 6-carboxymethylxime: BSA for E2, and estrone-3-glucuronide: BSA for SO4E1 were used for the assay development [17]. P4, A4, T, E2 and SO4E1 were labelled with horseradish peroxidase (HRP) by the mixed anhydride method [18]. Following elution of the conjugate by Sephadex G-25 chromatography in a 0.05 M phosphate buffer pH 7.5, the P4, A4, T, E2 and SO4E1 enzyme conjugate was stored freeze-dried until assay. Assessments of the antibodies and conjugates were done using the reported methods: titration of antibody, calculation of cross-reactivity with related compounds, calculation of steroid: HRP ratio, recovery of enzyme activity after conjugation, and titration of antibody and conjugate in EIA to determine the working solution [17].

Enzyme immunoassay procedure

The non-competitive amplified EIA for P4, A4, T, E2 and SO4E1 was developed as previously reported by Illera et al. [17] for the measurement of A4 in culture maturation medium of rabbit oocytes and by Jones and Madej [19] for the measurement of estradiol.

Each well of 96-well flat bottom high binding polystyrene microtiter plates (Biohit, Finland) were coated with 100 μ L of purified antibodies solution (P4: 1/6000, A4: 1/2000, T: 1/8000, E2: 1/4000 and SO4E1: 1/4000), in coating buffer (sodium carbonate, 50 mmol/L; pH 9.6) except for the first well which acted as plate/assay blank, and the microtiter plate was incubated overnight at 4 °C. Afterwards, non-bound antibodies were removed from the wells by washing the microtiter plate five times with wash solution (NaCl, 150 mol/L, Tween 20, 0.5 mL/L), before the microtiter plate was inverted and air dried.

Standards were solubilized in ethanol, evaporating the solvent and resolubilizing them in assay buffer (sodium phosphate, 100 mmol/L; pH 7.0; with sodium chloride, 8.7 g/L; BSA, 1 g/L). Standard curve covered a range between 0 and 1 ng/well, and was constructed by using six standard solutions: 0.1; 1; 10; 100; 1000 and 10,000 pg/well.

The wells of the first and last rows were called B₀ (maximum binding of enzyme conjugate to the antibody), and 100 μ L of assay

buffer were added to the wells. Standards and culture media samples were analyzed in triplicates. For standard curve, 50 μL of assay buffer followed by 50 μL of each standard were pipetted into the wells from rows 2 and 6. For culture media samples, 40 μL of assay buffer followed by 60 μL of the sample were pipetted into the wells of rows 7–11. Plates were covered and incubated overnight at 4 °C.

A cold (4 °C) working solution of the HRP conjugates: P4: 1/80,000; A4: 1/40,000; T: 1/40,000; E2: 1/40,000, and SO4E1: 1/40,000, 50 μL /well, was added to the entire plate before being incubated for 2 h at 4 °C. Bound/free separation was achieved by emptying plates by inversion and washing them, five times with wash solution. To evaluate the amount of labelled P4, A4, T, E2 and SO4E1 bound to the antibody, 100 μL of substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, pH 5.0) were added to all wells and the microtiter plate incubated for an additional 15 min at room temperature before this reaction was stopped by the addition of 100 μL of 10% H_2SO_4 . Absorbance was read at 450 nm in an automatic microplate reader (BioTeck Instruments Inc.). P4, A4, T, E2 and SO4E1 concentrations were calculated by means of software developed for this technique (ELISA AID, Eurogenetics, Belgium). Standard dose-response curve was constructed by plotting the binding percentage ($(B/B_0) \times 100$) against P4, A4, T, E2 and SO4E1 standard concentrations added. P4, A4, T, and SO4E1 concentrations were expressed in nanograms per milliliter and E2 was expressed in pg/mL.

Hormone determinations in cell lines: SUM149 and IPC-366

To assess whether differences in hormone secretion was related to the number of seeded cells, the study was repeated with different plates with different cell number: 10^3 ; 10^4 ; 10^5 , and 10^6 cultures cells of each cell line. The number of experiments carried out was five times for each line.

Statistics

The accuracy (recovery rates), precision and sensitivity (low detection limit), intra- and inter-assay coefficients of variation (CV%) were calculated by Rodbard's [20] and Abraham [21] methods. All values were expressed as mean \pm standard error (S.E). For parallelism, we used the ANCOVA analysis from statistical analysis system (SAS/STAT, UCM, Spain) [22]. Only values of $p < 0.05$ were considered significant. For comparison between IPC-366 and SUM1489 hormone concentrations we used a linear regression analysis with SigmaPlot (UCM, Spain).

Results

Polyclonal antibodies and conjugates assessment

Antisera against P4 (C914), A4 (C9111), T (C917), E2 (C902) and SO4E1 (C6E199) reached the required titer for

purification after 5 months of immunization. Specificity of antibodies, expressed as the percentage of cross-reactivity against related steroids are shown in Table 1.

The assessment of the conjugate showed the following results: 0.9:1 (P4), 1.3:1 (A4), 1.1:1 (T), 1.2:1 (E2) and 1.2:1 (SO4E1) moles. The recovery of the enzyme activity after conjugation was more than 85% in all cases.

Enzyme immunoassay validation

The validation of the non-competitive amplified EIA for inflammatory breast cancer cell lines was based on the results of accuracy, precision, sensitivity and parallelism.

The accuracy of the EIA was tested by determining the recovery rates of known amounts of P4, A4, T, E2 and SO4E1 spiked into culture media from both IPC-366 and SUM149 cell lines. Table 2 shows the ranges of recovery rates for IPC-366 averaged follows: 90.7 ± 3.1 to 99.6 ± 2.0 , and for SUM149 ranged from: 92.1 ± 2.2 to 98.3 ± 0.9 .

Precision of the non-competitive amplified P4, A4, T, E2 and SO4E1 EIA was determined by calculating the intra- and inter-assay coefficients of variation (CV%). The intra-assay CV (%) was calculated by replicate measurements of three standard concentrations (1, 10 and 100 pg/well) of P4, A4, T, E2 and SO4E1 spiked into culture medium. Each sample was tested in triplicate, 10 times within an assay. Inter-assay CV (%) was calculated by the replicate measurements of the above-mentioned samples in 10 consecutive assays. Both intra- and inter-assay CV (%) are summarized in Table 3.

The sensitivity of the amplified EIA was tested by means of low detection limit, as defined by Abraham [21] and calculated from B_0 to 2SD in 10 consecutive assays, and it was: P4=13.21 pg/well, A4=2.32 pg/well, T=11.43 pg/well, E2=1.99 pg/well and SO4E1=4.54 pg/well.

In order to determine the effects of culture media on standard curve, the standard curves in culture medium samples were run in parallel with the standard dose-response curve. There was a good degree of parallelism between both standard curves for the hormones studied: P4, A4, T, E2 and SO4E1 (Table 4).

Hormone concentrations (P4, A4, T, E2 and SO4E1) in culture media of SUM149 and IPC-366 cells.

Analyses of the steroid hormone concentrations in SUM149 and IPC-366 cancer cell lines are summarized in Figure 1. We found a variability in the hormone concentrations in both cells lines. In all hormones studied SUM149 had higher levels than IPC-366 but there were no statistical significance ($p > 0.05$). No differences between the concentration of A4 and the number of cultured cells in both cell

Table 1: Percentage of cross-reactivity of polyclonal antibodies against related steroids.

Steroid compound	P4	E2	T	A4	SO4E1
Testosterone	0.48	0.10	100.00	3.16	
Testosterone 3-carboxymethyloxime			100.00		
Androstenedione 3-carboxymethyloxime: BSA				3.98	
5 α -Dihydrotestosterone			20.00	1.28	
5 β -Dihydrotestosterone			5.00	0.01	
Androstenedione			6.12	100.00	
Androstenediol			3.50	4.45	
Androstenolone			3.21		
Epitestosterone			0.10		
Estrone	0.01	0.50	0.01	0.01	100.00
Estriol	0.01	0.06	0.01	0.01	0.20
17 β -estradiol	0.01	100.00	0.01	0.01	11.70
Progesterone	100.00	0.01	3.74	0.01	0.20
Cortisol	0.01	0.01	0.05	0.01	0.20
Androstenedione 3-carboxymethyloxime: BSA				3.98	
5 α -hydroxyandrosterone				0.06	
11-deoxycortisol			0.01	0.01	
6 β -hydroxyandrostenedione				1.87	
11 β -hydroxyandrostenedione				0.54	
Dihydroepiandrosterone				1.63	
6 keto 17 β -estradiol carboxymethyloxime		130.00			
16 keto 17 β -estradiol		16.70			
6 keto 17 β -estradiol		20.00			
2 hydroxyestradiol		8.74			
6 hydroxyestradiol		9.30			
17 β -estradiol benzoate		3.28			
17 α -estradiol		0.05			
Progesterone					
11 α hydroxyprogesterone hemisuccinate	110.00				
11 α hydroxyprogesterone	14.03				
17 α hydroxyprogesterone	0.01				
20 α hydroxyprogesterone	0.01				
20 β hydroxyprogesterone	0.01				
Pregnenolone	21.73				
Estrone-3-sulfate					100.00
Estrone-3-glucuronide					200.00
Estradiol-3-glucuronide					5.70
Estradiol-3-sulfate					5.00
Estradiol-17-sulfate					0.20
Pregnanediol					0.20

lines were found. The correlation index between SUM149 and IPC-366 concentrations were: P4 ($R=0.98$, $p<0.05$), A4 ($R=0.99$, $p<0.05$), T ($R=0.98$, $p<0.05$), E2 ($R=0.99$, $p<0.05$) and SO4E1 ($R=0.97$, $p<0.05$) (Figure 1A–E).

Discussion

In the present study, a simple, precise, reliable, highly specific method for the detection of steroid hormones in mammary neoplastic cell culture media is validated and demonstrates that the secretion of steroid hormones in

cell culture media correlated with the number of plated neoplastic cells. The cell lines used were SUM149 and IPC-366. Interestingly, the two inflammatory breast/mammary cancer cell lines were ER and PR negative. The validation of methods, for the measurement of steroid hormones in culture media of cancer cell lines is decisive for knowledge of the mechanism involved in hormone dependent mammary tumors. EIA methods have demonstrated that they are specific, precise for this purpose [23], and this led us to validate a direct, simple and precise non-competitive amplified individual EIA for P4, A4, T, E2 and SO4E1. The conditions under which EIA has been carried out

Table 2: Steroid hormone concentrations (pg/mL) and recovery rate (%) after addition of P4, A4, T, E2 and SO4E1, to different pools of culture media from IPC-366 and SUM149 cancer cell lines.

Hormone added, pg	Cell line	Progesterone, pg/mL	Androstenedione, pg/mL	Testosterone, pg/mL	17 β -estradiol, pg/mL	Estrone-sulfate, pg/mL
0	IPC-366	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SUM149	360.00	5600	250.00	840.00	230.00
100	IPC-366	198.97 (90.44)	4186 (97.34)	89.08 (89.08)	1037.04 (101.67)	86.79 (86.79)
	SUM149	456.60 (99.26)	5489 (96.29)	94.76 (94.76)	837.32 (89.07)	90.86 (90.86)
1000	IPC-366	1040.82 (104.08)	998.34 (99.83)	1098.51 (87.88)	1874.76 (97.64)	933.76 (93.37)
	SUM149	1324.31 (97.37)	6338 (96.03)	1196.61 (95.72)	1802.11 (97.94)	1189.80 (96.73)
Average	IPC-366	94.29 \pm 3.85	97.15 \pm 2.67	93.32 \pm 4.24	90.75 \pm 3.92	90.08 \pm 3.29
	SUM149	98.71 \pm 5.37	92.19 \pm 2.23	96.14 \pm 0.42	95.69 \pm 3.24	93.00 \pm 2.14

Table 3: Intra- and inter-assay CV (%) for progesterone, androstenedione, testosterone, 17 β -estradiol and estrone sulfate in culture media of IPC-366 and SUM149 cell lines.

	Intra-assay, %	Inter-assay, %
Progesterone	3.2 \pm 0.98	5.3 \pm 0.89
Androstenedione	4.8 \pm 1.02	7.4 \pm 1.23
Testosterone	2.9 \pm 0.84	6.5 \pm 1.36
17 β -estradiol	6.7 \pm 1.32	9.1 \pm 2.14
Estrone-sulfate	8.2 \pm 1.46	9.3 \pm 2.28

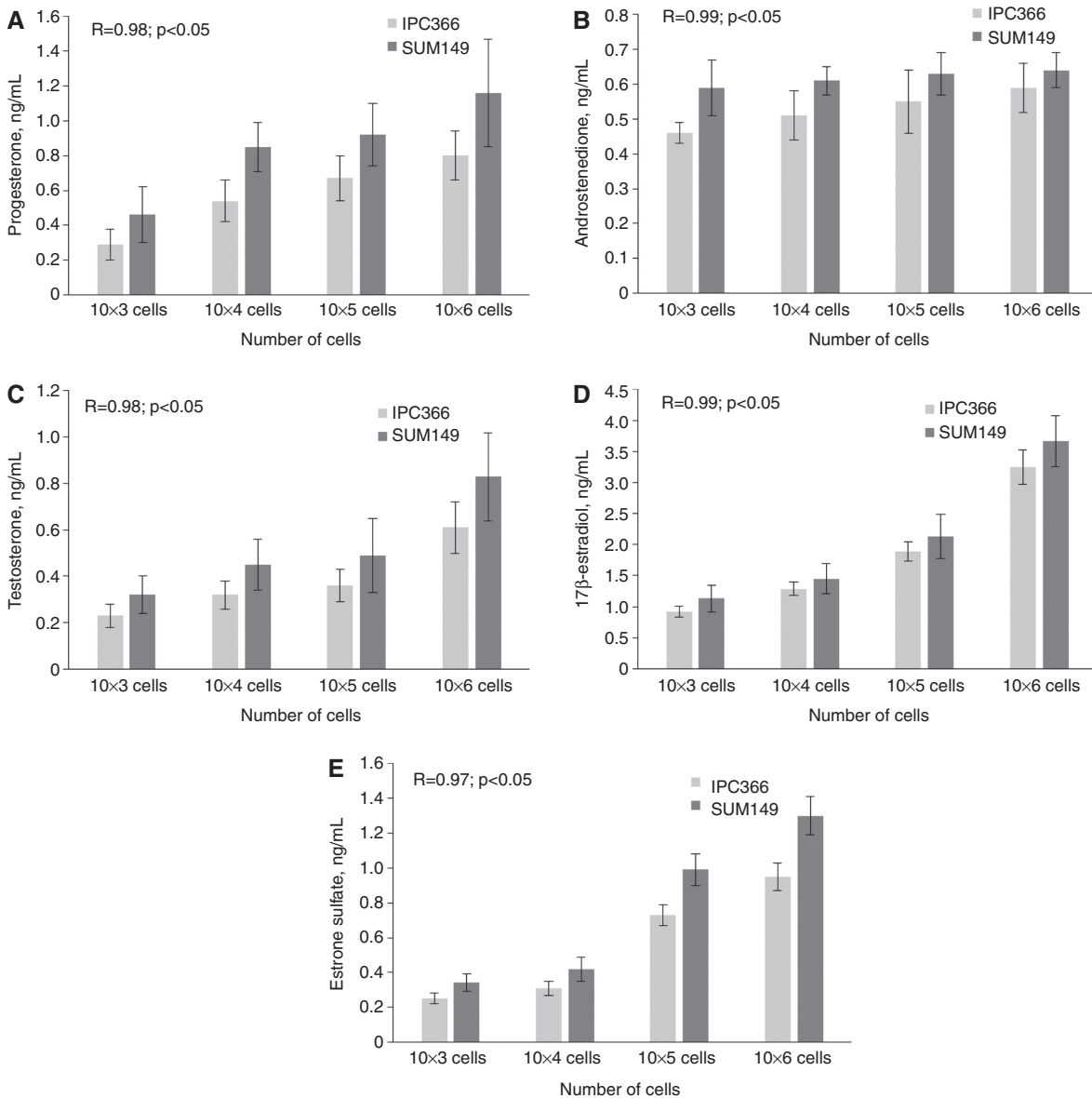
are based on the perfect statement of the working solutions both antibody and conjugate, and are in agreement with those previously reported [17, 24, 25]. The precision of our direct (without previous extraction of the sample) system is also elevated, and may be due to the amplification step (24 h sample incubation with the solid-phase antibody) and temperature (4 °C in all steps except for the substrate). This simplifies largely the method and reduces possible errors due to the extraction procedure. Parallelism test confirmed the excellent discrimination of steroid hormones (P4, A4, T, E2 and SO4E1) in culture media, showing no interferences of the culture media components in the assay. In this sense, both the intra- and inter-assay CV (%) are within acceptable limits.

Normal and neoplastic mammary glands are considered by some authors to be an endocrine tissue, particularly by virtue of their estrogen and androgen synthesis [26–31]. The action of estrogens and androgens (locally produced or not) is crucial in the neoplastic growth and progression of breast cancer, because of their interaction with specific receptors [26]. Indeed, progesterone has been associated with proliferation changes in normal breast tissue but its role in breast cancer is still unclear [32]. Nevertheless, to our knowledge, there are no studies that refer steroid levels in culture media of inflammatory or non-inflammatory breast cancer cell lines. There are several studies concerning serum concentrations of endogenous or exogenous sex hormones and the risk of breast cancer in general [4, 33–35], and a few publications related of serum levels of steroids in women with benign or malignant mammary tumors [27, 35–37]. In a previous study of our group, a possible local synthesis of some steroid hormones in normal and neoplastic canine mammary glands was speculated due to high concentrations of these hormones in tumor homogenates [4].

In general, estrogens increase cancer cell proliferation, and the use of anti-estrogen therapies on estrogen receptor-positive breast cancers has been successful. Estrone sulfate concentrations could represent an important reservoir for biologically active estrogens in mammary

Table 4: Line formula of standard dose-response curve diluted either in culture media or EIA buffer are parallel to serial dilutions of culture media simple.

		Curve formula	p-Value	R ²
Progesterone, ng/mL	Standard	$Y=1.75-0.00011X$	0.87	0.86
	Culture medium	$Y=1.78-0.00010X$		
Androstenedione, ng/mL	Standard	$Y=1.75-0.00010X$	0.84	0.84
	Culture medium	$Y=1.74-0.00012X$		
Testosterone, ng/mL	Standard	$Y=1.78-0.00010X$	0.92	0.91
	Culture medium	$Y=1.75-0.00010X$		
17 β -estradiol, pg/mL	Standard	$Y=1.75-0.00011X$	0.81	0.89
	Culture medium	$Y=1.76-0.00010X$		
Estrone sulfate, ng/mL	Standard	$Y=1.75-0.00012X$	0.90	0.83
	Culture medium	$Y=1.73-0.00012X$		

**Figure 1:** Comparison between IPC-366 and SUM149 in steroid hormone concentrations and its linear regression at 24 h of cell culture. (A) Progesterone, (B) androstenedione, (C) testosterone, (D) 17 β -estradiol, and (E) estrone sulfate. Bar represents mean \pm SE. No statistical differences between hormone concentrations in the two cell lines.

tumors [14, 16, 36, 38, 39]. In human breast cancer, some authors have detected large amounts of serum estrone and estrone sulfate, although the results have been contradictory [14, 36]. On the other hand, estradiol can influence mitogenicity of ER-positive mammary cells regulating the estrogen levels and therefore, the progression of mammary neoplasia [40].

Normal and neoplastic human breast tissues also contain and produce several forms of androgens [26, 27, 34]. However, the information concerning intra-tissue and serum levels of androgens in women with breast cancer is scarce. In one study, no significant increases were indicated in malignant breast cancer cases versus cases of benign lesions, although a highly significant decrease of serum T was found [36]. According to some studies, primary human breast cancers express androgen receptors, but there is no association with androgen levels and breast cancer growth [41]. It is suggested that 5α -reductases catalyze the conversion of testosterone to the bioactive and potent androgen, 5α -dihydrotestosterone (DHT), and an increase of DHT inhibited the basal and estrogen-induced cell proliferation in human breast cancer cell lines [42]. In canine mammary cancer, a high proportion of the androgens found in tumor homogenates could be attributed to a local synthesis [42].

It has been suggested that P4 is a precursor for active steroid hormones (estrogens and androgens) in breast tissue: P4 levels are associated with mitogenic, apoptotic and metastatic activities [32]. Some authors reported that P4 has effects on breast cancer while others indicated that there is no direct effect in human [43] or canine [44] tumors. According to other authors, changes in P4 levels are linked to tumor progression [32]. As we reported in these study, there are several changes in P4 levels that could lead to changes in cell growth in vitro. Several studies performed in MCF7 human breast cancer cell line, revealed that dutasteride (5α -reductase inhibitor) treatment increase progesterone conversion to anti-cancer four-pregnanes resulting in inhibition of cell proliferation and detachment [45].

The results obtained to quantify steroid hormones in the culture media indicated that all the hormones studied are measurable in the culture medium, and that the increase in the concentration of steroid hormones increases are dependant on the number of cultured cells (10^3 – 10^6). Among all of the studied hormones the major production is A4, an androgen precursor of T through the enzyme 17β -hydroxysteroid steroid dehydrogenase (17β -HSD), and estradiol, secreted through the enzyme CYP19-aromatase. These data confirm previous findings of our group in canine inflammatory mammary cancer homogenates [4] and in homogenates of SCID mice tumors IMC xenotransplanted [39] which described an increase of estrogens and other

steroid hormones possibly due to tumor cell secretion. To the best of our knowledge, the increased secretion of steroid hormones in human IBC has never been investigated previously. In this study, the steroid hormone secretion of SUM 149 is reported for the first time. Although a higher concentration of hormones was found in the human IBC cell line secretion, the results obtained in both cell lines (human and canine inflammatory mammary cancer cell lines SUM-149 and IPC-366) in this study are similar: the hormone that is more secreted into the culture medium is A4, and secondly estradiol. The parallelism in both cell lines in steroid hormone production further supports the canine model as a valid animal model for the study of the human disease.

In summary, these results are the first describing steroid hormone concentrations in culture media from cell lines from female dogs and women, and demonstrate that the cancer cells are able to secrete these hormones that can be measured in the culture media. The review of the literature indicates that there is only one study regarding hormones in culture medium and this article refers to estradiol levels in ovarian cancer [46]. The estradiol levels of our study are very similar to those cited by these authors in ovarian cancer. This study offers a new, easy and precise methodology for the detection of hormones secreted into the culture medium by cancer cells that can be a very valuable tool for deeper knowledge of hormones interaction in breast cancer in both the dog and women.

It is very interesting to note that both IBC and IMC cell lines used in the present study are ER and PR negative, and therefore these cell lines are considered (according to “classical” definitions) hormone-independent cancer cell lines. Nevertheless, according to our results, the spectrum of hormone-dependent cancer could be applied to steroid cancer-producing tumors. The possible autocrine and paracrine action of steroid hormones on cancer cell growth might be mediated by other receptors (i.e. ER beta and AR) and this point deserves further investigation. Possibly, the demonstrated production of steroid hormones by ER and PR negative cells lines could indicate that an anti-hormone treatment could benefit patients with steroid-producing tumors, even when the neoplasms are ER and PR negative. Of course, this requires extensive further investigations.

For all the above-mentioned and from our results, we can conclude that cells of both cell lines, IPC-366 and SUM149, are capable to produce steroid hormones in culture media. The presented EIA methodology is very valuable for the detection of steroid production in culture media and could be used in hormone regulation studies and therapeutic agents in cell lines of inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma or other cancer cell lines in preclinical studies.

Acknowledgments: This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Education (research project No SAF 2009-10572).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

- Levine PH, Steinhorn SC, Ries LG, Aron JL. Inflammatory breast cancer. The experience of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program. *J Nat Cancer Inst* 1985;74:291–7.
- Somlo G, Doroshow JH, Forman SJ, Odom-Mayon T, Lee J, Chow W, Hamasaki V, Leong L, Morgan Jr R, Margolin K, Raschko J, Shibata S, Telef M, Yen Y, Simpson J, Molina A. High-dose chemotherapy and stem-cell rescue in the treatment of high-risk breast cancer: prognostic indicators of progression-free and overall survival. *J Clin Oncol* 1997;15:2882–93.
- Victor H, Horwitz EM, Kini VR, Martinez AA, Pettinga JE, Dmuchowski CF, Decker DA, Wilner FM, Vicini FA. Impact of clinical, pathologic, and treatment-related factors of patients with local advanced breast cancer treated with multimodality therapy. *Am J Clin Oncol* 1999;22:119–25.
- Peña L, Silván G, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Illera JC. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84:211–6.
- Van Golen KJ, Davies S, Wu ZF, Wang Y, Bucana CD, Root H, Chandrasekharappa S, Strawderman M, Ethier SP, Merajver SD. A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res* 1999;5:5832–8.
- Caceres S, Peña L, de Andres PJ, Illera MJ, Lopez MS, Woodward WA, Reuben JM, Illera JC. Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366. *Plos One* 2015;10:e0122277.
- Tavassoli FA. Inflammatory carcinoma. Infiltrating carcinoma: special types. *Pathology of the Breast*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1999:519–41.
- Giordano SH, Hortobagyi GN. Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. *Breast Cancer Res* 2003;5:284–8.
- Blankenstein MA, van de Ven J, Maitimu-Smeele I, Donker GH, de Jong PC, Daroszewski J, Szymczak J, Milewicz A, Thijssen JH. Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:293–7.
- Abul-Hajj YJ, Iverson R, Kiang DT. Aromatization of androgens by human breast cancer. *Steroids* 1979;33:205–22.
- Lipton A, Santner SJ, Santen RJ, Harvey HA, Feil PD, White-Hershey D, Bartholomew MJ, Antle CE. Aromatase activity in primary and metastatic human breast cancer. *Cancer* 1987;59:779–82.
- Dao TL, Hayes C, Libby CPR. Steroid sulfatase activities in human breast tumors. *Proc Soc Experim Biol Med* 1984;146:381–4.
- Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C. Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J Steroid Biochem* 1989;34:155–63.
- Secky L, Svoboda M, Klameth L, Bajna E, Hamilton G, Zeillinger R, Jäger W, Thalhammer T. The sulfatase pathway for estrogen formation: targets for the treatment and diagnosis of hormone-associated tumors. *J Drug Delivery* 2013. DOI: 10.1155/2013/957605.
- Edery M, Goussard J, Dehennin L, Scholler R, Reiffsteck J, Drosowsky MA. Endogenous estradiol-17 β concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and by radioimmunoassay: relationship to receptor content. *Eur J Cancer* 1981;17:115–20.
- Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalonde L, Talbi M, Maloche C. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1460–4.
- Illera JC, Lorenzo PL, Silván G, Munro CJ, Illera MJ, Illera M. Enzyme immunoassay for testosterone and androstenedione in culture maturation medium from rabbit oocytes matured in vitro. *Theriogenol* 1997;47:1375–88.
- Munro C, Stabenfeldt G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol* 1984;101:41–9.
- Jones I, Madej A. A sensitive microtitre plate enzyme immunoassay of oestradiol-17 β in the cow and mare. *J Immunoassay* 1988;9:349–65.
- Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem* 1974;20:1255–70.
- Abraham GE. Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J Steroid Biochem* 1975;6:261–70.
- SAS/STAT Guide for Personal Computers, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1987.
- Munro CJ, Lasley BL. Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. In: Albertson BD, Haseltine FP, editors. *Non-radiometric assays: technology and application in polypeptide and steroid hormone detection*. New York: Alan R. Liss Inc., 1988:289–329.
- Silvan G, Illera JC, Illera M. Determination of follicular fluid estradiol levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *Steroids* 1993;58:324–9.
- Carneiro GF, Liu IKM, Illera JC, Munro CJ. Enzyme immunoassay for the measurement of estrone sulphate in cryptorchidism, stallions, and donkeys. *AEEP Proceedings* 1998;44:3–4.
- Liao DJ, Dickson RB. Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:175–89.
- Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes C, Illera JC. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:181–7.
- Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Jiménez MA, Silvan G, Dunner S, Peña L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 2006;71:541–8.
- Sánchez-Archidona AR, Jiménez MA, Pérez-Alenza D, Silván G, Illera JC, Peña L, Dunner S. Steroid pathway and estrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;104:93–9.
- Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes CS, Illera JC. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;110:76–82.

31. Queiroga FL, Pérez-Alenza D, Silvan G, Peña L, Illera JC. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;115:9–13.
32. Wiebe JP. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Related Cancer* 2006;13:717–38.
33. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK. Hormones breast cancer collaborative group. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Nat Cancer Inst* 2003;95:1218–26.
34. Grace PB, Taylor JL, Low YL, Luben RN, Mulligan AA, Botting NP, Dowsett M, Welch AA, Khaw KT, Wareham NJ, Day NE, Bingham SA. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective investigation of cancer and nutrition-norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:698–708.
35. Sturgeon SR, Potischman N, Malone KE, Dorgan JF, Daling J, Schairer C, Brinton LA. Serum levels of sex hormones and breast cancer risk in premenopausal women: a case-control study (USA). *Cancer Cause Control* 2004;15:45–53.
36. Mady EA, Ramadan EE, Ossman AA. Sex steroid hormones in serum and tissue of benign and malignant breast tumors patients. *Dis Markers* 200;16:151–7.
37. Asseryanis E, Ruecklinger E, Hellan M, Kubista E, Singer CF. Breast cancer size in postmenopausal women is correlated with body mass index and androgen serum levels. *Gynecol Endocrinol* 2014;18:29–36.
38. Billich A, Nussbaumer P, Lehr P. Stimulation of MCF-7 breast cancer cell proliferation by estrone sulphate and dehydroepiandrosterone sulphate: inhibition by novel non-steroid sulfatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;73:225–35.
39. Camacho L, Peña L, González Gil A, Cáceres S, Díez L, Illera JC. Establishment and characterization of a canine xenograft model of inflammatory mammary carcinoma. *Res Vet Sci* 2013;95:1068–75.
40. Shymala G, Chou YC, Louie SG, Guzman RC, Smith GH, Nandi S. Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:137–48.
41. Bradlow HL, Sepkovic DW. Steroids as procarcinogenic agents. *Ann New York Acad Sci* 2004;1028:216–32.
42. Suzuki T, Darnel AD, Akahira JI, Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, Takeyama J, Moriya T, Sasano H. 5 α -reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgen actions. *J Clin Endocrin Metab* 2001;86:289–96.
43. Santen RJ, Manni H, Harvey H, Redmond C. Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr Rev* 1990;11:221–65.
44. Mol JA, van Garderen E, Rutterman GR, Rijnberk A. New sights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;57:67–71.
45. Wiebe JP, Souter L, Zhang G. Dutasteride affects progesterone metabolizing enzyme activity/expression in human breast cancer cell lines resulting in suppression of cell proliferation and detachment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;93:201–8.
46. Poels LG, Jap PH, Ramaekers FF, Scheres JM, Thomas CM, Vooijs CM, Croes HJ, Mungyter G. Characterization of a hormone-producing ovarian carcinoma cell line. *Gynecol Oncol* 1989;32:203–14.

VI. DISCUSIÓN

El IBC y el IMC son un subtipo de cáncer de mama muy agresivo que afecta a la mujer y la perra, respectivamente (Tavassoli, 1999; Pérez Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a). Se ha observado que el IMC comparte muchas características clínicas, biológicas y patológicas con el IBC, por lo tanto, se ha propuesto como un buen modelo animal para el estudio de la enfermedad humana (Peña *et al.*, 2003a).

En la presente Tesis Doctoral se han descrito cuatro trabajos de investigación relacionados todos ellos con el establecimiento y caracterización de la nueva línea celular de IMC denominada IPC-366, que a resultas de esta Tesis Doctoral ha sido patentada en España (P201400512) y se encuentra en trámite de ser patentada a nivel internacional (WO 2015/197884). En dichos estudios, además de establecer y caracterizar la línea celular a nivel de inmunoexpresión de marcadores específicos y morfología celular, también se ha analizado en términos de capacidad de generar tumores en ratones inmunodeprimidos, así como del ambiente hormonal en los tumores producidos. Por último, se ha desarrollado y validado una técnica EIA de amplificación con el fin de demostrar la secreción de hormonas esteroides por las células *in vitro* y cuantificar sus niveles. Todos estos trabajos se acompañan de la comparación de dicha línea celular con su homóloga humana la línea celular SUM149, con el fin de validar IPC-366 como un buen biomodelo, no solo para el estudio del IMC sino también para la investigación del IBC humano.

Hay pocos modelos disponibles para el estudio de la biología del IBC (Lacroix y Leclercq, 2004; Holliday y Speirs, 2011; Fernandez *et al.*, 2013). La mayoría de los trabajos se han llevado a cabo utilizando líneas celulares tales

como SUM190 (línea celular RE/RP negativo y HER-2 positivo) y SUM149 (línea celular triple negativa). En la actualidad, la necesidad de un mayor conocimiento sobre el IBC hace que se sigan desarrollando nuevas líneas celulares. Recientemente, se ha descrito y caracterizado una nueva línea celular FC-IBC02, línea triple negativa, derivada de una efusión pleural (Fernandez *et al.*, 2013). A diferencia de lo que sucede con el IBC, hasta IPC-366 no existían líneas celulares establecidas de IMC, lo que pone de manifiesto la importancia de la presente Tesis Doctoral.

En el capítulo 1 se demuestra que la línea celular IPC-366 reproduce las características histológicas del tumor primario canino. Se trata de una línea celular muy agresiva, altamente maligna que conserva el inmunofenotipo del IMC mamario canino original. Tanto en el tumor mamario canino primario como en la línea celular, se evidencian rasgos marcados de malignidad histológica como son una marcada anisocariosis y anisocitosis. Los resultados obtenidos con distintas técnicas inmunohistoquímicas demuestran que IPC-366 es positiva para pancitoqueratinas, citoqueratina14 y vimentina, y negativa para actina, p63, HER-2 y los receptores hormonales RE y RP, lo que significa que se trata de una línea de células epiteliales basales triple negativas.

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) representa aproximadamente entre el 10% y el 15% de los cánceres de mama y exhibe peor pronóstico que el cáncer hormonodependiente (Anders y Carey, 2009; Chavez *et al.*, 2010; Boyle, 2012). Alrededor del 20 al 40% de los casos de IBC son, además, TNBC (Masuda *et al.*, 2013). En general, el TNBC y el IBC comparten una gran agresividad, invasividad, aparición de metástasis temprana y la falta de estrategias terapéuticas eficaces (Anders y Carey, 2009). La investigación *in*

in vitro en IBC triple negativo se lleva a cabo, principalmente, en la línea de células de IBC triple negativa SUM149. Esta línea celular se ha usado para identificar los factores genéticos del IBC (Lacroix y Leclercq, 2004).

La línea celular IPC-366 se presenta como una línea de células epiteliales basales con características mesenquimatosas: inmunoexpresión positiva a pancitoqueratinas (AE1/AE3) (marcador general de células epiteliales), citoqueratina 14 (para las células epiteliales basales) y vimentina (marcador mesenquimatoso general). La co-expresión de citoqueratinas y vimentina se ha descrito en los tumores epiteliales mamarios con alta malignidad (Heatley *et al.*, 1993; Vora *et al.*, 2009). Además, la expresión de vimentina también se asocia con la malignidad de las células en cultivo (Heatley *et al.*, 1993).

Nuestros resultados indican que el perfil de inmunoexpresión de la línea celular IPC-366 se engloba en el subtipo basal con características de transición epitelio-mesenquimatoso (EMT) (Creighton *et al.*, 2010). El subtipo basal se caracteriza por una expresión negativa de RE, RP y HER-2 además de una expresión positiva a CK14 y vimentina (Anders y Carey, 2009). Como se ha descrito anteriormente, la EMT es un proceso que conduce a las células epiteliales tumorales a presentar características de células mesenquimatosas (Kong *et al.*, 2011). La adquisición del fenotipo mesenquimatoso está implicado en la pérdida de expresión de marcadores epiteliales, así como en el aumento de la motilidad celular y la invasión tumoral (Mani *et al.*, 2008). La línea celular de IBC SUM149 también es una línea celular triple negativa y de subtipo basal (Holliday y Speirs, 2011). La línea celular de IMC canino IPC-366 comparte características fenotípicas con la línea celular humana. Este hecho, permitirá, en un futuro, el desarrollo de estudios pre-clínicos comparativos.

La inmunoexpresión negativa a los marcadores de células mioepiteliales p63 y actina indica que IPC-366 no es una línea celular de origen mioepitelial. En comparación con los tumores mamarios humanos, los tumores mamarios caninos presentan frecuentemente células mioepiteliales que dan lugar a tumores complejos y mixtos (Goldschmidt *et al.*, 2011), por lo que es importante demostrar el origen epitelial (y no mioepitelial) de IPC-366. La ausencia de células mioepiteliales en IPC-366 facilitará también los estudios comparativos con su homóloga humana.

Por otra parte, hemos observado que IPC-366 sobreexpresa COX-2 en el 90% de las células. Dicha sobreexpresión se ha relacionado recientemente con la EMT y con la invasividad en líneas celulares de cáncer de mama (Bocca *et al.*, 2014). Así mismo COX-2 está implicado en el fenotipo invasivo y angiogénico del IBC (Robertson *et al.*, 2008) y se ha relacionado con la estimulación vía linfangiogénica en IMC (Clemente *et al.*, 2013). También se ha descrito que existe una relación entre COX-2, la supervivencia de células tumorales y la aparición de metástasis (Nguyen *et al.*, 2009). Además, esta línea celular también presenta una sobreexpresión de la proteína E-cadherina. Esta última, es una proteína de adhesión célula-célula presente en tejidos epiteliales, codificada por el gen supresor de tumores CDH1. Se ha estudiado que las mutaciones en este gen producen un aumento de la proliferación celular, la invasión tumoral y la metástasis (Hiraguri *et al.*, 1998; Lombaerts *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014), además de ser una pieza clave para la EMT, ya que la pérdida de expresión de E-cadherina en las células, promueve la aparición de este proceso (Thiery *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014). De forma aparentemente contradictoria, es característico que el IBC sobreexprese E-

cadherina, que esta proteína se encuentre localizada en la membrana de las células tumorales, y que se relacione con la formación de émbolos linfovasculares (Tomlinson *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2010). IPC-366 presenta un alto índice de proliferación, analizado mediante un ensayo de crecimiento *in vitro* y el índice de proliferación Ki-67 (87,15%). La gran expresión de Ki-67 se ha asociado con un mal pronóstico en los tumores mamarios malignos, tanto en mujeres como en perras (Peña *et al.*, 1998; Stuart-Harris *et al.*, 2008). Además, se ha observado que IPC-366 tiene un mayor índice de proliferación que el tumor original, lo que sugiere un aumento de la capacidad proliferativa, probablemente por la selección *in vitro* de las células más malignas.

En IPC-366 se ha descrito una alta positividad a COX-2 y la presencia de una morfología celular típica de células similares a las endoteliales, lo que se ha relacionado con el fenómeno de mimetismo vascular (VM) (Clemente *et al.*, 2010a; Clemente *et al.*, 2013). El VM fue descrito por primera vez en melanoma humano (Maniotis *et al.*, 1999) y consiste en la generación de canales vasculares tapizados por células tumorales malignas que adquieren características endoteliales. En teoría dichos canales podrían suministrar sangre y nutrientes necesarios para el crecimiento tumoral. La generación de estos canales vasculares por parte del tumor es un marcador fenotípico de malignidad de las células tumorales (Maniotis *et al.*, 1999; Folberg *et al.*, 2000). El VM no aparece en todos los tipos de cáncer, pero se presenta con frecuencia en el IBC (Shirakawa *et al.*, 2002) y el IMC (Clemente *et al.*, 2010a). Recientemente, también se ha identificado este fenómeno en xenotrasplantes de IMC (Camacho *et al.*, 2013). La mayor proporción de células multinucleadas, altamente malignas, encontradas en IPC-366 podría representar las primeras

etapas del VM, asemejándose a células con características endoteliales (ELC, *endothelial-like cells*) altamente indiferenciadas. COX-2 se ha caracterizado por ser un marcador de ELC implicado en VM (Clemente *et al.*, 2010a; Clemente *et al.*, 2013; Markosyan *et al.*, 2013). Son necesarios más estudios para definir las características angiogénicas y VM en IPC-366, aunque esta nueva línea celular podría representar un modelo muy interesante para el estudio del VM y otras propiedades angiogénicas. Los tumores presentan una composición celular heterogénea. Existe una pequeña población celular con capacidad de auto-renovación, diferenciación, propagación ilimitada y resistencia a terapias, denominadas células madre del cáncer (CSC). Estas células son responsables de la formación de tumores, dando lugar a los diferentes tipos de células dentro del tumor, así como de la progresión tumoral (Wang *et al.*, 2014). Las células madre del cáncer de mama (BCSC) fueron identificadas por primera vez por Al-Hajj y col. (2003) que observaron que estas células son capaces de sobrevivir y proliferar en sistemas de cultivo no adherente, formando agregados de células denominados mamosferas (Ponti *et al.*, 2005). Se ha postulado el papel de COX-2 como un marcador de células madre (Thanan *et al.*, 2012), por lo que la alta proporción de células positivas a COX-2 en IPC-366 podría también indicar una alta proporción de células madre de cáncer en la línea celular IPC-366.

En el capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral, se describen los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad que presenta la línea celular IPC-366 de crecer en condiciones no adherentes formando mamosferas. Asimismo, se comparan las dos líneas celulares SUM149 e IPC-366 en condiciones de cultivo adherentes y no adherentes, en términos de producción de proteínas de EMT y expresión de diferentes marcadores de células madre. De esta forma,

además de comparar ambos sistema de cultivo, podremos establecer si el modelo canino es un buen modelo para la investigación del IBC.

Existen varias líneas celulares de cáncer de mama humano que tienen la capacidad de crecer formando mamosferas, tales como MCF-7, MDA-MB-436, T47D, BT474 (Dontu *et al.*, 2003), así como las líneas celulares de IBC, SUM149 y MDA-IBC-3 (Holliday y Speirs, 2011). Además, se ha observado que líneas celulares de cáncer mamario canino son también capaces de crecer en condiciones no adherentes (Cocola *et al.*, 2009) tales como la línea celular de osteosarcoma D17 o la línea de cáncer mamario REM134 (Wilson *et al.*, 2008; Blacking *et al.*, 2011).

De acuerdo con nuestros resultados, IPC-366, comparte varias características con la línea celular humana SUM149. Ambas líneas celulares son capaces de formar mamosferas con una apariencia de esferas sólidas redondeadas. En general, las líneas celulares de cáncer de mama, forman colonias con diferentes morfologías (Kenny *et al.*, 2007). Kenny y col. (2007) postularon una descripción morfológica de las mamosferas producidas por distintas líneas celulares con distinto fenotipo. Según su descripción, las mamosferas de IPC-366 y SUM149 se corresponderían con un fenotipo basal, con una morfología en forma de racimo, formando colonias con una adhesión célula-célula reducida; características similares a las mamosferas de SUM149 e IPC-366 se han encontrado en otra línea celular de cáncer de mama: MDA-MB-468.

Además, ambas líneas celulares (SUM149 e IPC-366) sobreexpresan la enzima RhoC GTPasa y presentan una pérdida de expresión de la proteína WISP3 lo que se considera una característica diferencial del fenotipo

inflamatorio, en comparación con los tumores no IBC (van Golen *et al.*, 1999; Kleer *et al.*, 2002). Por lo tanto, podemos afirmar que IPC-366 comparte, en este sentido, las características moleculares del fenotipo inflamatorio.

Los sistemas de cultivo de células no adherentes presentan varias ventajas en comparación con los cultivos de células adherentes, como una mejor reproducción del ambiente del tumor y la preservación de las características del tumor original (Bhadriraju y Chen, 2002; Sun *et al.*, 2006). Los cultivos en suspensión muestran una supervivencia limitada, puesto que no se desarrollan después de una serie de pases (Iglesias *et al.*, 2013). Ponti y col. (2005) observaron que el cultivo de células procedentes de neoplasias positivas a RE podía generar esferas a largo plazo durante más de 40 pases. Las mamosferas de diferentes líneas celulares de cáncer mamario humano, como MCF-7 (RE+/RP+/HER-2-), son capaces de sobrevivir en suspensión durante más de 5 pases; por el contrario, otras líneas celulares como MDA-MB-231 (triple negativa), no alcanza este número de pases (Wang *et al.*, 2014). De acuerdo con nuestros resultados, IPC-366 y SUM149 son capaces de sobrevivir más de 6 pases sin alterar sus características de células madre.

Además, los resultados obtenidos de las mamosferas de ambas líneas celulares indican un gran potencial de auto-renovación a largo plazo, puesto que presentan un ligero aumento en el porcentaje MFE a través de los distintos pases de las mamosferas. Dey y col. (2010), señalaron que las esferas de tumores primarios tendían a ser más pequeñas a medida que se sucedían los pases. Los pocos estudios existentes sobre las características de proliferación de las mamosferas de SUM149 avalan nuestros resultados ya que SUM149 es capaz de producir mamosferas a largo plazo (Hu *et al.*, 2012).

Las tasas de proliferación de células de cultivo adherente y no adherente son generalmente diferentes y dependen de la línea celular y la matriz del cultivo de las células (Edmondson *et al.*, 2014). En este trabajo hemos encontrado una reducción en las tasas de viabilidad celular en los cultivos no adherentes de SUM149 e IPC-366 en comparación con los cultivos adherentes. Coincidiendo con nuestros resultados, otros estudios desarrollados en la línea celular MCF10A, crecida en condiciones de suspensión con células del estroma y epiteliales, mostraron una reducción en la tasa de proliferación en cultivo en suspensión, en comparación con el cultivo en monocapa que, podría ser debida, a la capacidad de las células del estroma para alterar el estado de diferenciación de las células epiteliales (Wang *et al.*, 2010b). Sin embargo, otros autores atribuyen esta diferencia de viabilidad celular a la estructura y crecimiento de los esferoides, que pueden originar una falta de oxígeno y nutrientes en las células del interior del esferoide, así como la acumulación de residuos en el núcleo del esferoide (Khaitan *et al.*, 2006; Edmondson *et al.*, 2014).

El fenotipo de las BCSC puede caracterizarse por la proporción de la expresión de los marcadores CD44/CD24 y de la enzima ALDH1 (Wang *et al.*, 2014). Está ampliamente aceptado que las células que tienen el potencial de formar mamosferas presentan un fenotipo CD44⁺/CD24^{-baja} (Dey *et al.*, 2009). En la especie humana se ha descrito que las células tumorales con fenotipo ALDH1⁺/CD44⁺/CD24^{-baja} son capaces de generar tumores en ratones inmunodeprimidos, mientras que las células con fenotipo ALDH1⁻/CD44⁺/CD24^{-baja} no muestran esta capacidad tumorigénica (Ricardo *et al.*, 2011).

Las referencias en la literatura sobre la presencia de células madre en los tumores mamarios caninos es muy escasa (Grimshaw *et al.*, 2008), pero se ha descrito que la expresión de CD44 en líneas celulares de cáncer mamario canino está asociada con el estado proliferativo (Magalhaes *et al.*, 2013). Se ha observado en tumores mamarios caninos que las células que presentan un fenotipo ALDH⁺ son capaces de formar mamosferas, al contrario que las células con fenotipo ALDH⁻ que carecen de esta capacidad (Michishita *et al.*, 2011).

Según nuestros resultados, la capacidad de IPC-366 para formar mamosferas a largo plazo, no está relacionada con ALDH, ya que la expresión de este marcador de células madre fue baja en IPC-366 en condiciones adherentes y negativa en condiciones no adherentes. Estudios recientes han demostrado que no existe una correlación entre la expresión de marcadores típicos de células madre y la capacidad de algunas líneas celulares para formar mamosferas (Iglesias *et al.*, 2013).

Las células de SUM149 e IPC-366 en ambas condiciones de cultivo mostraron un fenotipo CD44⁺/CD24^{-baja}. Diversos estudios relacionan que este tipo de expresión es característica de células madre basales con propiedades mesenquimatosas (Yu *et al.*, 2012), sobre todo la expresión de CD44 es la que más se ha asociado con características de las células madre mesenquimatosas (Ricardo *et al.*, 2011). Por lo tanto, este inmunofenotipo de expresión en cultivos de IPC-366 y SUM149 revela que ambas líneas celulares presentan propiedades similares a células madre.

Siguiendo con la caracterización del inmunofenotipo de IPC-366 y SUM149 en condiciones adherentes y no adherentes, ninguna de las líneas

celulares mostró expresión del marcador CD45. CD45 es considerado un marcador hematopoyético cuya expresión está ausente en las células madre mesenquimatosas (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*) (Calloni *et al.*, 2013). Varios estudios han sugerido que las MSC son las responsables de la formación de mamosferas mediante la secreción de diferentes factores y que las células con fenotipo CD45 negativo están relacionadas con la EMT y la metástasis (Karnoub *et al.*, 2007; Klopp *et al.*, 2010).

La sobreexpresión del marcador CD326 se asocia con una baja supervivencia en pacientes con TNBC (Patriarca *et al.*, 2012). Este marcador se expresa en tumores epiteliales y no en tejidos mesenquimatosos, neuroendocrinos o musculares (Went *et al.*, 2004). No existen estudios previos de este marcador en los tumores mamarios caninos. Coincidiendo con nuestros resultados, CD326 se expresa de forma elevada en algunas líneas de células epiteliales como SUM149 (Gadalla *et al.*, 2013). Aunque son necesarios más estudios para dilucidar el papel de CD326 en IPC-366, la falta de su expresión en esta línea celular, sugiere que las características mesenquimatosas de esta línea están más preservadas en condiciones adherentes y no adherentes que en la línea celular SUM149.

CD133, otro marcador de superficie de BCSC, está sobreexpresado en mamosferas derivadas de líneas celulares de cáncer mamario humano (Nadal *et al.*, 2013) y en líneas celulares de adenocarcinoma canino (Michishita *et al.*, 2011). Además, su expresión en células tumorales se ha relacionado con el fenómeno de VM (Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, en nuestro estudio IPC-366 y SUM149 no expresaron este marcador en condiciones adherentes y no adherentes, aunque tanto SUM149 (De Pradip *et al.*, 2013)

como IPC-366 presentan características de mimetismo vascular; ya que los resultados histológicos de los pellets de ambas líneas celulares revelaron la presencia de células ELC, tanto en condiciones adherentes como no adherentes.

Merece destacarse la positividad encontrada a CD146, una molécula de adhesión celular considerada como un marcador específico de células madre de linaje endotelial (Kraan *et al.*, 2014), en ambas líneas celulares. Así, CD146 se expresa intensamente en las lesiones metastásicas, desempeña un papel crítico en la angiogénesis tumoral, y aumenta la motilidad e invasividad de las células tumorales, promoviendo el proceso de EMT (Zeng *et al.*, 2012). Además, las células perivasculares CD146⁺ muestran perfiles funcionales y de expresión de genes similares a las MSC (Zeng *et al.*, 2012). Por lo tanto, la expresión de CD146 en IPC-366 y SUM149 podría ser debida a la presencia de células ELC, en relación con el fenómeno de mimetismo vascular. Esta subpoblación de células de tipo endotelial que exhibe un fenotipo de células MSC podría ser la responsable del fenotipo angioinvasivo e "inflamatorio" característico de IBC e IMC.

Este estudio demostró que ambas líneas celulares en cultivos adherentes y no adherentes expresan el factor angiogénico VEGF-A, que se considera característico del fenotipo angiogénico de IBC (Robertson *et al.*, 2010; Arias-Pulido *et al.*, 2012) y de IMC (Clemente *et al.*, 2013). Este factor angiogénico es uno de los más potentes promotores de la angiogénesis y linfangiogénesis, está implicado en el crecimiento endotelial, la motilidad, y la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Kowanetz y Ferrara, 2006). Ponti y col. (2005) sugirieron que las células BCSC tienen una gran actividad angiogénica asociada a la

expresión de VEGF-A. Otros autores también han indicado que los factores VEGF se segregan en concentraciones más altas en células en cultivos no adherentes, en comparación con las células adherentes (Sung *et al.*, 2013). Nuestros resultados también revelan que las células en condiciones no adherentes expresan más cantidad de VEGF-A que las células adherentes, siendo además la aparición de angiogénesis más frecuente en los cultivos no adherentes. Por otro lado, también se ha demostrado que las células en suspensión producen más moléculas de señalización paracrina que en condiciones adherentes y que estas moléculas incrementan el comportamiento invasivo en células de carcinoma ductal (Sung *et al.*, 2013).

Como hemos señalado anteriormente, la EMT es un proceso implicado en la progresión tumoral que conduce a las células epiteliales a presentar características típicas de células mesenquimatosas (Kong *et al.*, 2011) mediando, de esta forma, la invasión tumoral y la metástasis (Iglesias *et al.*, 2013). La adquisición del fenotipo mesenquimatoso implica la pérdida de expresión de los marcadores epiteliales (Mani *et al.*, 2008; Iglesias *et al.*, 2013). Aparte de los resultados anteriores que revelan las características mesenquimatosas de las células de IPC-366 y SUM149, la expresión de los marcadores de EMT, N-cadherina y E-cadherina, fue mayor en el cultivo en células adherentes que en células no adherentes. La disminución en la expresión de E-cadherina observada en los cultivos no adherentes en comparación con cultivos adherentes se asocia con la pérdida de fenotipo epitelial y la consiguiente adquisición de un fenotipo mesenquimatoso, que, según se ha demostrado, promueve la formación de mamóferas (Klopp *et al.*,

2010). Un estudio reciente ha revelado una asociación entre la expresión de E-cadherina y la formación de esferoides (Iglesias *et al.*, 2013).

Por otro lado, nuestros resultados también revelaron una mayor expresión de fibronectina en células no adherentes en comparación con las células adherentes. Este aumento de expresión en células en suspensión podría relacionarse, además de con la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso, con la formación de una matriz extracelular más similar a la encontrada en los tumores originales.

Por último, observamos que las mamosferas derivadas de IPC-366 y SUM149, al igual que las células adherentes, tienen la capacidad de formar tumores en ratones SCID, lo que indica que estas líneas celulares tienen una alta capacidad tumorigénica. Diversos autores han observado que un número mínimo de células BCSC (entre 100 y 1.000 células) podría formar tumores en ratones SCID (Al-Hajj *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005). Además, se ha observado una correlación entre el tamaño de las mamosferas y su capacidad tumorigénica (Edmondson *et al.*, 2014).

Nuestros resultados histológicos de los pellets y los tumores originados por células adherentes y no adherentes de IPC-366 y SUM149, revelaron que ambas líneas celulares presentan una gran similitud. Existen pocas referencias bibliográficas que describan la histología de los tumores originados a partir de mamosferas y la histología de los pellets de mamosferas (Smart *et al.*, 2013).

En primer lugar, los pellets de células adherentes de ambas líneas celulares resultaron ser muy similares, estando constituidos, ambos, por células redondeadas con alto grado de malignidad. Las células de los pellets de mamosferas mostraron tantos grupos de células epiteliales dispuestas en

estructuras similares a acinis y frecuentes células con morfología endotelial. Este patrón podría representar la imagen "temprana" de un tumor mamario, que incluiría "verdaderas" células neoplásicas mamarias y el aporte vascular inicial estromal correspondiente, en este caso derivado de las células neoplásicas (VM). Ambas formaciones fueron más evidentes en IPC-366 que en SUM149. Esto podría ser debido a un desarrollo más rápido de estas estructuras en la especie canina. Ambas líneas celulares mostraron características histológicas semejantes.

Las referencias previas de estudios histológicos de mamosferas son muy escasas. Se han descrito estructuras huecas y sólidas en mamosferas derivadas de células progenitoras MUC1+ o CD10+, aunque estas estructuras huecas se interpretaron como formas mioepiteliales (Smart *et al.*, 2013). Además se ha observado que las mamosferas originadas de la línea celular MCF-7 pueden formar estructuras de VM en condiciones *in vitro* (Shevde *et al.*, 2010). Los modelos animales son de gran valor para la investigación de la progresión del cáncer mamario y sus metástasis (Lelekakis *et al.*, 1999; Fantozzi y Christofori, 2006; Ruggeri *et al.*, 2014). La posible secreción local de hormonas por parte de las células neoplásicas desempeñaría un papel fundamental en este aspecto. Sin embargo, no se ha dilucidado todavía el microambiente hormonal del tumor, aunque podría ser crucial para el desarrollo de tumores y sus metástasis (de Jong y Maina, 2010).

Por ello, en el capítulo 3 se pretende desarrollar un modelo animal de xenotrasplantes en ratones macho para dilucidar qué factores endocrinos pueden estar implicados en la carcinogénesis de mama, comparando el crecimiento del tumor y los niveles de esteroides intratumorales en ratones

hembra y macho, inoculados con las líneas celulares de IMC (IPC-366) e IBC (SUM149). Según la bibliografía consultada, éste sería el primer estudio de tumorigenicidad que se realiza en machos de un modelo animal para la investigación del cáncer mamario.

Nuestros resultados revelaron que ambas líneas celulares eran capaces de reproducir tumores en ratones macho, apareciendo estos al mismo tiempo que en ratones hembra. En todo caso, ésta es la primera vez que se señala el crecimiento de xenotrasplantes en ratones macho, lo que supone un hecho trascendental que implica que, para su desarrollo, no es imprescindible un ambiente estrogénico previo. Sin embargo, la frecuencia de aparición del tumor fue menor en ratones macho que en ratones hembra, lo que se puede atribuir a un ambiente más androgénico. Se ha postulado que los andrógenos ejercen efectos inhibidores en el crecimiento de células neoplásicas de cánceres mamarios hormono-dependientes (Hanamura *et al.*, 2013). Así mismo, la aparición de metástasis y ulceración fue más baja en los machos que en las hembras. La metástasis tumoral comprende diferentes procesos que hacen que las células tumorales se movilicen a distintas localizaciones diferentes al tumor original (Roy y Vadlamudi, 2012) y algunos autores sugieren que las células del estroma son las responsables de regular la producción de diversos factores implicados en el proceso de la metástasis, tales como COX-2, TNF- α , IL-6, y IL-11 (Simpson y Davis, 2001), donde también los niveles hormonales tumorales podrían ejercer una influencia en el proceso metastático. De hecho, varios autores asocian altos niveles de expresión de E1SO4 con la aparición de metástasis en los ganglios linfáticos (Kristensen y Borresen-Dale, 2000), dato que corroboraría los resultados obtenidos en este estudio, donde los ratones

hembra presentan mayores niveles intratumorales de E1SO4 y mayores tasas de aparición de metástasis.

Curiosamente, las líneas celulares de IBC e IMC utilizadas en este estudio son triple negativas a la expresión de los receptores hormonales (RE y RP) y HER-2. En los cánceres mamarios RE positivo, se ha demostrado que los andrógenos inhiben la proliferación celular, sin embargo, hay un escaso conocimiento de las funciones de los andrógenos en los TNBC (Shibuya *et al.*, 2008). Otros trabajos señalan que los tumores negativos a la expresión de RE y RP se asocian a una disminución de los niveles hormonales de andrógenos y estrógenos en comparación con los tumores positivos a estos receptores (McNamara *et al.*, 2013). En este sentido, los resultados son contradictorios ya que Blankenstein y col. (1999) observaron una presencia significativa de E2 en tumores RE-negativo.

Wiebe y col. (2006) sugirieron que los metabolitos de P4 producidos localmente por los tejidos mamarios podrían funcionar como promotores o inhibidores de la tumorigénesis, ya que P4 es el precursor de las principales hormonas esteroideas (andrógenos y estrógenos). Por lo tanto, la progresión tumoral podría estar relacionada con los cambios en los niveles de P4 locales (Wiebe, 2006). Nuestros resultados revelan que los niveles de P4 intratumorales están reducidos en ratones machos xenotrasplantados en comparación con los encontrados en ratones hembras. Esta disminución de los niveles de P4 podría relacionarse con la baja frecuencia de metástasis encontrada en los machos, ya que se ha propuesto que los metabolitos de P4 podrían desempeñar un papel en la adquisición de potencial metastásico (Wiebe, 2006).

Los estrógenos son responsables del desarrollo y progresión del cáncer mamario mediante la estimulación de la proliferación celular (Xie *et al.*, 1999). E2 es el estrógeno más potente y sus efectos están mediados por su unión al RE (Chetrite *et al.*, 2000; Roy y Vadlamudi, 2012). Como hemos señalado anteriormente, los andrógenos inhiben la proliferación celular en células neoplásicas (Hanamura *et al.*, 2013), sin embargo, su papel en la carcinogénesis en el tejido mamario todavía no se ha aclarado y existe cierta controversia sobre sus efectos sobre el cáncer mamario (Garay y Park, 2012). Algunos estudios han revelado que los andrógenos median el crecimiento celular, a través de procesos de aromatización en células epiteliales neoplásicas del cáncer mamario (Jensen *et al.*, 2003). Se cree que una posible producción local de hormonas jugaría un papel importante en los cánceres hormono-dependientes en la especie humana (Labrie *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2007). En la especie canina también se ha postulado esta posibilidad, aunque no se ha demostrado (Peña *et al.*, 2003b). De esta forma, la secreción intratumoral de hormonas esteroides justificaría que dichas neoplasias no dependerían de los niveles de hormonas circulantes, sino que éstas podrían ser producidas de forma local a partir de precursores circulantes (McNamara y Sasano, 2015).

Según los resultados obtenidos, los niveles de hormonas circulantes analizados en sueros fueron más bajos en los ratones con tumores que los encontrados en el grupo de control, lo que sugiere que los estrógenos y andrógenos producidos potencialmente en los tejidos, actúan *in situ* sin que se liberen al torrente sanguíneo (Suzuki *et al.*, 2001). Se postula que los tumores captan precursores esteroides circulantes para producir más esteroides a partir

de los mismos (Blankenstein *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2003b). Los altos niveles de estrógenos encontrados en los tumores parecen ser el resultado de la biosíntesis y la degradación de distintas enzimas esteroideogénicas. Aparte de la actividad enzimática, la biosíntesis de estrógenos también dependerá de la disponibilidad de sustrato (Blankenstein *et al.*, 1999).

En este estudio hemos encontrado varias diferencias en los niveles intratumorales de estrógenos y andrógenos entre hembras y machos. Los machos presentaron niveles más altos de andrógenos intratumorales mientras que las hembras contenían mayores niveles de estrógenos. Nuestro estudio apoya la hipótesis de la producción local de estrógenos en IMC (Peña *et al.*, 2003b; Illera *et al.*, 2006; Sánchez-Archidona *et al.*, 2007) ya que se encontraron mayores concentraciones de SO₄E1 y E2 en el tumor que en el suero. Puesto que los andrógenos inhiben la proliferación celular, los altos niveles de andrógenos encontrados en los tumores de los machos, podrían estar asociados tanto con la baja frecuencia de tumores en los machos inoculados con SUM149, como con las bajas tasas de metástasis encontradas en ambas líneas celulares. Planas-Silva y Vals (2007) comprobaron que el E2 promueve la EMT de las células neoplásicas en tumores RE-positivos, facilitando el proceso de metástasis. Por lo tanto, los niveles altos de estrógenos intratumorales encontrados en ratones hembra también podrían estar implicados en el proceso metastásico y la malignidad de las células. Los niveles intratumorales de E1SO₄ en las hembras de nuestro estudio fueron significativamente mayores que en los machos, mientras que los niveles de E2 fueron similares en ambos modelos. Probablemente, las concentraciones de E1SO₄ que se encuentran en las hembras podrían actuar como un reservorio

de estrógenos para las células (Wong *et al.*, 2001). En el caso de los machos, para contrarrestar los altos niveles intratumorales de T y promover la progresión tumoral, las células tumorales podrían utilizar depósitos de E1SO4 para producir estrógenos biológicamente activos (E2) y por lo tanto promover la proliferación celular (Sánchez-Archidona *et al.*, 2007; Purohit *et al.*, 2011).

La hipótesis de la posible secreción de hormonas esteroides por parte de IMC (e IBC), mencionada con antelación en esta Tesis Doctoral, nos llevó a intentar demostrar dicha síntesis mediante el empleo de células neoplásicas *in vitro*. Por ello, en el capítulo 4 se desarrolló y validó un método simple, preciso y fiable, mediante la técnica de EIA de amplificación, con el fin de cuantificar la producción de hormonas esteroides en los medios de cultivo obtenidos del crecimiento de las líneas celulares IPC-366 y SUM149.

En este trabajo se demostró que las células neoplásicas son capaces de segregar hormonas al medio de cultivo y que existe una correlación entre la síntesis de estas hormonas y el número de células en cultivo. La validación de la técnica EIA, para la medición de hormonas esteroides en medios de cultivo de líneas celulares, es decisiva para el conocimiento del mecanismo hormonal implicado en los tumores mamarios hormono-dependientes. Se ha demostrado que las técnicas EIA son unos métodos específicos y precisos para cuantificar hormonas esteroides (Munro y Lasley, 1988), lo que nos ha llevado a validar una técnica de EIA amplificado directa, sencilla y precisa para las hormonas esteroides P4, A4, T, E2 y E1SO4. Las condiciones en las que la técnica se ha realizado se basan en estudios previos (Silván *et al.*, 1993; Illera *et al.*, 1997; Carneiro *et al.*, 1998). Se trata de una técnica directa, sin extracción previa de la muestra, de alta precisión, debido a la etapa de amplificación (incubación de

24 h de la muestra con el anticuerpo en fase sólida) y la temperatura (4°C en todas las etapas, excepto para el sustrato). Esto simplifica en gran medida el método y reduce posibles errores debido al procedimiento de extracción. La prueba de paralelismo confirmó la excelente discriminación de las hormonas esteroides (P4, A4, T, E2 y E1SO4) en medios de cultivo, las cuales no muestran interferencias en el ensayo. En este sentido, tanto el coeficiente de variación intra e inter-ensayo (%) están dentro de límites aceptables.

Las glándulas mamarias normales y neoplásicas son consideradas por algunos autores un tejido endocrino, sobre todo en virtud de la síntesis y actuación de estrógenos y andrógenos (Liao y Dickson, 2002). La acción de los estrógenos y andrógenos (producidos o no localmente) es crucial en el crecimiento neoplásico y la progresión del cáncer de mama, a causa de su interacción con receptores específicos (Liao y Dickson, 2002). De hecho, los progestágenos se han asociado con cambios de proliferación en el tejido mamario normal, pero su papel en el cáncer mamario sigue en estudio (Wiebe, 2006). Hasta la fecha, no existen estudios que hagan referencia a los niveles de hormonas esteroides en medios de cultivo de líneas celulares de cáncer mamario. Hay varios estudios sobre las concentraciones séricas de hormonas sexuales endógenas o exógenas y el riesgo de cáncer de mama en general (Key *et al.*, 2003; Grace *et al.*, 2004; Sturgeon *et al.*, 2004), y algunas publicaciones sobre los niveles séricos de esteroides en mujeres con tumores mamarios benignos o malignos (Mady *et al.*, 2000; Asseryanis *et al.*, 2004; Sturgeon *et al.*, 2004). En un estudio previo de nuestro grupo, se postuló una posible síntesis local de algunas hormonas esteroides en las glándulas mamarias caninas normales y neoplásicas, debido a las altas concentraciones

de estas hormonas en los homogeneizados tumorales (Peña *et al.*, 2003b; Queiroga *et al.*, 2005b).

En general, los estrógenos incrementan la proliferación de células neoplásicas; las concentraciones de E1SO4 podrían representar un importante reservorio de estrógenos biológicamente activos en tumores mamarios (Pasqualini *et al.*, 1996; Billich *et al.*, 2000; Mady *et al.*, 2000; Camacho *et al.*, 2013; Secky *et al.*, 2013). En el cáncer de mama humano, algunos autores han detectado grandes cantidades de E1 y E1SO4 en suero, aunque los resultados han sido contradictorios (Mady *et al.*, 2000; Secky *et al.*, 2013). Por otro lado, el E2 puede influir en la mitogenicidad de células mamarias RE positivas y en la progresión de la neoplasia mamaria (Shyamala *et al.*, 2002).

Se ha indicado que los tejidos mamarios humanos normales y neoplásicos también contienen y producen varias formas de andrógenos (Liao y Dickson, 2002; Grace *et al.*, 2004; Queiroga *et al.*, 2005b). Sin embargo, no existe mucha información sobre los niveles de andrógenos en el tumor o suero de mujeres con cáncer. En un estudio (Mady *et al.*, 2000), no se encontraron diferencias significativas en los niveles de andrógenos entre tumores malignos y benignos, aunque sí una disminución muy significativa de T en los sueros de pacientes con tumores benignos y malignos. En los últimos años se ha confirmado la presencia de RA en las neoplasias mamarias humanas (Garay y Park, 2012) y caninas (Illera *et al.*, 2006; De Andrés *et al.*, 2016). Según algunos autores, aunque el cáncer mamario humano expresa RA, no hay asociación con los niveles de andrógenos y el crecimiento y progresión de estos tumores (Bradlow y Sepkovic, 2004). Se sugiere que un aumento en la conversión de T en DHT, que conduce a un aumento en la actividad de la

enzima 5 α -reductasa, debería inhibir la proliferación celular en el cáncer mamario humano (Suzuki *et al.*, 2001). En el cáncer mamario canino, la alta proporción de andrógenos encontrados en los homogeneizados tumorales podría atribuirse a una síntesis local (Illera *et al.*, 2006).

P4 es un precursor de las hormonas esteroides activas (estrógenos y andrógenos) en el tejido mamario. Los niveles de P4 están asociados con los procesos de proliferación, apoptosis y metástasis (Wiebe, 2006), aunque el papel de P4 sigue en controversia: algunos autores han revelado que P4 tiene efectos sobre el cáncer mamario, mientras que otros indican que P4 no ejerce ningún efecto directo sobre los tumores tanto en la especie humana (Santen *et al.*, 1990) como en la canina (Mol *et al.*, 1996). Según otros trabajos, los cambios en los niveles de P4 están relacionados con la progresión tumoral (Wiebe, 2006). Nuestros resultados revelan que los niveles de P4 podrían afectar al crecimiento celular en condiciones *in vitro*. Estudios realizados en la línea celular de neoplasia mamaria MCF7, revelaron que la dutasterida (tratamiento que previene la conversión de T a DHT) afecta a los metabolitos de P4, inhibiendo la proliferación celular y la adhesión (Sturgeon *et al.*, 2004). De la misma forma, estudios en líneas celulares como MCF7 y MCF10 expuestas a distintas concentraciones de factores mitogénicos, E2 o de 5 α -pregnanos (metabolito de P4), dieron como resultado un aumento en los niveles de 5 α -P4 y se produjo un aumento en la proliferación celular (Pawlak *et al.*, 2005).

Nuestros resultados, en cuanto a la cuantificación de hormonas esteroides en los medios de cultivo, indicaron que todas las hormonas estudiadas son medibles en el medio de cultivo y que el aumento en la

concentración de las hormonas esteroides depende directamente del número de células cultivadas. Entre todas las hormonas estudiadas, se ha observado una mayor producción de A4, un precursor de T y de E2. Estos datos confirman hipótesis previas de nuestro grupo que suponían una producción de hormonas esteroides por parte de las células tumorales de IMC, al analizar la concentración de estas hormonas en homogenizados tumorales (Peña *et al.*, 2003b; Queiroga *et al.*, 2005b) y en los homogeneizados tumorales de xenotrasplantes de IMC en ratones SCID (Camacho *et al.*, 2013). En dichos trabajos previos, se encontró un aumento significativo de los estrógenos y otras hormonas esteroides en los macerados tumorales. Hasta la fecha, el aumento de la secreción de las hormonas esteroides en IBC no había sido investigado. En el presente estudio, describimos por primera vez la secreción de las hormonas esteroides por parte de la línea SUM149. Aunque se encontró una mayor concentración hormonal en esta línea celular que en IPC-366, los resultados obtenidos en ambas líneas celulares son similares: siendo la hormona más secretada en el medio de cultivo A4 y en segundo lugar E2. El paralelismo de ambas líneas celulares en la producción de hormonas esteroides, corrobora de nuevo el modelo canino como un modelo animal válido para el estudio de la enfermedad humana.

En definitiva, nuestros resultados son los primeros sobre las concentraciones de hormonas esteroides en IBC y en medios de cultivo de líneas celulares de IBC e IMC y demuestran que, las células neoplásicas de esta enfermedad tan agresiva, son capaces de segregar estas hormonas al medio de cultivo. De acuerdo con la bibliografía consultada, sólo existe un estudio previo en relación con las hormonas en medio de cultivo y se refiere a

los niveles de E2 en el cáncer de ovario (Poels *et al.*, 1989). Los niveles de E2 de nuestro trabajo son muy similares a los citados por estos autores.

El presente estudio ofrece una metodología nueva, fácil y precisa para la detección de hormonas esteroides, secretadas en el medio de cultivo por las células neoplásicas, representando una herramienta muy valiosa para el conocimiento más profundo de la interacción de las hormonas esteroides en el cáncer mamario canino y humano.

Es muy interesante observar que ambas líneas celulares de IBC e IMC, utilizadas en el presente estudio, son triple negativas a la expresión de los receptores hormonales RE, RP y HER-2. La posible acción autocrina y paracrina de las hormonas esteroides segregadas en el crecimiento de células neoplásicas, podría estar mediada por otros receptores como RE- β y, sin embargo, se necesita una mayor investigación en este campo. También abre la investigación a posibles tratamientos hormonales, incluso en pacientes con tumores tradicionalmente hormono-independientes (RE- y RP-).

La utilización de líneas celulares es útil para mejorar nuestra comprensión acerca del desarrollo y tratamiento del cáncer. En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se ha establecido la primera línea celular de IMC denominada IPC-366. Se trata de la primera línea celular descrita para esta enfermedad, de la cual podemos destacar que es una línea celular triple negativa, de fenotipo basal y altamente maligna, tumorigénica y metastásica. De acuerdo con su perfil de malignidad y perfil fenotípico de marcadores tumorales, esta nueva línea celular de IMC podría convertirse en un modelo celular útil, no sólo para estudios básicos de biología del tumor, sino también para el desarrollo de

agentes terapéuticos potenciales y futuras nuevas estrategias terapéuticas contra el IMC y el IBC.

Además, hemos comprobado que comparte muchas características con su homóloga humana, la línea celular SUM149. Este hecho es de gran relevancia, ya que en la actualidad hay muy pocas líneas celulares para estudiar el IBC. Por lo tanto, IPC-366 es un buen modelo comparativo para avanzar en el estudio de ambas enfermedades.

Por otro lado, en el presente trabajo también hemos ampliado el conocimiento de la implicación de las hormonas esteroides en el ambiente tumoral del IBC e IMC y, se ha propuesto como modelo comparativo con la enfermedad en la mujer y en la perra, un biomodelo animal en macho, para determinar las diferencias en el desarrollo tumoral del IBC e IMC, en base a sus diferentes entornos hormonales. De esta forma, hemos observado que los tumores son capaces de producir localmente hormonas esteroides y que los andrógenos parecen jugar un papel crucial en el desarrollo y progresión tumoral, además de la aparición de metástasis.

Por último hemos corroborado el hecho de que las células neoplásicas de IPC-366 y SUM149 en condiciones *in vitro* secretan hormonas esteroides al medio, que pueden ser cuantificadas por la nueva técnica EIA de amplificación desarrollada y validada en este trabajo. Esta metodología es muy valiosa para la detección de la producción de esteroides en medios de cultivo y se podría utilizar en los estudios sobre la regulación hormonal y, el efecto de agentes terapéuticos en las líneas celulares utilizadas en la investigación del cáncer mamario inflamatorio.

VII. CONCLUSIONES

Conclusión 1: La nueva línea celular de cáncer mamario inflamatorio canino IPC-366, es una línea celular triple negativa, es decir es negativa a la expresión de los receptores hormonales de estrógenos, progesterona y al receptor del factor de crecimiento epidérmico HER-2. Es de tipo epitelial-basal y presenta un fenotipo muy agresivo y angiogénico, con la aparición frecuente de fenómenos de mimetismo vascular.

Conclusión 2: IPC-366 muestra un crecimiento rápido en condiciones *in vitro* con un alto índice de proliferación. Además, es altamente tumorigénica y metastásica ya que origina tumores *in vivo* 2 semanas después de la inoculación de las células en ratones hembras SCID, y metastatiza con frecuencia a pulmón, hígado y linfonódulos.

Conclusión 3: IPC-366 y SUM149 comparten muchas características tanto *in vitro* como *in vivo*. Ambas líneas celulares son triple negativas y presentan un inmunofenotipo similar de expresión de marcadores de células madre. Además, son capaces de crecer en condiciones no adherentes formando mamosferas en forma de racimo, con un fenotipo basal-mesenquimatoso.

Conclusión 4: Los tumores experimentales de IBC e IMC pueden desarrollarse independientemente del estatus hormonal del hospedador: las líneas celulares empleadas reproducen tumores y metastatizan no sólo en ratones hembras inmunodeprimidas, sino también en ratones macho, aunque la frecuencia de metástasis es significativamente menor en machos, en asociación con altas concentraciones de andrógenos intratumorales.

Conclusión 5: La técnica EIA de amplificación desarrollada y validada para la detección de las hormonas esteroides en medio de cultivo es precisa,

fiable y altamente sensible. Nos ha permitido demostrar que las dos líneas celulares de cáncer mamario inflamatorio canino y humano estudiadas, segregan hormonas esteroides (progesterona, sulfato de estrona, estradiol, androstenediona y testosterona) in vitro de forma semejante.

Conclusión final: Debido a las similitudes encontradas en el estudio de ambas líneas celulares (IPC-366 y SUM149) podemos afirmar que IPC-366 supone un gran modelo válido de investigación para el cáncer inflamatorio mamario humano y canino.

VIII. CONCLUSIONS

1. Conclusion 1: The new canine inflammatory mammary cancer cell line, IPC-366, is a triple negative cell line, that does not express the estrogen and progesterone receptors without overexpression of human epidermal growth factor (HER)-2. It is a basal epithelial-like cell line presenting a very aggressive and angiogenic phenotype with frequent occurrence of vasculogenic mimicry phenomenon.

Conclusion 2: IPC-366 presents rapid growth under *in vitro* conditions with a high proliferation index. Furthermore IPC-366 is highly tumorigenic and metastatic, reproducing tumors *in vivo* 2 weeks after inoculation of cells in SCID female mice and, frequently metastasizing to lung, liver and lymph nodes.

Conclusion 3: IPC-366 and SUM149 share many *in vitro* and *in vivo* characteristics. Both cell lines are triple-receptor negative and exhibit a very similar immunophenotype for the expression of stem cells markers. In addition, they are able to grow under non-adherent conditions forming mammospheres with a very similar basal-mesenchymal phenotype.

Conclusion 4: Experimental tumors from IBC and IMC cell lines can grow *in vivo* regardless of the hormonal status of the host: The IBC and IMC cell lines inoculated into male or female mice produce tumors and metastases in both sexes, although the rate of metastasis is significantly lower in male mice which may be associated with high intratumoral concentrations of androgens.

Conclusion 5: The utility of an amplified EIA assay for the detection of steroid hormones in culture media proved to be accurate, reliable, reproducible and highly sensitive. Hence, we were able to demonstrate that the canine

and human inflammatory breast cancer cell lines studied secrete steroid hormones (progesterone, estrone sulfate, estradiol, androstenedione and testosterone) *in vitro* in a similar manner.

Final conclusion: Due to the similarities found in the study of both cell lines (IPC-366 and SUM149), we can affirm that IPC-366 is a valid research model for human and canine inflammatory breast cancer.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, B.K., Fritz, P., McClellan, M., Hauptvogel, P., Athellogou, M., Brauch, H., 2005. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 1154-1159.
- Abraham, G.E., 1975. Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J Steroid Biochem* 6, 261-270.
- Agollah, G.D., Wu, G., Sevick-Muraca, E.M., Kwon, S., 2014. In vivo lymphatic imaging of a human inflammatory breast cancer model. *J Cancer* 5, 774-783.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernández, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- Alpaugh, M.L., Tomlinson, J.S., Shao, Z.M., Barsky, S.H., 1999. A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 59, 5079-5084.
- Alpaugh, M.L., Tomlinson, J.S., Ye, Y., Barsky, S.H., 2002. Relationship of sialyl-Lewis(x/a) underexpression and E-cadherin overexpression in the lymphovascular embolus of inflammatory breast carcinoma. *Am J Pathol* 161, 619-628.
- Anders, C.K., Carey, L.A., 2009. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 9 Suppl 2, S73-81.
- Anderson, E., 2002. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4, 197-201.

- Anderson, W.F., Schairer, C., Chen, B.E., Hance, K.W., Levine, P.H., 2005. Epidemiology of Inflammatory Breast Cancer (IBC). *Breast disease* 22, 9-23.
- Ando, S., De Amicis, F., Rago, V., Carpino, A., Maggiolini, M., Panno, M.L., Lanzino, M., 2002. Breast cancer: from estrogen to androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 193, 121-128.
- Angelo, L.S., Kurzrock, R., 2007. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clinical Cancer Research* 13, 2825-2830.
- Arias-Pulido, H., Chaher, N., Gong, Y., Qualls, C., Vargas, J., Royce, M., 2012. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer* 12, 298.
- Asseryanis, E., Ruecklinger, E., Hellan, M., Kubista, E., Singer, C.F., 2004. Breast cancer size in postmenopausal women is correlated with body mass index and androgen serum levels. *Gynecol Endocrinol* 18, 29-36.
- Aziz, S.A., Pervez, S., Khan, S., Kayani, N., Azam, S.I., Rahbar, M.H., 2001. Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast: a unique clinical experience. *Breast J* 7, 398-404.
- Baglietto, L., Severi, G., English, D.R., Krishnan, K., Hopper, J.L., McLean, C., Morris, H.A., Tilley, W.D., Giles, G.G., 2010. Circulating steroid hormone levels and risk of breast cancer for postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 492-502.

- Baldini, E., Gardin, G., Evagelista, G., Prochilo, T., Collecchi, P., Lionetto, R., 2004. Long-term results of combined-modality therapy for inflammatory breast carcinoma. *Clin Breast Cancer* 5, 358-363.
- Basu, G.D., Liang, W.S., Stephan, D.A., Wegener, L.T., Conley, C.R., Pockaj, B.A., Mukherjee, P., 2006. A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 8, R69.
- Bhadriraju, K., Chen, C.S., 2002. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today* 7, 612-620.
- Billich, A., Nussbaumer, P., Lehr, P., 2000. Stimulation of MCF-7 breast cancer cell proliferation by estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate: inhibition by novel non-steroidal steroid sulfatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73, 225-235.
- Birgersdotter, A., Sandberg, R., Ernberg, I., 2005. Gene expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 15, 405-412.
- Birrell, S.N., Hall, R.E., Tilley, W.D., 1998. Role of the androgen receptor in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 95-103.
- Blacking, T.M., Waterfall, M., Argyle, D.J., 2011. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 46-57.
- Blankenstein, M.A., van de Ven, J., Maitimu-Smeele, I., Donker, G.H., de Jong, P.C., Daroszewski, J., Szymczak, J., Milewicz, A., Thijssen, J.H., 1999. Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 293-297.

- Bocca, C., Levolella, M., Autelli, R., Motta, M., Mosso, L., Torchio, B., Bozzo, F., Cannito, S., Paternostro, C., Colombatto, S., Parola, M., Miglietta, A., 2014. Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. *Expert Opin Ther Targets* 18, 121-135.
- Borowsky, A.D., 2003. Genetically engineering a mouse. *Comp Med* 53, 249-250.
- Boussen, H., Cristofanilli, M., Zaks, T., DeSilvio, M., Salazar, V., Spector, N., 2010. Phase II study to evaluate the efficacy and safety of neoadjuvant lapatinib plus paclitaxel in patients with inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol* 28, 3248-3255.
- Boyle, P., 2012. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* 23 Suppl 6, vi7-12.
- Bradlow, H.L., Sepkovic, D.W., 2004. Steroids as procarcinogenic agents. *Ann NY Acad Sci* 1028, 216-232.
- Caceres, S., Peña, L., Monsalve, B., Illera, M.J., Díez-Prieto, I., Pérez-García, C., Lacerda, L., Larson, R.A., Gao, H., Debeb, B.G., Woodward, W.A., Reuben, J.M., Illera, J.C., 2015. Tumor growth progression in mice xenografts: comparison between cell lines of canine and human inflammatory breast cancer. In, 66th American Association for Laboratory Animal Science, Phoenix, USA, 631.
- Calloni, R., Cordero, E.A.A., Henriques, J.A.P., Bonatto, D., 2013. Reviewing and Updating the Major Molecular Markers for Stem Cells. *Stem Cells Dev* 22, 1455-1476.

- Camacho, L., 2011. Desarrollo de tres biomodelos de cáncer mamario canino en ratones SCID para el estudio comparativo del cáncer inflamatorio mamario. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología (Fisiología Animal). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria.
- Camacho, L., Peña, L., Gil, A.G., Martín-Ruíz, A., Dunner, S., Illera, J.C., 2014. Immunohistochemical vascular factor expression in canine inflammatory mammary carcinoma. *Vet Pathol* 51, 737-748.
- Camacho, L., Peña, L., González Gil, A., Caceres, S., Díez, L., Illera, J.C., 2013. Establishment and characterization of a canine xenograft model of inflammatory mammary carcinoma. *Res Vet Sci* 95, 1068-1075.
- Cardiff, R.D., Rosner, A., Hogarth, M.A., Galvez, J.J., Borowsky, A.D., Gregg, J.P., 2004. Validation: the new challenge for pathology. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 1, 31-39.
- Carneiro, G., Liu, I., Illera, J., Munro, C., 1998. Enzyme immunoassay for the measurement of estrone sulfate in cryptorchids, stallions and donkeys. *Proc Am Assoc Equine Practitioners* 44, 3-4.
- Catalano, S., Barone, I., Giordano, C., Rizza, P., Qi, H.Y., Gu, G.W., Malivindi, R., Bonofiglio, D., Ando, S., 2009. Rapid Estradiol/ER alpha Signaling Enhances Aromatase Enzymatic Activity in Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 23, 1634-1645.
- Centro Nacional de Microscopia Electrónica. Figura 17 tomada de www.cnme.es
- Chang, C.Y., Chiou, P.P., Chen, W.J., Li, Y.H., Yiu, J.C., Cheng, Y.H., Chen, S.D., Lin, C.T., Lai, Y.S., 2010. Assessment of the tumorigenesis and

- drug susceptibility of three new canine mammary tumor cell lines. *Res Vet Sci* 88, 285-293.
- Chang, S.H., Liu, C.H., Conway, R., Han, D.K., Nithipatikom, K., Trifan, O.C., Lane, T.F., Hla, T., 2004. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 591-596.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Lovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M.S., 2009. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 69, 1302-1313.
- Charles River. Figura 8 tomada de www.criver.com
- Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S., 2010. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* 32, 35-48.
- Chen, A., Beetham, H., Black, M.A., Priya, R., Telford, B.J., Guest, J., Wiggins, G.A., Godwin, T.D., Yap, A.S., Guilford, P.J., 2014. E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 14, 552.
- Chetrite, G.S., Cortes-Prieto, J., Philippe, J.C., Wright, F., Pasqualini, J.R., 2000. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72, 23-27.

- Clemente, M., De Andrés, P.J., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., 2009. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet Rec* 165, 78-81.
- Clemente, M., Pérez-Alenza, M., Peña, L., 2010a. Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *J Comp Pathol* 143, 157-163.
- Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L., 2010b. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol* 47, 265-274.
- Clemente, M., Sánchez-Archidona, A.R., Sardón, D., Díez, L., Martín-Ruíz, A., Caceres, S., Sassi, F., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Dunner, S., Peña, L., 2013. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *Vet J* 197, 427-432.
- Cochrane, D.R., Bernales, S., Jacobsen, B.M., Cittelly, D.M., Howe, E.N., D'Amato, N.C., Spoelstra, N.S., Edgerton, S.M., Jean, A., Guerrero, J., Gomez, F., Medicherla, S., Alfaro, I.E., McCullagh, E., Jedlicka, P., Torkko, K.C., Thor, A.D., Elias, A.D., Protter, A.A., Richer, J.K., 2014. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Research* 16: 1-19.
- Cocola, C., Anastasi, P., Astigiano, S., Piscitelli, E., Pelucchi, P., Vilaro, L., Bertoli, G., Beccaglia, M., Veronesi, M.C., Sanzone, S., Barbieri, O., Reinbold, R.A., Luvoni, G.C., Zucchi, I., 2009. Isolation of canine

- mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2, 214-217.
- Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J.S., Leitao, D., Amendoeira, I., Schmitt, F.C., 2002. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 55, 429-434.
- Creighton, C.J., Chang, J.C., Rosen, J.M., 2010. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 253-260.
- Cristofanilli, M., Gonzalez-Angulo, A.M., Buzdar, A.U., Kau, S.W., Frye, D.K., Hortobagyi, G.N., 2004. Paclitaxel improves the prognosis in estrogen receptor negative inflammatory breast cancer: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Clin Breast Cancer* 4, 415-419.
- Dawood, S., Merajver, S.D., Viens, P., Vermeulen, P.B., Swain, S.M., Buchholz, T.A., Dirix, L.Y., Levine, P.H., Lucci, A., Krishnamurthy, S., Robertson, F.M., Woodward, W.A., Yang, W.T., Ueno, N.T., Cristofanilli, M., 2011. International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. *Ann Oncol* 22, 515-523.
- De Andrés, P.J., Caceres, S., Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L., 2016. Profile of Steroid Receptors and Increased Aromatase Immunoexpression in Canine Inflammatory Mammary Cancer as a Potential Therapeutic Target. *Reprod Domest Anim* 51, 269-275.
- de Andrés, P.J., Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L., 2010. Molecular- based Tumour Subtypes of Canine Inflammatory Mammary

- Cancer. In, 2nd Internacional Inflammatory Breast Cancer Conference, Marseille, France.
- de Jong, M., Maina, T., 2010. Of mice and humans: are they the same?-- Implications in cancer translational research. *J Nucl Med* 51, 501-504.
- De M. Souza, C.H., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A., Tobias, K.M., 2009. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J* 50, 506-510.
- De Pradip, C.J., Brian, L.-J., Nandini, D., 2013. Wnt- β -Catenin Pathway Regulates Vascular Mimicry in Triple Negative Breast Cancer. *J Cytol Histol* 4: 198.
- Dey, D., Saxena, M., Paranjape, A.N., Krishnan, V., Giraddi, R., Kumar, M.V., Mukherjee, G., Rangarajan, A., 2009. Phenotypic and Functional Characterization of Human Mammary Stem/Progenitor Cells in Long Term Culture. *PloS one* 4.
- Dome, B., Hendrix, M.J., Paku, S., Tovari, J., Timar, J., 2007. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170, 1-15.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., Wicha, M.S., 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17, 1253-1270.
- Dorgan, J.F., Stanczyk, F.Z., Longcope, C., Stephenson, H.E., Chang, L., Miller, R., Franz, C., Falk, R.T., Kahle, L., 1997. Relationship of serum dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and 5-androstene-3

- beta,17 beta-diol to risk of breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Epidem Biomar* 6, 177-181.
- Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L., 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 12, 207-218.
- Esfahlan, R.J., Zarghami, N., Esfahlan, A.J., Mollazadeh, M., Nejati, K., Nasiri, M., 2011. The Possible Impact of Obesity on Androgen, Progesterone and Estrogen Receptors (ERalpha and ERbeta) Gene Expression in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer (Auckl)* 5, 227-237.
- Fantozzi, A., Christofori, G., 2006. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 8, 212.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
- Fernandez, S.V., Robertson, F.M., Pei, J., Aburto-Chumpitaz, L., Mu, Z., Chu, K., Alpaugh, R.K., Huang, Y., Cao, Y., Ye, Z., Cai, K.Q., Boley, K.M., Klein-Szanto, A.J., Devarajan, K., Addya, S., Cristofanilli, M., 2013. Inflammatory breast cancer (IBC): clues for targeted therapies. *Breast Cancer Res Treat* 140, 23-33.
- Figueroa, F.C., Zanetti, J.d.S., Ribeiro-Silva, A., Fonseca-Alves, C.E., Rocha, N.S., 2015. Association of CD44+/CD24-Cells to More Aggressive Molecular Phenotypes in Canine Mammary Carcinomas. *Int J Cancer Res* 11, 119-127.

- Folberg, R., Hendrix, M.J., Maniotis, A.J., 2000. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156, 361-381.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E., Reis-Filho, J.S., 2010. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363, 1938-1948.
- Fuxe, J., Vincent, T., Garcia de Herreros, A., 2010. Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* 9, 2363-2374.
- Gadalla, S.E., Ojemalm, K., Vasquez, P.L., Nilsson, I., Ericsson, C., Zhao, J., Nister, M., 2013. EpCAM associates with endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (ERAP2) in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 439, 203-208.
- Gama, A., Alves, A., Schmitt, F., 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* 453, 123-132.
- Garay, J.P., Park, B.H., 2012. Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. *Am J Cancer Res* 2, 434-445.
- Gentschev, I., Stritzker, J., Hofmann, E., Weibel, S., Yu, Y.A., Chen, N., Zhang, Q., Bullerdiek, J., Nolte, I., Szalay, A.A., 2009. Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther* 16, 320-328.
- Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T., 1952. Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. *Cancer Research* 12, 264-265.

- Gil-Loyzaga, P.E., 2011. Cultivo de células animales and humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Vision Libros, España.
- Giordano, S.H., Hortobagyi, G.N., 2003. Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. *Breast Cancer Res* 5, 284-288.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 48, 117-131.
- Gong, Y., 2008. Pathologic aspects of inflammatory breast cancer: Part 2. Biologic insights into its aggressive phenotype. *Seminars in Oncology* 35, 33-40.
- Gong, Y., Wei, W., Wu, Y., Ueno, N.T., Huo, L., 2014. Expression of androgen receptor in inflammatory breast cancer and its clinical relevance. *Cancer* 120, 1775-1779.
- Gracanin, A., Timmermans-Sprang, E.P., van Wolferen, M.E., Rao, N.A., Grizelj, J., Vince, S., Hellmen, E., Mol, J.A., 2014. Ligand-independent canonical Wnt activity in canine mammary tumor cell lines associated with aberrant LEF1 expression. *PloS one* 9, e98698.
- Grace, P.B., Taylor, J.I., Low, Y.L., Luben, R.N., Mulligan, A.A., Botting, N.P., Dowsett, M., Welch, A.A., Khaw, K.T., Wareham, N.J., Day, N.E., Bingham, S.A., 2004. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective investigation of cancer and nutrition-norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 698-708.

- Greene, F.L., Balch, C.M., Fleming, I.D., Fritz, A., Haller, D.G., Morrow, M., Page, D.L., 2002. AJCC cancer staging handbook: TNM classification of malignant tumors. Springer, New York, USA.
- Grigoryev, D.N., Long, B.J., Njar, V.C., Brodie, A.H., 2000. Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth via the mutated androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75, 1-10.
- Grimshaw, M.J., Cooper, L., Papazisis, K., Coleman, J.A., Bohnenkamp, H.R., Chiapero-Stanke, L., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J.M., 2008. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 10, R52.
- Hanamura, T., Niwa, T., Nishikawa, S., Konno, H., Gohno, T., Tazawa, C., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Takeji, H., Yamaguchi, Y., Ito, K., Hayashi, S., 2013. Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor-positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism. *Breast Cancer Res Treat* 139, 731-740.
- Hance, K.W., Anderson, W.F., Devesa, S.S., Young, H.A., Levine, P.H., 2005. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 966-975.
- Heatley, M., Whiteside, C., Maxwell, P., Toner, P., 1993. Vimentin expression in benign and malignant breast epithelium. *J Clin Pathol* 46, 441-445.
- Hennessy, B.T., Gonzalez-Angulo, A.M., Hortobagyi, G.N., Cristofanilli, M., Kau, S.W., Broglio, K., Fornage, B., Singletary, S.E., Sahin, A., Buzdar, A.U., Valero, V., 2006. Disease-free and overall survival after pathologic complete disease remission of cytologically proven inflammatory breast

- carcinoma axillary lymph node metastases after primary systemic chemotherapy. *Cancer* 106, 1000-1006.
- Hickey, T.E., Robinson, J.L., Carroll, J.S., Tilley, W.D., 2012. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol* 26, 1252-1267.
- Hicklin, D.J., Ellis, L.M., 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23, 1011-1027.
- Hill, P., Garbaczewski, L., Kasumi, F., 1985. Plasma testosterone and breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21, 1265-1266.
- Hiraguri, S., Godfrey, T., Nakamura, H., Graff, J., Collins, C., Shayesteh, L., Doggett, N., Johnson, K., Wheelock, M., Herman, J., Baylin, S., Pinkel, D., Gray, J., 1998. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 58, 1972-1977.
- Hoffmeyer, M.R., Wall, K.M., Dharmawardhane, S.F., 2005. In vitro analysis of the invasive phenotype of SUM 149, an inflammatory breast cancer cell line. *Cancer Cell Int* 5.
- Holliday, D.L., Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 13, 215.
- Howe, L.R., 2007. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res* 9, 210.
- Hsiao, Y.L., Hsieh, T.Z., Liou, C.J., Cheng, Y.H., Lin, C.T., Chang, C.Y., Lai, Y.S., 2014. Characterization of protein marker expression,

- tumorigenicity, and doxorubicin chemoresistance in two new canine mammary tumor cell lines. *BMC Vet Res* 10, 229.
- Hu, K., Law, J.H., Fotovati, A., Dunn, S.E., 2012. Small interfering RNA library screen identified polo-like kinase-1 (PLK1) as a potential therapeutic target for breast cancer that uniquely eliminates tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res* 14, R22.
- Iglesias, J.M., Beloqui, I., Garcia-Garcia, F., Leis, O., Vazquez-Martin, A., Eguiara, A., Cufi, S., Pavon, A., Menendez, J.A., Dopazo, J., Martin, A.G., 2013. Mammosphere Formation in Breast Carcinoma Cell Lines Depends upon Expression of E-cadherin. *PloS one* 8.
- Illera, J.C., Lorenzo, P.L., Silván, G., Munro, C.J., Illera, M.J., Illera, M., 1997. Enzyme immunoassay for testosterone and androstenedione in culture medium from rabbit oocytes matured in vitro. *Theriogenol* 47, 1375-1388.
- Illera, J.C., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A., Jiménez, M.A., Silván, G., Dunner, S., Peña, L., 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 71, 541-548.
- Im, K.S., Kim, N.H., Lim, H.Y., Kim, H.W., Shin, J.I., Sur, J.H., 2014. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol* 51, 549-559.
- International Mycotherapy Institute. Figura 2 tomada de www.imispain.com
- Irollo, E., Pirozzi, G., 2013. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res* 5, 563-581.
- Jaggupilli, A., Elkord, E., 2012. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clin Dev Immunol.*

- Jenkins, D.E., Hornig, Y.S., Oei, Y., Dusich, J., Purchio, T., 2005. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* 7, R444-454.
- Jensen, J., Kitlen, J.W., Briand, P., Labrie, F., Lykkesfeldt, A.E., 2003. Effect of antiestrogens and aromatase inhibitor on basal growth of the human breast cancer cell line MCF-7 in serum-free medium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84, 469-478.
- Jerry, D.J., Kittrell, F.S., Kuperwasser, C., Laucirica, R., Dickinson, E.S., Bonilla, P.J., Butel, J.S., Medina, D., 2000. A mammary-specific model demonstrates the role of the p53 tumor suppressor gene in tumor development. *Oncogene* 19, 1052-1058.
- Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Islam, O., Kodama, E., Yamamoto, A., Nakanishi, Y., Arita, N., Yamasaki, M., Okano, H., Hara, M., Miyake, J., 2002. Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res* 69, 869-879.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., Weinberg, R.A., 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-U554.
- Kawabata, A., Yamamoto, K., Lan, N.T., Uchida, K., Yamaguchi, R., Hayashi, T., Tateyama, S., 2006. Establishment and characterization of a cell line, MCO-Y4, derived from canine mammary gland osteosarcoma. *J Vet Med Sci* 68, 1047-1053.

- Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., Gray, J.W., Bissell, M.J., 2007. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 1, 84-96.
- Key, T.J., Appleby, P.N., Reeves, G.K., Roddam, A., Dorgan, J.F., Longcope, C., Stanczyk, F.Z., Stephenson, H.E., Jr., Falk, R.T., Miller, R., Schatzkin, A., Allen, D.S., Fentiman, I.S., Key, T.J., Wang, D.Y., Dowsett, M., Thomas, H.V., Hankinson, S.E., Toniolo, P., Akhmedkhanov, A., Koenig, K., Shore, R.E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Berrino, F., Muti, P., Micheli, A., Krogh, V., Sieri, S., Pala, V., Venturelli, E., Secreto, G., Barrett-Connor, E., Laughlin, G.A., Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R.G., Neriishi, K., Land, C.E., Cauley, J.A., Kuller, L.H., Cummings, S.R., Helzlsouer, K.J., Alberg, A.J., Bush, T.L., Comstock, G.W., Gordon, G.B., Miller, S.R., Longcope, C., Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative, G., 2003. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Nat Cancer Inst* 95, 1218-1226.
- Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M.B., Dwarakanath, B.S., 2006. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J Transl Med* 4.
- Killinger, D.W., Perel, E., Daniilescu, D., Kharlip, L., Blackstein, M.E., 1987. Aromatase activity in the breast and other peripheral tissues and its therapeutic regulation. *Steroids* 50, 523-536.

- Kim, J.B., 2005. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 15, 365-377.
- Kim, J.H., Im, K.S., Kim, N.H., Chon, S.K., Doster, A.R., Sur, J.H., 2011. Inflammatory mammary carcinoma with metastasis to the brain and distant organs in a spayed Shih Tzu dog. *J Vet Diagn Invest* 23, 1079-1082.
- Kim, N.H., Lim, H.Y., Im, K.S., Kim, J.H., Sur, J.H., 2013. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Pathol* 148, 298-306.
- Kimura, M., Hagiwara, S., Hirose, K., Shimokawa, Y., Iwai, K., Uemura, K., 1994. Two cases of advanced breast cancer effectively treated with chemoendocrine therapy and radiotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 21, 2505-2508.
- Kleer, C.G., van Golen, K.L., Braun, T., Merajver, S.D., 2001. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol* 14, 458-464.
- Kleer, C.G., van Golen, K.L., Merajver, S.D., 2000. Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Res* 2, 423-429.
- Kleer, C.G., Zhang, Y., Pan, Q., Gallagher, G., Wu, M., Wu, Z.F., Merajver, S.D., 2004. WISP3 and RhoC guanosine triphosphatase cooperate in the development of inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res* 6, R110-115.

- Kleer, C.G., Zhang, Y., Pan, Q., van Golen, K.L., Wu, Z.F., Livant, D., Merajver, S.D., 2002. WISP3 is a novel tumor suppressor gene of inflammatory breast cancer. *Oncogene* 21, 3172-3180.
- Klopp, A.H., Lacerda, L., Gupta, A., Debeb, B.G., Solley, T., Li, L., Spaeth, E., Xu, W., Zhang, X., Lewis, M.T., Reuben, J.M., Krishnamurthy, S., Ferrari, M., Gaspar, R., Buchholz, T.A., Cristofanilli, M., Marini, F., Andreeff, M., Woodward, W.A., 2010. Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. *PLoS one* 5, e12180.
- Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Sarkar, F.H., 2011. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers (Basel)* 3, 716-729.
- Korkaya, H., Paulson, A., Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Brown, M., Dutcher, J., Clouthier, S.G., Wicha, M.S., 2009. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* 7, e1000121.
- Kotsopoulos, J., Narod, S.A., 2012. Androgens and breast cancer. *Steroids* 77, 1-9.
- Kowanetz, M., Ferrara, N., 2006. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 12, 5018-5022.
- Kraan, J., van den Broek, P., Verhoef, C., Grunhagen, D.J., Taal, W., Gratama, J.W., Sleijfer, S., 2014. Endothelial CD276 (B7-H3) expression is increased in human malignancies and distinguishes between normal and tumour-derived circulating endothelial cells. *Br J Cancer* 111, 149-156.

- Kristensen, V.N., Borresen-Dale, A.L., 2000. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutat Res* 462, 323-333.
- Labrie, F., 2015. All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol* 145, 133-138.
- Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Belanger, A., Simard, J., Lin, S.X., Pelletier, G., 2003. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev* 24, 152-182.
- Lacroix, M., Leclercq, G., 2004. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83, 249-289.
- Lapointe, J., Fournier, A., Richard, V., Labrie, C., 1999. Androgens down-regulate BCL-2 protooncogene expression in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Endocrinology* 140, 416-421.
- Lasfargues, E.Y., Ozzello, L., 1958. Cultivation of Human Breast Carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 21, 1131-1147.
- Le, M.G., Arriagada, R., Bahi, J., Pfeiffer, F., Cammoun, M., Tabbane, F., Rubino, C., 2006. Are risk factors for breast cancer similar in women with inflammatory breast cancer and in those with non-inflammatory breast cancer? *Breast* 15, 355-362.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., Pietsenpol, J.A., 2011. Identification of human triple-negative

- breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750-2767.
- Lelekakis, M., Moseley, J.M., Martin, T.J., Hards, D., Williams, E., Ho, P., Lowen, D., Javni, J., Miller, F.R., Slavin, J., Anderson, R.L., 1999. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 17, 163-170.
- Liao, D.J., Dickson, R.B., 2002. Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 175-189.
- Lipton, A., 1987. The anti-oestrogen tamoxifen is a calcium antagonist in perfused rat mesentery. *Cancer Chemother Pharmacol* 20, 125-127.
- Lombaerts, M., van Wezel, T., Philippo, K., Dierssen, J.W., Zimmerman, R.M., Oosting, J., van Eijk, R., Eilers, P.H., van de Water, B., Cornelisse, C.J., Cleton-Jansen, A.M., 2006. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 94, 661-671.
- Luo, H., Chen, Z., Jin, H., Zhuang, M., Wang, T., Su, C., Lei, Y., Zou, J., Zhong, B., 2011. Cyclooxygenase-2 up-regulates vascular endothelial growth factor via a protein kinase C pathway in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 6.
- Macedo, L.F., Guo, Z., Tilghman, S.L., Sabnis, G.J., Qiu, Y., Brodie, A., 2006. Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole. *Cancer Res* 66, 7775-7782.

- Mady, E.A., Ramadan, E.E., Ossman, A.A., 2000. Sex steroid hormones in serum and tissue of benign and malignant breast tumor patients. *Dis Markers* 16, 151-157.
- Magalhaes, G.M., Terra, E.M., de Oliveira Vasconcelos, R., de Barros Bandarra, M., Moreira, P.R., Rosolem, M.C., Alessi, A.C., 2013. Immunodetection of cells with a CD44+/CD24- phenotype in canine mammary neoplasms. *BMC Vet Res* 9, 205.
- Majchrzak, K., Lo Re, D., Gajewska, M., Bulkowska, M., Homa, A., Pawlowski, K., Motyl, T., Murphy, P.V., Krol, M., 2013. Migrastatin analogues inhibit canine mammary cancer cell migration and invasion. *PloS one* 8, e76789.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., Weinberg, R.A., 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.
- Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., Hendrix, M.J., 1999. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-752.

- Markosyan, N., Chen, E.P., Evans, R.A., Ndong, V., Vonderheide, R.H., Smyth, E.M., 2013. Mammary carcinoma cell derived cyclooxygenase 2 suppresses tumor immune surveillance by enhancing intratumoral immune checkpoint activity. *Breast Cancer Res* 15, R75.
- Martínez-Carpio, P.A., Navarro Moreno, M.A., 2003. Growth factors, cell damage, cyclin-dependent kinases and their inhibitors: relevance in molecular pathology of human cancer. *Med Clin (Barc)* 120, 265-271.
- Mason, G., Johnson, O., 2008. Inflammatory breast cancer: patient advocate view. *Seminars in oncology* 35, 87-91.
- Masuda, H., Baggerly, K.A., Wang, Y., Iwamoto, T., Brewer, T., Pusztai, L., Kai, K., Kogawa, T., Finetti, P., Birnbaum, D., Dirix, L., Woodward, W.A., Reuben, J.M., Krishnamurthy, S., Symmans, W., Van Laere, S.J., Bertucci, F., Hortobagyi, G.N., Ueno, N.T., 2013. Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancers. *Breast Cancer Res* 15, R112.
- McNamara, K.M., Sasano, H., 2015. The intracrinology of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 145, 172-178.
- McNamara, K.M., Yoda, T., Miki, Y., Chanplakorn, N., Wongwaisayawan, S., Incharoen, P., Kongdan, Y., Wang, L., Takagi, K., Mayu, T., Nakamura, Y., Suzuki, T., Nemoto, N., Miyashita, M., Tamaki, K., Ishida, T., Ohuchi, N., Sasano, H., 2013. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: its correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Sci* 104, 639-646.
- McNamara, K.M., Yoda, T., Nurani, A.M., Shibahara, Y., Miki, Y., Wang, L., Nakamura, Y., Suzuki, K., Yang, Y., Abe, E., Hirakawa, H., Suzuki, T.,

- Nemoto, N., Miyashita, M., Tamaki, K., Ishida, T., Brown, K.A., Ohuchi, N., Sasano, H., 2014. Androgenic pathways in the progression of triple-negative breast carcinoma: a comparison between aggressive and non-aggressive subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 145, 281-293.
- Mego, M., Mani, S.A., Lee, B.N., Li, C., Evans, K.W., Cohen, E.N., Gao, H., Jackson, S.A., Giordano, A., Hortobagyi, G.N., Cristofanilli, M., Lucci, A., Reuben, J.M., 2012. Expression of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy. *Internat J Cancer* 130, 808-816.
- Michishita, M., Akiyoshi, R., Yoshimura, H., Katsumoto, T., Ichikawa, H., Ohkusu-Tsukada, K., Nakagawa, T., Sasaki, N., Takahashi, K., 2011. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res Vet Sci* 91, 254-260.
- Millanta, F., Caneschi, V., Ressel, L., Citi, S., Poli, A., 2010. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *J Comp Pathol* 142, 36-42.
- Moe, L., 2001. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil* 57, 439-443.
- Mohammed, R.A., Green, A., El-Shikh, S., Paish, E.C., Ellis, I.O., Martin, S.G., 2007. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 96, 1092-1100.
- Mol, J.A., Lantinga-van Leeuwen, I.S., van Garderen, E., Selman, P.J., Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A., Schalken, J.A., Rijnberk, A., 1999.

- Mammary growth hormone and tumorigenesis--lessons from the dog. *Vet Q* 21, 111-115.
- Mol, J.A., van Garderen, E., Rutteman, G.R., Rijnberk, A., 1996. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: Induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57, 67-71.
- Morris, G.J., Naidu, S., Topham, A.K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., Schwartz, G.F., Park, P.K., Rosenberg, A.L., Brill, K., Mitchell, E.P., 2007. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 110, 876-884.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Moynahan, M.E., 2002. The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. *Oncogene* 21, 8994-9007.
- Munro, C.J., Lasley, B.L., 1988. Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. *Prog Clin Biol Res* 285, 289-329.
- Nadal, R., Ortega, F.G., Salido, M., Lorente, J.A., Rodriguez-Rivera, M., Delgado-Rodriguez, M., Macia, M., Fernandez, A., Corominas, J.M., Garcia-Puche, J.L., Sanchez-Rovira, P., Sole, F., Serrano, M.J., 2013. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients:

- potential role in resistance to chemotherapy. *Intl J Cancer* 133, 2398-2407.
- Naderi, A., Chia, K.M., Liu, J., 2011. Synergy between inhibitors of androgen receptor and MEK has therapeutic implications in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 13, R36.
- Namba, R., Maglione, J.E., Young, L.J., Borowsky, A.D., Cardiff, R.D., MacLeod, C.L., Gregg, J.P., 2004. Molecular characterization of the transition to malignancy in a genetically engineered mouse-based model of ductal carcinoma in situ. *Mol Cancer Res* 2, 453-463.
- Ness, M., 2009. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer. *Vet Rec* 165, 272; author reply 272.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.L., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., Gray, J.W., 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515-527.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massague, J., 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M., Castaño, M., 2000. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37, 239-247.

- Ohshiro, K., Schwartz, A.M., Levine, P.H., Kumar, R., 2012. Alternate Estrogen Receptors Promote Invasion of Inflammatory Breast Cancer Cells via Non-Genomic Signaling. *PloS one* 7.
- Pang, L.Y., Gatenby, E.L., Kamida, A., Whitelaw, B.A., Hupp, T.R., Argyle, D.J., 2014. Global gene expression analysis of canine osteosarcoma stem cells reveals a novel role for COX-2 in tumour initiation. *PloS one* 9, e83144.
- Paradiso, A., Tommasi, S., Brandi, M., Marzullo, F., Simone, G., Lorusso, V., Mangia, A., De Lena, M., 1989. Cell kinetics and hormonal receptor status in inflammatory breast carcinoma. Comparison with locally advanced disease. *Cancer* 64, 1922-1927.
- Parrett, M.L., Harris, R.E., Joarder, F.S., Ross, M.S., Clausen, K.P., Robertson, F.M., 1997. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 10, 503-507.
- Pasqualini, J.R., 2009. Progestins in the menopause in healthy women and breast cancer patients. *Maturitas* 62, 343-348.
- Pasqualini, J.R., Chetrite, G., 2001. Paradoxical effect of estradiol: it can block its own bioformation in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 21-24.
- Pasqualini, J.R., Chetrite, G., Nestour, E.L., 1996. Control and expression of oestrone sulphatase activities in human breast cancer. *J Endocrinol* 150 Suppl, S99-105.
- Patriarca, C., Macchi, R.M., Marschner, A.K., Mellstedt, H., 2012. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treat Rev* 38, 68-75.

- Pawlak, K.J., Zhang, G., Wiebe, J.P., 2005. Membrane 5 alpha-pregnane-3,20-dione (5 alpha P) receptors in MCF-7 and MCF-10A breast cancer cells are up-regulated by estradiol and 5 alpha P and down-regulated by the progesterone metabolites, 3 alpha-dihydroprogesterone and 20 alpha-dihydroprogesterone, with associated changes in cell proliferation and detachment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, 278-288.
- Pawlowski, K.M., Krol, M., Majewska, A., Badowska-Kozakiewicz, A., Mol, J.A., Malicka, E., Motyl, T., 2009. Comparison of cellular and tissue transcriptional profiles in canine mammary tumor. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 1, 85-94.
- Peña, L., De Andrés, P.J., Clemente, M., Cuesta, P., Pérez-Alenza, M.D., 2013. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol* 50, 94-105.
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Diez, L., Gartner, F., Hellmen, E., Kiupel, M., Millan, Y., Miller, M.A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V., de las Mulas, J.M., 2014. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER-2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol* 51, 127-145.
- Peña, L., Nieto, A., Pérez-Alenza, M.D., Cuesta, P., Castaño, M., 1998. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary

- tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 10, 237-246.
- Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Rodríguez-Bertos, A., Nieto, A., 2003a. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 78, 141-148.
- Peña, L., Silván, G., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A., Illera, J.C., 2003b. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84, 211-216.
- Pérez Alenza, M.D., Tabanera, E., Peña, L., 2001. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Ass* 219, 1110-1114.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Phillips, T.M., McBride, W.H., Pajonk, F., 2006. The response of CD24(-/low)/CD44(+) breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 98, 1777-1785.
- Planas-Silva, M.D., Waltz, P.K., 2007. Estrogen promotes reversible epithelial-to-mesenchymal-like transition and collective motility in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 11-21.
- Poels, L.G., Jap, P.H.K., Ramaekers, F.F.C.S., Scheres, J.M.J.C., Thomas, C.M.G., Vooijs, P.G., Croes, H.J.E., Mungyer, G., 1989.

- Characterization of a Hormone-Producing Ovarian-Carcinoma Cell-Line. *Gynecol Oncol* 32, 203-214.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., Daidone, M.G., 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65, 5506-5511.
- Prost, S., Le, M.G., Douc-Rasy, S., Ahomadegbe, J.C., Spielmann, M., Guerin, M., Riou, G., 1994. Association of c-ERBB2-gene amplification with poor prognosis in non-inflammatory breast carcinomas but not in carcinomas of the inflammatory type. *Intl J Cancer* 58, 763-768.
- Purohit, A., Woo, L.W., Potter, B.V., 2011. Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 340, 154-160.
- Qiao, L.L., Liang, N., Zhang, J.D., Xie, J., Liu, F.J., Xu, D.G., Yu, X.S., Tian, Y., 2015. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med* 19, 315-326.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., González-Gil, A., Silván, G., Peña, L., Illera, J.C., 2015. Quantification of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tumours by ELISA assay: clinical and prognostic implications. *Vet Comp Oncol*.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silván, G., Peña, L., Lopes, C., Illera, J.C., 2005a. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res* 25, 4269-4275.

- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silván, G., Peña, L., Lopes, C., Illera, J.C., 2005b. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 181-187.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L., Lopes, C.S., 2010. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res Vet Sci* 88, 441-445.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Parente, M., Gregorio, H., Lopes, C.S., 2011. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Vet J* 189, 77-82.
- Raposo, T.P., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F.L., Argyle, D.J., 2016. Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. *Vet Comp Oncol*.
- Reddy, K.B., 2011. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol* 18, e173-179.
- Ricardo, S., Vieira, A.F., Gerhard, R., Leitao, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J.F., Milanezi, F., Schmitt, F., Paredes, J., 2011. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol* 64, 937-946.
- Riou, G., Le, M.G., Travagli, J.P., Levine, A.J., Moll, U.M., 1993. Poor prognosis of p53 gene mutation and nuclear overexpression of p53 protein in inflammatory breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85, 1765-1767.
- Robertson, F.M., Bondy, M., Yang, W., Yamauchi, H., Wiggins, S., Kamrudin, S., Krishnamurthy, S., Le-Petross, H., Bidaut, L., Player, A.N., Barsky, S.H., Woodward, W.A., Buchholz, T., Lucci, A., Ueno, N.T., Cristofanilli,

- M., 2010. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin* 60, 351-375.
- Robertson, F.M., Simeone, A.M., Mazumdar, A., Shah, A.H., McMurray, J.S., Ghosh, S., Cristofanilli, M., 2008. Molecular and pharmacological blockade of the EP4 receptor selectively inhibits both proliferation and invasion of human inflammatory breast cancer cells. *J Exp Ther Oncol* 7, 299-312.
- Roy, S.S., Vadlamudi, R.K., 2012. Role of Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Metastasis. *Intl J Breast Cancer* 2012, 8.
- Ruggeri, B.A., Camp, F., Miknyoczki, S., 2014. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol* 87, 150-161.
- Russo, J., Russo, I.H., 2006. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 89-96.
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., Romero, L., 2015. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PloS one* 10, e0127381.
- Sánchez-Archidona, A.R., Jiménez, M.A., Pérez-Alenza, D., Silván, G., Illera, J.C., Peña, L., Dunner, S., 2007. Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 93-99.
- Santen, R.J., Manni, A., Harvey, H., Redmond, C., 1990. Endocrine Treatment of Breast-Cancer in Women. *Endocrine Reviews* 11, 221-265.

- Sasano, H., Nagura, H., Harada, N., Goukon, Y., Kimura, M., 1994. Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders. *Hum Pathol* 25, 530-535.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G., 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res* 6, 5.
- Secky, L., Svoboda, M., Klameth, L., Bajna, E., Hamilton, G., Zeillinger, R., Jager, W., Thalhammer, T., 2013. The sulfatase pathway for estrogen formation: targets for the treatment and diagnosis of hormone-associated tumors. *J Drug Deliv* 2013, 957605.
- Secreto, G., Toniolo, P., Berrino, F., Recchione, C., Cavalleri, A., Pisani, P., Totis, A., Fariselli, G., Di Pietro, S., 1991. Serum and urinary androgens and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Res* 51, 2572-2576.
- Shan, L., Wang, S., Korotcov, A., Sridhar, R., Wang, P.C., 2008. Bioluminescent animal models of human breast cancer for tumor biomass evaluation and metastasis detection. *Ethn Dis* 18, S2-65–S62-69.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R.K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C.H., Goulet, R., Badve, S., Nakshatri, H., 2006. CD44(+)/CD24(-) breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8.
- Shevde, L.A., Metge, B.J., Mitra, A., Xi, Y., Ju, J., King, J.A., Samant, R.S., 2010. Spheroid-forming subpopulation of breast cancer cells

- demonstrates vasculogenic mimicry via HSA-MIR-299-5p regulated de novo expression of osteopontin. *J Cell Mol Med* 14, 1693-1706.
- Shibuya, R., Suzuki, T., Miki, Y., Yoshida, K., Moriya, T., Ono, K., Akahira, J., Ishida, T., Hirakawa, H., Evans, D.B., Sasano, H., 2008. Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast. *Endocr Relat Cancer* 15, 113-124.
- Shipitsin, M., Campbell, L.L., Argani, P., Werernowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., Halushka, M.K., Sukumar, S., Parker, L.M., Anderson, K.S., Harris, L.N., Garber, J.E., Richardson, A.L., Schnitt, S.J., Nikolsky, Y., Gelman, R.S., Polyak, K., 2007. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 11, 259-273.
- Shirakawa, K., Kobayashi, H., Sobajima, J., Hashimoto, D., Shimizu, A., Wakasugi, H., 2003. Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 5, 136-139.
- Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., Wakasugi, H., 2001. Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 61, 445-451.
- Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., Konishi, F., 2002. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* 99, 821-828.

- Shyamala, G., Chou, Y.C., Louie, S.G., Guzman, R.C., Smith, G.H., Nandi, S., 2002. Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 137-148.
- Silvan, G., Illera, J.C., Illera, M., 1993. Determination of follicular fluid estradiol levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *Steroids* 58, 324-329.
- Simpson, E.R., Davis, S.R., 2001. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology* 142, 4589-4594.
- Singletery, S.E., Cristofanilli, M., 2008. Defining the Clinical Diagnosis of Inflammatory Breast Cancer. *Seminars in oncology* 35, 7-10.
- Sleeckx, N., de Rooster, H., Kroeze, E.J.B.V., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L., 2011. Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reprod Dom Anim* 46, 1112-1131.
- Smart, C.E., Morrison, B.J., Saunus, J.M., Vargas, A.C., Keith, P., Reid, L., Wockner, L., Askarian-Amiri, M., Sarkar, D., Simpson, P.T., Clarke, C., Schmidt, C.W., Reynolds, B.A., Lakhani, S.R., Lopez, J.A., 2013. In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. *PloS one* 8, e64388.
- Sonne-Hansen, K., Lykkesfeldt, A.E., 2005. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 25-34.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H., 2011. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical

- Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet Pathol* 48, 85-97.
- Stuart-Harris, R., Caldas, C., Pinder, S.E., Pharoah, P., 2008. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 17, 323-334.
- Sturgeon, S.R., Potischman, N., Malone, K.E., Dorgan, J.F., Daling, J., Schairer, C., Brinton, L.A., 2004. Serum levels of sex hormones and breast cancer risk in premenopausal women: a case-control study (USA). *Cancer Causes Control* 15, 45-53.
- Sun, T., Jackson, S., Haycock, J.W., MacNeil, S., 2006. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol* 122, 372-381.
- Sung, K.E., Su, X., Berthier, E., Pehlke, C., Friedl, A., Beebe, D.J., 2013. Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models. *PloS one* 8, e76373.
- Susaneck, S.J., Allen, T.A., Hoopes, J., Withrow, S.J., Macy, D.W., 1983. Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 9, 971-976.
- Suzuki, T., Darnel, A.D., Akahira, J.I., Ariga, N., Ogawa, S., Kaneko, C., Takeyama, J., Moriya, T., Sasano, H., 2001. 5alpha-reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2250-2257.
- Suzuki, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Hirakawa, H., Ohuchi, N., Sasano, H., 2007. In situ production of sex steroids in human breast carcinoma. *Med Mol Morphol* 40, 121-127.

- Suzuki, T., Miki, Y., Nakamura, Y., Moriya, T., Ito, K., Ohuchi, N., Sasano, H., 2005. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12, 701-720.
- Takagi, K., Miki, Y., Nagasaki, S., Hirakawa, H., Onodera, Y., Akahira, J., Ishida, T., Watanabe, M., Kimijima, I., Hayashi, S., Sasano, H., Suzuki, T., 2010. Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment. *Endocr Relat Cancer* 17, 415-430.
- Takeichi, M., 1991. Cadherin Cell-Adhesion Receptors as a Morphogenetic Regulator. *Science* 251, 1451-1455.
- Tang, D., Xu, S., Zhang, Q., Zhao, W., 2012. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* 29, 526-533.
- Tavassoli, F.A., 1999. *Pathology of the Breast*. McGraw-Hill Professional Publishing, USA.
- Taylor, G.W., Meltzer, A., 1938. "Inflammatory Carcinoma" of the Breast. *The American Journal of Cancer* 33, 33-49.
- Teicher, B.A., 2006. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther* 5, 2435-2443.
- Thanan, R., Murata, M., Ma, N., Hammam, O., Wishahi, M., El Leithy, T., Hiraku, Y., Oikawa, S., Kawanishi, S., 2012. Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. *Mediators Inflamm* 2012, 165879.

- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M., 1999. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun* 36, 47-50.
- Tomlinson, J.S., Alpaugh, M.L., Barsky, S.H., 2001. An intact overexpressed E-cadherin/alpha,beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma. *Cancer Res* 61, 5231-5241.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87-108.
- Trimboli, A.J., Fukino, K., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., Ostrowski, M.C., Leone, G., 2008. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 68, 937-945.
- Turton, N.J., Judah, D.J., Riley, J., Davies, R., Lipson, D., Styles, J.A., Smith, A.G., Gant, T.W., 2001. Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. *Oncogene* 20, 1300-1306.
- van der Auwera, I., van Laere, S.J., van den Eynden, G.G., Benoy, I., van Dam, P., Colpaert, C.G., Fox, S.B., Turley, H., Harris, A.L., van Marck, E.A., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., 2004. Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res* 10, 7965-7971.

- van Golen, K.L., Davies, S., Wu, Z.F., Wang, Y., Bucana, C.D., Root, H., Chandrasekharappa, S., Strawderman, M., Ethier, S.P., Merajver, S.D., 1999. A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res* 5, 2511-2519.
- van Laere, S.J., van den Eynden, G.G., van der Auwera, I., Vandenberghe, M., van Dam, P., van Marck, E.A., van Golen, K.L., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., 2006. Identification of cell-of-origin breast tumor subtypes in inflammatory breast cancer by gene expression profiling. *Breast Cancer Res Treat* 95, 243-255.
- Vermeulen, A., Deslypere, J.P., Paridaens, R., 1986. Steroid dynamics in the normal and carcinomatous mammary gland. *J Steroid Biochem* 25, 799-802.
- Vermeulen, P.B., van Golen, K.L., Dirix, L.Y., 2010. Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern, and tumor emboli in inflammatory breast cancer: a review of the current knowledge. *Cancer* 116, 2748-2754.
- Veronesi, U., Pizzocaro, G., 1968. Breast cancer in women subsequent to cystic disease of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 126, 529-532.
- Vora, H.H., Patel, N.A., Rajvik, K.N., Mehta, S.V., Brahmabhatt, B.V., Shah, M.J., Shukla, S.N., Shah, P.M., 2009. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *Int J Biol Markers* 24, 38-46.

- Wang, P., Henning, S.M., Heber, D., 2010a. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS one* 5, e10202.
- Wang, R., Lv, Q., Meng, W., Tan, Q., Zhang, S., Mo, X., Yang, X., 2014. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis* 6, 829-837.
- Wang, X., Sun, L., Maffini, M.V., Soto, A., Sonnenschein, C., Kaplan, D.L., 2010b. A complex 3D human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function. *Biomaterials* 31, 3920-3929.
- Wang, Z.Q., Yan, X.Y., 2013. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett* 330, 150-162.
- Webb, J.M., Brouwer, J.B., Brouwer, E.A., 1967. Cell proliferation in rat liver: nucleic acid ratios and thymidine uptake as related to dose of a toxicant, mesidine. *Toxicol Appl Pharmacol* 10, 300-312.
- Wedam, S.B., Low, J.A., Yang, S.X., Chow, C.K., Choyke, P., Danforth, D., Hewitt, S.M., Berman, A., Steinberg, S.M., Liewehr, D.J., Plehn, J., Doshi, A., Thomasson, D., McCarthy, N., Koeppen, H., Sherman, M., Zujewski, J., Camphausen, K., Chen, H., Swain, S.M., 2006. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 24, 769-777.
- Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., Dirnhofer, S., 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 35, 122-128.

- Wiebe, J.P., 2006. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13, 717-738.
- Wiebe, J.P., Muzia, D., Hu, J., Szwajcer, D., Hill, S.A., Seachrist, J.L., 2000. The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res* 60, 936-943.
- Wilson, H., Huelsmeyer, M., Chun, R., Young, K.M., Friedrichs, K., Argyle, D.J., 2008. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J* 175, 69-75.
- Wong, S.F., Reimann, K., Lai, L.C., 2001. Effect of transforming growth factor-beta1, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II on cell growth and oestrogen metabolism in human breast cancer cell lines. *Pathology* 33, 454-459.
- Wu, M., Wu, Z.F., Rosenthal, D.T., Rhee, E.M., Merajver, S.D., 2010. Characterization of the roles of RHOC and RHOA GTPases in invasion, motility, and matrix adhesion in inflammatory and aggressive breast cancers. *Cancer* 116, 2768-2782.
- Wu, S., Yu, L., Wang, D., Zhou, L., Cheng, Z., Chai, D., Ma, L., Tao, Y., 2012. Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer* 12, 535.
- Wu, V.S., Kanaya, N., Lo, C., Mortimer, J., Chen, S., 2015. From bench to bedside: What do we know about hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer? *J Steroid Biochem Mol Biol* 153, 45-53.

- Xie, B., Tsao, S.W., Wong, Y.C., 1999. Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in female noble rats: the role of androgens. *Carcinogenesis* 20, 1597-1606.
- Yamada, K.M., Cukierman, E., 2007. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 130, 601-610.
- Yamashita, A., Maruo, K., Suzuki, K., Shirota, K., Kobayashi, K., Hioki, K., 2001. Experimental chemotherapy against canine mammary cancer xenograft in SCID mice and its prediction of clinical effect. *J Vet Med Sci* 63, 831-836.
- Yang, J., Weinberg, R.A., 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.
- Ye, Y., Tellez, J.D., Durazo, M., Belcher, M., Yearsley, K., Barsky, S.H., 2010. E-cadherin accumulation within the lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer is due to altered trafficking. *Anticancer Res* 30, 3903-3910.
- Yu, Z.R., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., Pestell, R.G., 2012. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell B* 44, 2144-2151.
- Zeng, Q., Li, W., Lu, D., Wu, Z., Duan, H., Luo, Y., Feng, J., Yang, D., Fu, L., Yan, X., 2012. CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1127-1132.
- Zhang, D., LaFortune, T.A., Krishnamurthy, S., Esteva, F.J., Cristofanilli, M., Liu, P., Lucci, A., Singh, B., Hung, M.C., Hortobagyi, G.N., Ueno, N.T., 2009. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor

reverses mesenchymal to epithelial phenotype and inhibits metastasis in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 15, 6639-6648.

Zhang, D.F., Sun, B.C., Zhao, X.L., Ma, Y.M., Ji, R., Gu, Q., Dong, X.Y., Li, J., Liu, F., Jia, X.H., Leng, X., Zhang, C., Sun, R., Chi, J.D., 2014. Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133(+) cells in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer* 13, 1-14.