

## Tesis de Licenciatura

# Caracterización de isiformas del receptor de progesterona en líneas tumorales de adenocarcinomas mamarios murinos con distinto grado de hormona-dependencia

Helguero, Luisa Alejandra

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Helguero, Luisa Alejandra. (). Caracterización de isiformas del receptor de progesterona en líneas tumorales de adenocarcinomas mamarios murinos con distinto grado de hormona-dependencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000599\\_Helguero](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000599_Helguero)

#### Cita tipo Chicago:

Helguero, Luisa Alejandra. "Caracterización de isiformas del receptor de progesterona en líneas tumorales de adenocarcinomas mamarios murinos con distinto grado de hormona-dependencia". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000599\\_Helguero](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000599_Helguero)

**EXACTAS**  
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Caracterización de isoformas del receptor de progesterona en líneas tumorales de adenocarcinomas mamarios murinos con distinto grado de hormono-dependencia”

**Autora: Luisa Alejandra Helguero**

**Directora: Dra. Claudia Lanari**

IBYME

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

599

Nº 0599

TESIS DE LICENCIATURA

JUNIO 1998

A mi mamá.

# AGRADECIMIENTOS



Luisa A. Helguero



CLAUDIA L.

A mis directores Claudia y Alfredo por su constante apoyo desde mi primer día de trabajo. A mis compañeras de trabajo Caro, Eleo y Victoria por estar siempre dispuestas a ayudarme. A Fer y Caro nuevamente por haberme enseñado todos los “trucos” que a ellas tanto les costó aprender. En fin, gracias a todo el grupo con el que tengo la suerte de trabajar por crear un ambiente cálido y confortable para en donde es posible expresarse con total libertad.

A mi papá y hermanos (Pato y Hugo) que junto con mi mamá tuvieron que soportar los “mal humores” previos a los exámenes.

A toda mi familia en general por haberme apoyado durante todos estos años de estudio y a mis dos abuelos en particular que no están aquí hoy pero que siempre se mostraron orgullosos de tener una nieta que estudiara biología.

A mis compañeros de la facultad, Naty, Paco, Jorgelina, Silvana, Jorge, Claudio, Dani, Roberto (perdón si me olvido de alguien) y muy especialmente a Lionel, Eleonora y Vero por todas esas inolvidables e interminables tardes de estudio y confidencias.

A mis amigas de toda la vida.

A Paul.

A las chicas del lab. 213 por su disposición a ayudarme frente a cualquier eventualidad.

A las Dras. Mercedes Goin y Patricia Elizalde por la valiosa discusión de los resultados y por su buena disposición para responder a mis preguntas.

A Arturo, que por ser mi vecino debió sufrir el constante acoso por algunos elementos de laboratorio.

Agradecimiento **Muy especial** a Sergio Iglésias y las Dras. Valentina Carricarte y Ana Pastini de GADOR S.A. A ellas por permitirme el ingreso al establecimiento y el uso del programa Collage ® Image analysis software; a el por el tiempo dedicado a mí durante el uso del mismo y por la paciencia y buena onda a pesar de estar muy ocupado.

# ÍNDICE

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I- Adenocarcinomas mamarios inducidos por progestágenos</b>	2
A. <i>Modelo Experimental</i>	2
B. <i>Regulación de la inducción tumoral por MPA</i>	6
C. <i>Regulación del crecimiento de adenocarcinomas mamarios in vivo.</i>	7
D. <i>Variantes resistentes al tratamiento hormonal</i>	7
E. <i>Regulación del crecimiento de adenocarcinomas mamarios in vitro.</i>	7
F. <i>Rol del RP en el crecimiento PD y PI.</i>	8
G. <i>Desarrollo de líneas celulares</i>	8
H. <i>Nuestro modelo experimental en relación con el cáncer de mama Humano</i>	8
<b>2- Receptor de progesterona</b>	10
<b>3- Progesterona y sus antagonistas en carcinomas mamarios</b>	17
<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	19
- <i>Animales</i>	20
- <i>Transplante de tumores (pasajes)</i>	20
- <i>Tumores utilizados</i>	20
- <i>Mantenimiento de líneas celulares</i>	21
- <i>Caracterización de receptores de Progesterona usando la técnica de Western blot</i>	24
- <i>Preparación de extractos citosólicos</i>	24
- <i>Descripción de la técnica de western blot</i>	25
- <i>Estudios in vivo</i>	30
- <i>Ánálisis estadístico</i>	31
<b>RESULTADOS</b>	32
<b>DISCUSIÓN</b>	45
<b>CONCLUSIONES</b>	50
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	53

# ABREVIATURAS

**Abreviaturas:**

AcM:	anticuerpo monoclonal
AF:	secuencias de transactivación
CDK:	kinasa dependiente de ciclinas
cRP:	receptor de progesterona de pollo
DMBA:	dimetilbenzantraceno
E <sub>2</sub> :	17-β-estradiol
EGF:	factor de crecimiento epidérmico
FGF:	factor de crecimiento fibroblástico
hRP:	receptor de progesterona humano
HSP:	proteínas de shock térmico
IGF:	factor de crecimiento simil insulina
LBD:	sitio de unión al ligando
MAPK:	kinasa activada por mitógenos
MNU:	metilnitrosourea
MPA:	acetato de medroxiprogesterona
mRNA:	RNA mensajero
Ovx:	ovariectomizado

PAGE -SDS: electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante con SDS

PD:	progéstágeno-dependiente
Pg:	progesterona
PI:	progéstágeno-independiente
PM:	peso molecular
PRE:	sitios del DNA a los que se une el RP
RA:	receptores androgénicos
RE:	receptores de estrógenos
R-EGF:	receptores del factor de crecimiento epidérmico

RG:	receptores de glucocorticoides
RM:	receptores de mineralocorticoides
RP:	receptores de progesterona
sc.:	subcutáneo
SFB ch	suero fetal bovino charcolizado
SFB	suero fetal bovino
TGF $\beta$ :	factores de transformación tipo $\beta$

# INTRODUCCIÓN

## *I- Adenocarcinomas mamarios inducidos por progestágenos.*

### **A- Modelo Experimental:**

En nuestro laboratorio se han desarrollado una serie de modelos experimentales de adenocarcinomas mamarios murinos en ratones BALB/c inducidos por la administración exclusiva de los progestágenos acetato de medroxiprogesterona (MPA) ((Lanari et al, 1986; Molinolo et al, 1987; Lanari et al, 1989; Kordon et al, 1991) o progesterona (Pg) (Kordon et al, 1993), o bien administrando de forma concomitante MPA con el carcinógeno químico metilnitrosourea (MNU) (Pazos et al, 1992). Los tumores inducidos con MPA son en su mayoría carcinomas ductales que expresan altos niveles de receptores para estrógenos (RE) y progesterona (RP), y niveles no detectables de receptores para factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) (Figura 1).

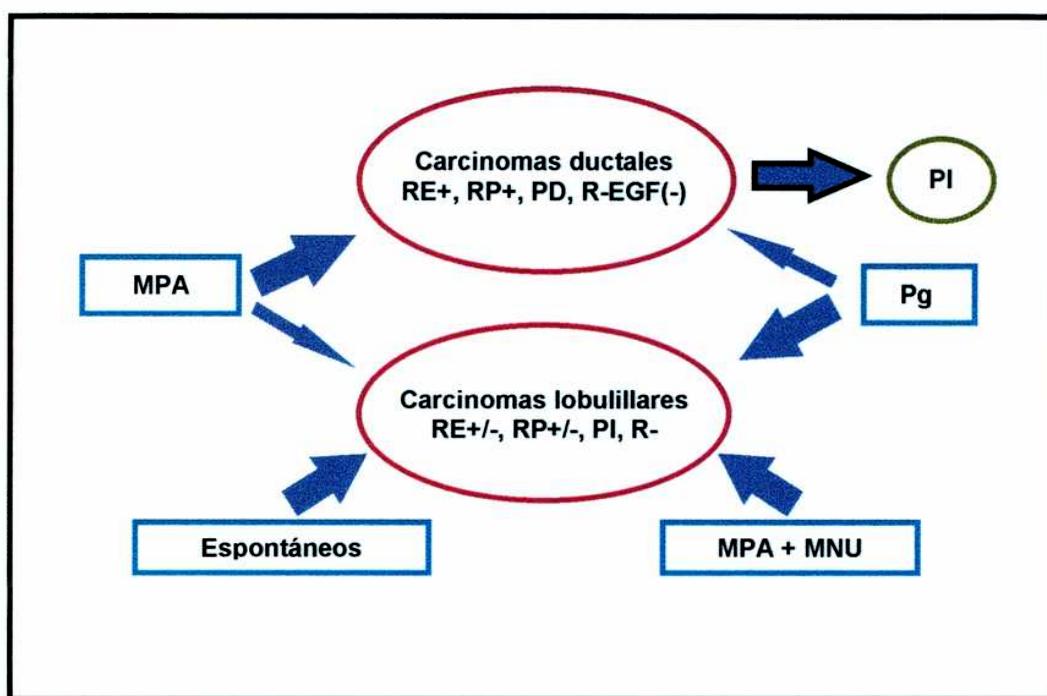


Figura 1: Inducción de adenocarcinomas mamarios en ratones hembras BALB/c. Se administra MPA depot sc, 40mg cada 3 meses durante un año o bien se implanta un pellet de 40mg cada 6 meses. La latencia de aparición de los tumores es mayor al año. Pg: se administra en pellets de silastic de 40mg cada 6 meses. La latencia de aparición de los tumores es de 52 semanas. El MNU se administra en dosis de 50mg/kg de peso, s.c., una semana después o antes de MPA según el protocolo. Los tumores tienen una latencia de aparición de 28 semanas aproximadamente.

Los tumores se mantienen por transplantes singeneicos en hembras tratadas o no con MPA. En los pasajes, Los tumores ductales tienen un patrón de crecimiento dependiente de progestágenos (PD), es decir, crecen rápidamente en animales tratados con MPA o con Pg, lentamente y después de aproximadamente dos meses en hembras sin tratar y después de 6 meses en ratones ovariectomizados. Cuando esporádicamente el tumor comienza a crecer en los animales no tratados con MPA (Figura 2) surge lo que denominamos una variante progestágeno-independiente (PI), es decir capaz de crecer sin el aporte exógeno de hormonas. Para continuar realizando estudios con los tumores PD, se descongelan tumores de pasajes previos.

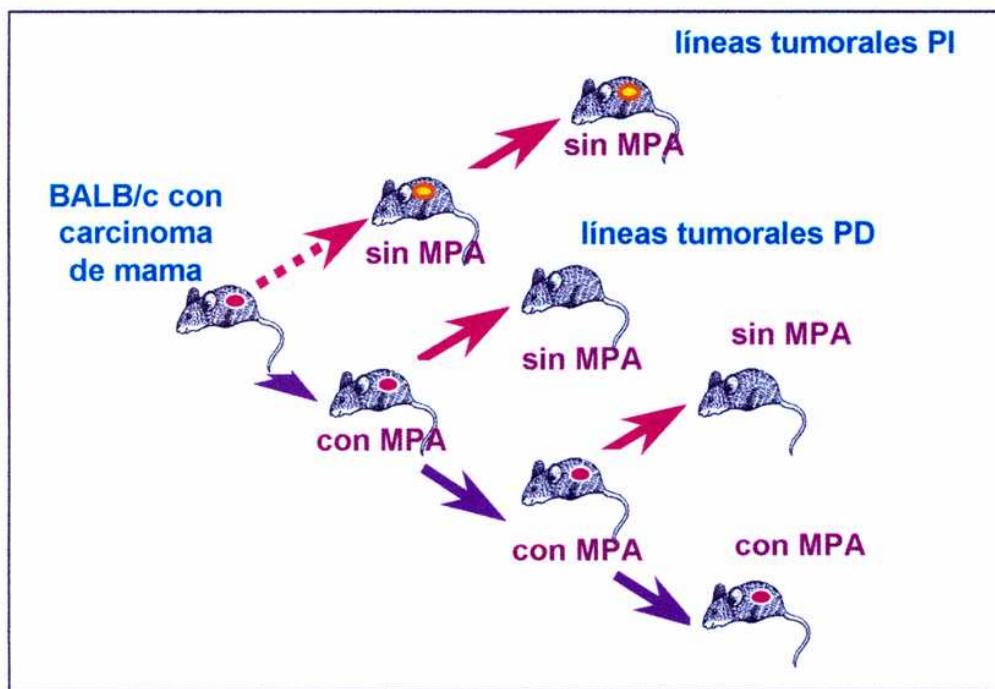


Figura 2: Obtención de líneas tumorales PD y PI. Se transplanta el tumor primario a dos ratones tratados con MPA (20mg depot, subcutáneo, contralateral al transplante tumoral) y a dos ratones sin tratar. Los tumores ductales crecen sólo en los tratados con MPA durante los dos a tres primeros meses de seguimiento. Cuando el tumor alcanza un tamaño aproximado de 10-15 mm de diámetro, se transplanta a otros dos ratones tratados, o no, con MPA y así sucesivamente controlando la hormono-dependencia, es decir que el tumor no crezca durante dos meses en los ratones sin tratar. Para seleccionar una variante PI, se espera hasta que empiece a crecer un tumor en los animales sin tratar y se lo transplanta a animales sin tratar y así sucesivamente.

El MPA induce también, aunque en menor proporción carcinomas lobulillares. Estos tumores no expresan RE ni RP, o si lo hacen los pierden durante los primeros pasajes. Si bien durante los primeros pasajes algunos pueden responder al estímulo hormonal, luego se hacen completamente autónomos o PI. Los carcinomas lobulillares expresan receptores de EGF (R-EGF). Estos tumores presentan una histología similar a los carcinomas mamarios que surgen espontáneamente en hembras multíparas BALB/c. En la Figura 3 se muestra una curva de crecimiento típica de un tumor ductal PD y la de un lobulillar.

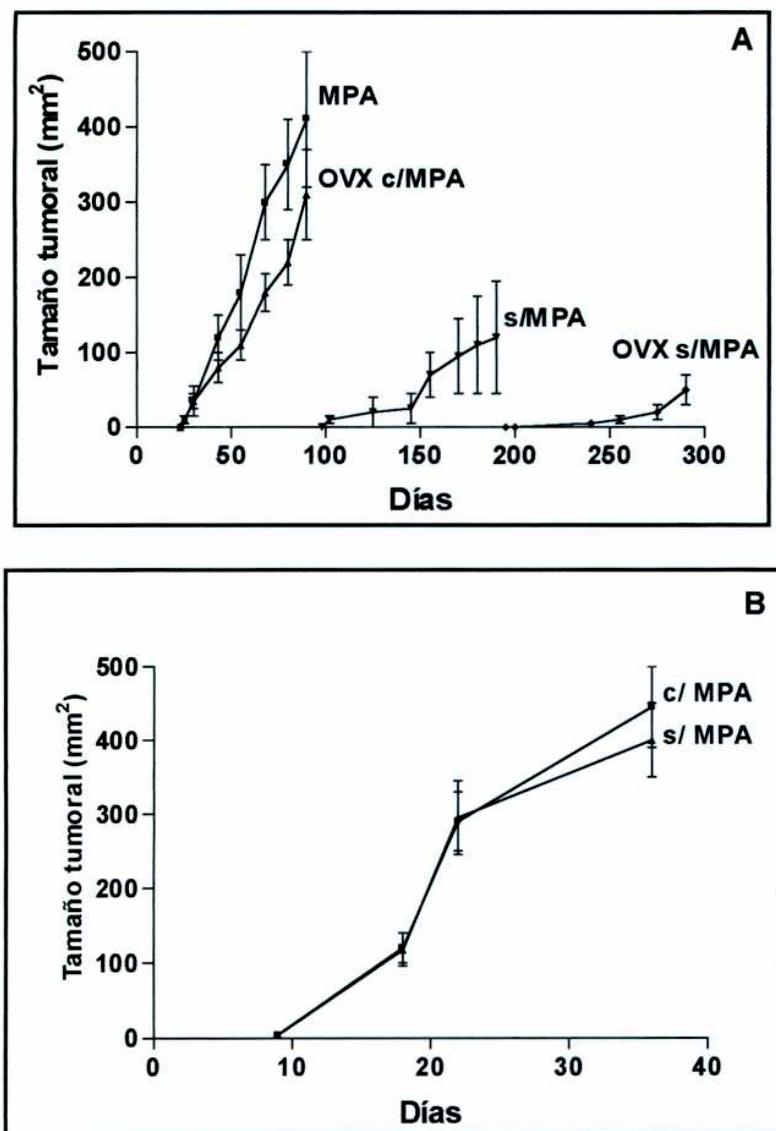


Figura 3: Curvas de crecimiento tumoral de un tumor ductal de comportamiento PD (A) y otra de un tumor de histología lobulillar (B) creciendo en presencia o ausencia de MPA.

A diferencia del MPA, la Pg induce una alta proporción de carcinomas lobulillares (Figura 1). Cada una de las lesiones tumorales descriptas está precedida por alteraciones morfológicas propias; los carcinomas ductales están asociados a lesiones preneoplásicas ductales y los lobulillares a lesiones preneoplásicas lobulillares. Estas lesiones son comparables a las lesiones preneoplásicas observables en la mama humana.

Independientemente de la hormona inductora, los carcinomas lobulillares y ductales tienen los mismos patrones biológicos de crecimiento y expresión de receptores. En la tabla 1 se resumen las principales características de los tumores ductales y lobulillares.

**Tabla 1. Características morfológicas y biológicas de los carcinomas lobulillares y ductales.**

PARAMETRO	CARCINOMAS DUCTALES	CARCINOMAS LOBULILLARES
Inducción	MPA, ocasionalmente Pg	Pg, MNU, espontáneos, ocasionalmente MPA.
Receptores Hormonales	RP: 50 - 1000 fmol/mg proteína. RE: 20 - 200 fmol/mg proteína. <i>La expresión de receptores se mantiene en pasajes singeneicos.</i>	RP: 0 - 100 fmol/mg proteína. RE: 0 - 50 fmol/mg proteína. <i>La expresión de receptores se pierde en pasajes singeneicos.</i>
R-EGF	No detectables.	Niveles siempre > de 5 fmol/mg proteína.
R-Prolactina	Entre 6 y 32 fmol/mg proteína.	Entre 9 y 33 fmol/mg proteína.
Preneoplasias	Hiperplasias ductales.	Hiperplasias lobulillares.
Sensibilidad a hormonas	Progestágeno-dependientes. <i>Se pueden originar variantes progestágeno-independientes</i> Retrogradan con estrógenos y antiprogestágenos. <i>Se pueden originar variantes insensibles a estrógenos.</i> Todas las variantes conservan los RP y RE.	No incrementan su crecimiento en respuesta a progestágenos.  No retrogradan en respuesta a estrógenos o antiprogestágenos.
Crecimiento <i>in vivo</i>	Crecimiento lento. Sobrevida > de 2 meses.	Crecimiento rápido. Sobrevida < 2 meses.
Crecimiento <i>in vitro</i>	Organoides; los fibroblastos interfieren con el crecimiento epitelial.	Organoides; Células epiteliales con alta velocidad de crecimiento, sin interferencia por fibroblastos.
Estroma	Abundante, fibroblástico, poca necrosis, infiltración linfomonocitaria e histiocitaria.	Escaso, fibroblástico, necrosis, poca infiltración celular.
Metástasis	Ganglios regionales, pulmón, hígado.	No, en tumores inducidos por Pg. Pulmonares en tumores espontáneos en multíparas

## B. Regulación de la inducción tumoral por MPA

Tanto la sialoadenectomía como la ovariectomía (ovx) previas al tratamiento con MPA, disminuyen significativamente la incidencia tumoral y los tumores inducidos muestran los mismos patrones histológicos y biológicos de los tumores que aparecen en animales no operados (Figura 4). Los animales tratados con MPA tienen niveles de EGF aumentados tanto en glándula salival como en suero (Kordon et al, 1994). La sialoadenectomía previene el aumento de EGF sérico, que aparentemente actuaría en conjunto con el MPA en la glándula mamaria (Molinolo et al, 1998).

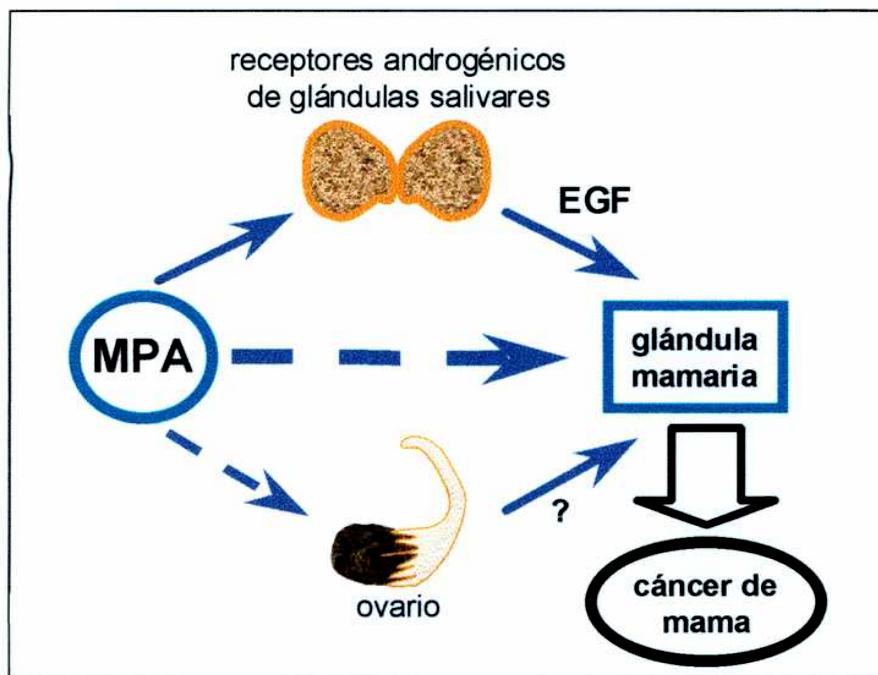


Figura 4: Cofactores en la inducción de carcinomas mamarios. La sialoadenectomía y la ovariectomía disminuyen la incidencia de adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. El MPA induce un aumento de EGF sérico sintetizado en glándulas salivares que, actuando conjuntamente con el MPA, favorece la inducción de adenocarcinomas mamarios. El trofismo de la glándula mamaria normal es mantenido por los ovarios, lo que indirectamente favorece la inducción de adenocarcinomas mamarios.

### C- Regulación del crecimiento de adenocarcinomas mamarios *in vivo*

Como ya se mencionó anteriormente, los tumores PD crecen en presencia de MPA o Pg, crecen después de 6 meses muy lentamente en animales ovx (Figura 3) y no crecen en animales que han sido ovx y adrenalectomizados. Los tumores regresionan completamente en presencia de 17-β Estradiol ( $E_2$ ). Las variantes PI pueden responder en algunos casos a la estimulación con MPA; en otros el crecimiento es tan rápido que no hay diferencias significativas entre tumores tratados y no tratados. La flutamida (antiandrógeno) no modifica la tasa de crecimiento, mientras que los antiprogestágenos mifepristona y onapristona, al igual que el  $E_2$  inducen regresión tumoral. El crecimiento de los carcinomas lobulillares no es modulable en forma significativa por ninguna de estas hormonas o antihormonas.

### D- Variantes resistentes al tratamiento hormonal

Si bien los tumores ductales tanto PD como PI regresionan con tratamiento estrogénico, ocasionalmente se generan tumores resistentes (“estrógeno-resistentes”), o sea que crecen a pesar de la presencia de la hormona inhibidora.

### E- Regulación del crecimiento de adenocarcinomas mamarios *in vitro*.

Usando cultivos primarios de una de las líneas tumorales PD, la C4-HD, se demostró que MPA y Pg estimulan la proliferación celular en un rango de concentraciones de 1-10nM, mientras que se necesitan concentraciones mayores de glucocorticoides (GC) y andrógenos para inducir un efecto similar. Tanto el  $E_2$  como los antiprogestágenos inhiben la proliferación celular inducida por MPA (Dran et al, 1995). En cuanto a los factores de crecimiento, se observó que los TGF $\beta$ s tienen efectos inhibitorios, el EGF y los IGFs no tienen efecto proliferativo por sí mismos y los FGFs I y II tienen un significativo efecto proliferativo (Lanari et al, 1997). En los cultivos de fibroblastos del estroma tumoral el MPA y  $E_2$  no afectan la proliferación, mientras que los antiprogestágenos pueden ejercer un pequeño efecto proliferativo, probablemente mediado por el receptor de glucocorticoides. Todos los factores de crecimiento mencionados anteriormente estimularon significativamente la proliferación celular.

#### **F- Rol del RP en el crecimiento PD y PI**

Utilizando oligonucleótidos antisentido del RP se inhibió la proliferación en cultivos primarios de un tumor PI. En cultivos de un tumor PD el bloqueo del RP inhibe también la estimulación inducida por factores séricos y por FGFs, lo que sugiere que los RP serían efectores finales de distintas vías proliferativas y que los RP juegan un rol funcional en el crecimiento PI (Tesis de Licenciatura de C. Lamb y manuscrito en preparación).

#### **G- Desarrollo de líneas celulares**

En el momento actual se están desarrollando en el laboratorio líneas celulares obtenidas a partir de cultivos primarios de 1 tumor ductal PD y de una variante PI. Estudios preliminares indican que se trata de células de estirpe epitelial, tumorigénicas, que expresan RE y RP y que su respuesta proliferativa se altera en presencia de hormonas.

#### **H- Nuestro modelo experimental en relación con el cáncer de mama humano.**

Alrededor del 75% de los carcinomas de mama humanos invasores son ductales que metastatizan generalmente en nódulos linfáticos axilares, hueso, pulmón, hígado y cerebro (Harris et al, 1992). Se postulan distintas etapas evolutivas cuya expresión fundamental es un incremento progresivo de la agresividad clínica y se asocian a patrones histológicos y biológicos específicos: lesiones preneoplásicas y lesiones invasoras hormono-dependientes y hormono-independientes. Según el estadío en que se encuentra el tumor en el momento del diagnóstico será el tratamiento elegido. Se puede predecir el grado de dependencia hormonal evaluando la presencia de RE y RP (Vorherr et al, 1978). Los tratamientos hormonales incluyen terapias ablativas como la ooforectomía y las terapias aditivas, tratamiento con anti-hormonas, principalmente tamoxifeno y en estudios recientes se están ensayando antiprogestágenos.

Los conocimientos obtenidos en el modelo de útero demostraron los efectos proliferativos de los estrógenos en el endometrio durante la primera parte del ciclo y el papel de la Pg de diferenciación terminal en la segunda parte. Extrapolando estos conocimientos a la glándula mamaria se le atribuyó tradicionalmente a los estrógenos un papel estimulador en la proliferación mamaria, y por lo tanto inductor del cáncer de mama, mientras que a los progestágenos se los ha considerado como hormonas diferenciadoras (van Lindert *et al*, 1983). Existen actualmente numerosas evidencias clínicas y experimentales que sugieren que los progestágenos podrían tener un activo rol proliferativo (Shi *et al*, 1994; Horwitz *et al*, 1996) en la glándula mamaria humana, ya que el pico de incorporación de timidina coincide con el pico de progesterona del ciclo menstrual (Anderson *et al*, 1988). Con este enfoque los estrógenos colaborarían con la proliferación celular induciendo la síntesis de los receptores para progesterona.

## 2- Receptor de progesterona:

El RP es un regulador de la transcripción que pertenece a la superfamilia de factores de transcripción activables por ligando que incluye a los receptores de hormonas esteroides, tiroides, retinoides y vitamina D. También pertenece a esta familia un gran grupo de proteínas denominadas receptores huérfanos cuyos ligandos o funciones aún no se conocen (citado en Wiegel, 1996; Evans *et al*, 1988; Conneely *et al*, 1992). Los genes se caracterizan por su organización en dominios funcionales que están conservados en mayor o menor grado entre los miembros de las distintas familias y especies.

El RP pertenece a la familia de receptores de hormonas esteroides que incluye a los receptores de glucocorticoides (RG), andrógenos (RA), estrógenos (RE) y mineralocorticoïdes (RM) (Evans, 1988; O'Malley, 1994). Estas proteínas modulares poseen un extremo N-terminal donde se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD) que exhibe la mayor variabilidad con respecto a longitud y secuencia (Evans *et al*, 1985). Un dominio de unión al DNA (DBD) que es la región más conservada y codifica para dos motivos dedos de zinc (O'Malley *et al*, 1987; Yamamoto *et al*, 1987), secuencias para activación de la transcripción dependientes de la unión al ligando (AFs), que se encuentran tanto en la región N-terminal como la C-terminal y se denominan AF1 y AF2. El RP contiene una tercera función de activación en el extremo N-terminal, la AF3 (Horwitz *et al*, 1994). Otras funciones incluyen secuencias de localización nuclear (Milgrom *et al*, 1989), secuencias que permiten la dimerización de receptores y otras que permiten la asociación con proteínas de shock térmico (HSP) (O'Malley *et al*, 1989).

Cuando la hormona se une al RP, éste se disocia de las HSPs (y posiblemente también lo haga de otras proteínas represoras) y se dimeriza. Estos dímeros son capaces de unirse a secuencias específicas en el DNA conocidas como elementos respondedores a progestágenos (PREs). La secuencia consenso de los PREs al igual que la de los otros receptores de esta familia (con excepción del RE) consiste en repeticiones invertidas separadas por tres nucleótidos (Slater *et al*, 1989). Los dímeros de receptor interactúan con la ma-

quinaria de transcripción basal (O'Malley *et al*, 1992) y co-activadores aumentando o disminuyendo la transcripción de un determinado gen blanco dependiendo de mecanismos que aún no han sido esclarecidos. En ausencia de hormona los receptores permanecen asociados a HSPs como la HSP 90 y HSP 70 (Toft *et al*, 1993).

Un paso crítico en la activación del receptor es el cambio conformacional inducido por el ligando (O'Malley *et al*, 1992), ésto se demostró para el RP donde el LBD pierde sensibilidad a las proteasas, o utilizando anticuerpos monoclonales (AcMs) que no reconocen a su epítope una vez que se ha pegado la hormona (Edwards *et al*, 1992). Los receptores esteroideos interactúan con otros factores de transcripción como AP-1 (Muller *et al*, 1990; Karin *et al*, 1990) y Rel A(Milgrom *et al*, 1986) independientemente de su unión al DNA, y también reciprocamente afectan sus funciones.

El RP es un receptor nuclear cuya síntesis es inducida por estrógenos, mientras que los progestágenos provocan una disminución de sus niveles. Este tipo de regulación negativa no se da en todos los tejidos y/o tipos celulares (Perrot-Applanat *et al*, 1988; Mc Carty *et al*, 1988; Green *et al*, 1988). Hasta el momento sólo se conoce su actividad como dímero donde cada una de las subunidades unen progesterona (Edwards *et al*, 1987). Existen por lo menos dos isoformas, en humanos una de peso molecular (PM) 116 kDa correspondiente al RP<sub>B</sub>, y otra menor de PM 94 kDa correspondiente al RP<sub>A</sub>. La isoforma A es 164 aminoácidos más corta en el extremo N-terminal (Horwitz *et al*, 1987; 1985; Chambon *et al*, 1988). En el cáncer de mama humano se han caracterizado ambas isoformas *in vitro* e *in vivo* (Horwitz *et al*, 1989), con un PM de aproximadamente 81 kDa para la A y 115 kDa para la B (Figura 5 ).

Las dos proteínas están codificadas por un único gen bajo el control de dos promotores cada uno de los cuales da origen a una subpoblación distinta de mRNAs (Edwards *et al*, 1989; O'Malley *et al*, 1989; Chambon *et al*, 1990; Baker *et al*, 1997).

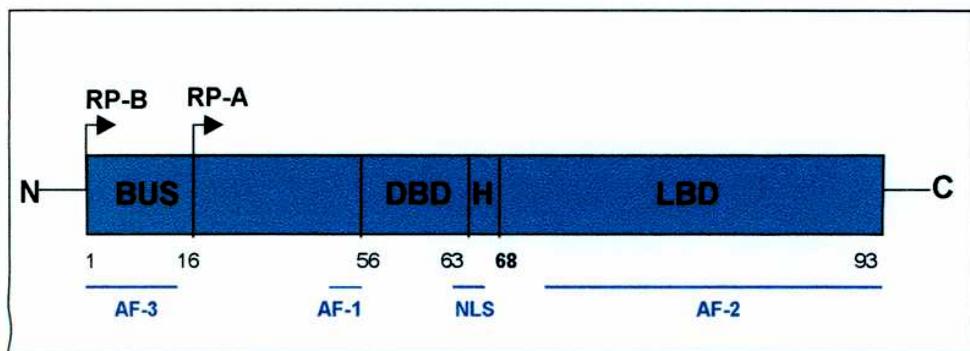


Figura 5: Modelo del receptor de progesterona humano mostrando el sitio de iniciación de la traducción de la isoforma B del RP (RP-B) y de la isoforma A (RP-A). **BUS:** segmento exclusivo de la isoforma B; **DBD:** dominio de unión al DNA; **H:** región bisagra; **LBD:** dominio de unión al ligando; **NLS:** secuencia de localización nuclear; **AF:** secuencias de transactivación.

En el RP de pollo (cRP) las isoformas A y B provienen del mismo gen (Huckaby et al, 1987) y su PM obtenido a partir de un western blot es de 72 kDa y 87 kDa para las isoformas A y B respectivamente (O'Malley et al, 1989). Estas dos proteínas son producto de la traducción alternativa del mismo mRNA (O'Malley et al, 1989) como se demostró utilizando sistemas de transfección de células o sistemas de traducción *in vitro* donde a partir de un único mRNA completo se obtienen las dos isoformas (Connely et al, 1987a). La delección del extremo 5' del cDNA que incluye el sitio de iniciación para el RP<sub>B</sub> da lugar a un mRNA truncado y solo se traduce RP<sub>A</sub> (Connely et al, 1987b). Si se transfecan células que no expresan RP con un cDNA con el codón que codifica para metionina en la posición 129 de la secuencia codificante (met<sup>129</sup>) mutado no hay expresión de RP<sub>A</sub>. Esto indica que la traducción de la isoforma A se da apartir de la señal de iniciación (AUG) en esa posición (O'Malley et al, 1989). Se demostró también en experimentos utilizando genes reporteros que ambas proteínas activan a genes respondedores a Pg (O'Malley et al, 1989). Tanto RP<sub>A</sub> y RP<sub>B</sub> se encuentran en cantidades equimolares (Schrader et al, 1972) y difieren en 128 aminoácidos localizados en el extremo N-terminal del cRP<sub>B</sub>. Esta región del cRP es la más hipervariable en cuanto al número y composición de aminoácidos y es responsable de modular la transcripción (Guiere et al, 1986). En células humanas ocurre una situación análoga con las dos isoformas del RP (Horwitz et al, 1983).

En conejos sólo se ha encontrado un único tipo de proteínas con gran homología al hRP<sub>B</sub> (Milgrom *et al*, 1984; Citado en Clarke, 1987). Utilizando sistemas en los cuales células que carecen del receptor son transfectadas con una de las isoformas del RP se observó que éstas muestran distintas propiedades de activación de la transcripción independientemente del tipo de célula transfectado, o del gen reportero utilizado (Horwitz *et al*, 1993; Mc Donnel *et al*, 1993;1994). Por ejemplo, se ha demostrado que la isoforma A es un represor dominante de la isoforma B. Esto sugiere que las respuestas a progestágenos podrían estar moduladas por la relación entre las isoformas A y B. Mientras que la segunda tiende a ser un fuerte activador, la primera puede actuar como un represor dominante. La isoforma A también disminuye la respuesta de otros receptores hormonales como el de andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, y mineralocorticoides, a sus respectivos ligandos (Goldman *et al*, 1994; Mc Donnel *et al*, 1994) bajo condiciones donde el RP<sub>A</sub> es transcripcionalmente inactivo (Horwitz *et al*, 1993; Mc Donnel *et al*, 1993;1994). Los RP<sub>A</sub> y RP<sub>B</sub> se encuentran en una proporción equimolar en el útero de humanos (Satyaswaroop, 1985), y similares proporciones se han encontrado en células de cáncer de mama en cultivo (Horwitz *et al*, 1983), si bien en los tumores la proporción de isoformas varía marcadamente entre pacientes (Graham *et al*, 1995). En roedores, la expresión de la isoforma A predomina sobre la B en una proporción 3:1 (Walters, 1987). Se conoce poco sobre la modulación de la expresión de ambas isoformas *in vivo*, aunque en células en cultivo que expresan el RP la síntesis de la isoforma B es estimulada preferencialmente por estradiol (E<sub>2</sub>). De este modo la proporción RP<sub>A</sub> y RP<sub>B</sub> disminuye significativamente (Clarke *et al*, 1995). Se han hallado además de los mRNAs para los hRP<sub>B</sub> y RP<sub>A</sub>, dos transcriptos que codifican para una tercer isoforma , la C (Horwitz *et al*, 1988) con un PM de 60 kDa. En líneas de células T47D de cancer de mama existen proteínas que unen progestágenos y antiprogestágenos de manera específica que tienen un PM de 60 kDa y que no se encuentran en la línea de células HeLa que se sabe no expresan RP (Miner *et al*, 1994). Al estudiar el cDNA del hRP<sub>C</sub> se encontró un tercer sitio de iniciación de la transcripción en fase (Met 595) río abajo del sitio de iniciación de la traducción de la isoforma A (met 165). El PgR<sub>C</sub> solo abarca el segundo dominio de dedos de zinc, secuencias para localización nuclear, y un LBD completo (Horwitz *et al*, 1990). La isoforma

C solo tiene actividad moduladora de la transcripción al ser expresada junto con las isoformas A y B regulando la actividad de las mismas (Quinn *et al*, 1990).

El RP pega progestágenos sintéticos como R5020 con menor afinidad que las otras dos isoformas y también une los antiprogestágenos mifepristona, (Ru 38. 486) onapristona (ZK 28.299) y ZK 112993 específicamente (Baker *et al*, 1997). Al inmunoprecipitar con hPR<sub>A</sub>-6, un anticuerpo monoclonal (AcM) que detecta solo la isoforma B (Satyswaroop *a et al*, 1988) y revelar un western blot con el AcM C-262 que detecta las tres isoformas (Edwards *et al*, 1992) se hallaron dímeros B:A y B:C. La isoforma C aparece como un duplete lo que indicaría que se trata de una proteína fosforilable (Horwitz *et al*, 1989). Los dímeros B:C se forman aún en presencia de mifepristona y onapristona. Con la técnica de gel shift se demostró que RP<sub>C</sub> solo no se une a PREs y que además impide el pegado de RP<sub>B</sub>, esto se debería a que la isoforma C carece del primer dominio de dedos de zinc, necesario para la unión al DNA. Por otro lado, se han reportado evidencias de que el RP<sub>C</sub> potencia la actividad transcripcional de las isoformas A y/o B en sistemas de transfección (Quinn *et al*, 1996). También se ha reportado la existencia de una variante del ER (TERP-1) que carece de DBD y regula la actividad transcripcional del ER silvestre (Shupnick, 1996).

La administración de Pg a pollos tratados con E<sub>2</sub> durante un corto tiempo, disminuye la capacidad del RP de pegar la hormona (Horwitz *et al*, 1988), ésto parece ocurrir por una disminución del mRNA del RP (Chambon *et al*, 1987; Katznellenbogen *et al*, 1988), proceso conocido como "regulación negativa". Sin embargo, al administrar Pg durante un período largo se observa un incremento del RP en el oviducto de pollos (Tuohimaa *et al*, 1984). Esto indicaría que la capacidad de unión del RP estaría fuertemente afectada por el tratamiento con esteroides. Para estudiar el destino de las dos isoformas utilizaron los AcMs hPR<sub>A</sub>-6 que reconoce solo la isoforma B y PR 22 que reconoce epítopes de ambas (Toft *et al*, 1986). La disminución de la síntesis de la proteína A es mucho mas rápida que la B. Media hora mas tarde de la administración de Pg casi todo el RP<sub>A</sub> desaparece del citosol pero aparece en núcleo. En un western blot revelado con PR22 es posible ver el duplete por fosforilación (Tuohimaa *et al*, 1996). La isoforma B también disminuye en el citosol encontrándose el mí-

nimo a las 6 hs. Luego de 24-48 hs se recuperan los niveles normales. O sea que debido a estas variaciones podría haber receptores no funcionantes según el estado hormonal (Spelsberg *et al*, 1982). Estos resultados están de acuerdo con el hallazgo de una disminución del 40% en el pegado de ligando por el RP en los mismos animales (Baulieu *et al*, 1977). La disminución del RP puede estar reflejando nuevas interacciones entre proteínas, fosforilaciones, una nueva organización cromatínica (Edwards *et al*, 1996) que lleva a ocultar *epitopes*, o a la degradación del receptor. Se ha demostrado que la disminución del número de receptores es dependiente de la fosforilación (Horwitz *et al*, 1988), pero como epítopes para otros AcMs también desaparecen hay que asumir que parte del receptor se degrada (Tuohimaa *et al*, 1995; Katznellenbogen *et al*, 1988). Es interesante destacar que si bien el RP<sub>B</sub> retorna a niveles control, A permanece en alta concentración aún luego de 48-72 hrs.

Se ha propuesto que la activación de la transcripción, unión al DNA (O'Malley *et al*, 1989), y unión a la hormona (Pratt *et al*, 1977; Auricchio *et al*, 1981) son funciones reguladas por fosforilación, y que los sitios susceptibles de ser fosforilados del RP se encuentran en el LBD (Horwitz *et al*, 1989), o DBD (Toft *et al*, 1988). Pero debido a que estos sitios son múltiples ha sido difícil definir roles funcionales o estructurales para estas modificaciones. La fosforilación *in vitro* del cRP con la subunidad catalítica de PKA imita la disminución de la movilidad de los receptores que se observa en un gel de poliacrilamida desnaturizante (PAGE-SDS) producto del tratamiento con hormona *in vivo* (Baulieu *et al*, 1986; O'Malley *et al*, 1989; Toft *et al*, 1988). Esta disminución de la movilidad se revierte con el tratamiento de fosfatasa alcalina esto lleva a pensar que PKA regularía los efectos sobre la transcripción mediados por el RP (Weigel *et al*, 1990).

Estudios de otros factores de transcripción demostraron que la fosforilación puede ser importante en la translocación al núcleo, unión al DNA, interacción con otras proteínas, y activación de la transcripción (Treismn *et al*, 1995). Algunos de los receptores de hormonas esteroideas pueden ser activados estimulando las vías de las quinasas en ausencia de hormonas, y de esta forma se pueden alterar respuestas a antagonistas, esto confirma la importancia de la fosforilación en la actividad de los receptores esteroideos.

El mapeo de péptidos fosforilados sobre los cRPs (Weigel *et al*, 1990), hRP (Horwitz *et al*, 1989; Weigel *et al*, 1994) y RP de conejo (Milgrom *et al*, 1991; 1994), han demostrado que están fosforilados en múltiples lugares y que en el caso de pollos (Weigel *et al*, 1990) y humanos (Horwitz *et al*, 1989), nuevos sitios son fosforilados frente a la unión de la hormona. Esta potenciación de la fosforilación está acompañada de un cambio en la movilidad de las proteínas en un PAGE-SDS. Lo mismo ocurre para el RG (Munck *et al*, 1989), y RE (Notides *et al*, 1992; Katzenellenbogen *et al*, 1994).

Se han reportado cuatro sitios de fosforilación en el cPgR. Estos se encuentran en regiones comunes a las isoformas A y B y tienen las secuencias consenso serina-prolina (ser-pro) (Weigel *et al*, 1990; 1993). Estas secuencias son reconocidas por CDKs (Morgan, 1995), MAPKs, y quinasas activadas por stress (Mahadevan *et al*, 1994; Davis *et al*; 1994) sugiriendo que tendrían algún rol en la activación del RP. Tres sitios se encuentran en la región N-terminal, de éstos, dos están fosforilados en ausencia de hormona, mientras que los restantes sólo se detectan si la misma está presente (Weigel *et al*, 1990; 1993) y el cuarto se encuentra localizado en la región bisagra (Weigel *et al*, 1990). El rol correspondiente a algunos de estos sitios se ha examinado utilizando mutagénesis dirigida. Por ejemplo, la sustitución de la ser<sup>211</sup> por ala bloquea el cambio en la movilidad de la proteína en un SDS-PAGE en presencia de hormona (Weigel *et al*, 1996). También se han identificado tres sitios de fosforilación presentes sólo en la isoforma B (Weigel *et al*, 1994) todos residen en el dominio N-terminal único de esta proteína. Algunos se fosforilan rápidamente pocos minutos luego de la administración de la hormona, y otro más lentamente (Weigel, 1995). Todos contienen la secuencia consenso ser-pro (Weigel *et al*, 1994). Algunos antagonistas como el mifepristona causan fosforilaciones en los mismos sitios que al estimular con R5020 y otros como es el caso de onapristona, no (Edwards *et al*, 1996). De más está decir que el rol de los muchos sitios de fosforilación del RP aún deben ser descubiertos.

### **3- Progesterona y sus antagonistas en carcinomas mamarios**

Existen numerosas evidencias de que la Pg, al igual que el E<sub>2</sub> tiene un fuerte efecto proliferativo (Nandi *et al*, 1985; Haslam *et al*, 1988; Lanari *et al*, 1997). Pg estimula la síntesis de DNA no sólo en el epitelio de los brotes terminales, sino también en el epitelio ductal (Bresciani, 1971) de la glándula mamaria. Estos efectos pueden ser inhibidos por antagonistas de progesterona (Etreby *et al*, 1991). También se ha involucrado a la Pg en la carcinogénesis mamaria en cepas de ratones infectadas con MMTV o en conjunción con la administración de carcinógenos químicos (Pazos *et al*, 1998). En general, Pg administrada simultáneamente o luego del carcinógeno potencia la formación del tumor, mientras que si se la administra antes inhibe su formación (Welsch, 1985; Russo *et al*, 1989).

Los antiprogestágenos poseen propiedades antiproliferativas bien documentadas en modelos animales de cáncer de mama hormono-dependiente como tumores inducidos por DMBA, NMU y tumores transplantables de ratón de la línea MXT (El Etreby *et al*, 1989). Se los divide en dos clases: los de tipo I entre los que se encuentra la onapristona que al unirse al RP impiden el pegado al DNA, y los de tipo II como la mifepristona que se une al RP permitiendo que éste interaccione con los PREs pero sin activación de la transcripción. La mifepristona tiene también propiedades antiglucocorticoides, y en menor proporción antiandrogénicas (Ojasoo *et al*, 1986). Se ha reportado que cuando los dos antagonistas son combinados la inhibición es aditiva, llevando a una remisión similar a la inducida por la ovariectomía (Klijin *et al*, 1990; Etreby *et al*, 1989). En sistemas en los cuales se transfecaron líneas celulares (que no expresan RP) con la isoforma B se observó un efecto sinérgico sobre la transcripción al estimular con mifepristona y cAMP pero a largo plazo (Klein-Hitpass *et al*, 1998), estos resultados son consistentes con el hecho de que la transcripción esté indirectamente regulada por proteínas coactivadoras cuya actividad estaría controlada por fosforilación dependiente de AMPc.

## Objetivos generales

1. Caracterizar la expresión de isoformas del receptor de progesterona (RP) en líneas de carcinomas de mama murinos progestágeno-dependientes (PD) e independientes (PI).
2. Correlacionar esta expresión con los patrones de crecimiento y la respuesta tumoral a hormonas y antihormonas.

## Objetivos particulares

1. Definir las condiciones para la caracterización por medio de western blots de la expresión de las isoformas del RP en tejidos murinos.
2. En tumores de mama inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) de histología ductal, que expresan alto contenido de receptor de estrógenos y progesterona investigar:
  - a) qué isoformas del RP se expresan.
  - b) si existe una expresión diferencial de las distintas isoformas en respuesta a progestágenos.
  - c) si la respuesta diferencial a estrógenos y a antiprogestágenos está asociada a una diferente expresión de isoformas.
  - d) si existen diferencias en la expresión de isoformas entre variantes progestágeno-dependientes e independientes.
3. Investigar la expresión de RP en carcinomas lobulares de mama inducidos por progestágenos, que no lo expresan por la técnica bioquímica.
4. En líneas celulares obtenidas en el laboratorio:  
Caracterizar la expresión isoformas de las líneas obtenida a partir de un tumor PD y uno PI.

# MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales:**

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de dos meses de edad, provenientes del bioterio de la Academia Nacional de Medicina. Los animales se alimentaron con agua y comida *ad libitum*, con un período de doce horas de luz y doce de oscuridad.

**Transplante de tumores (pasajes) :**

Todos los tumores se mantuvieron *in vivo* por pasajes seriados singeneicos en hembras. Se implantaron fragmentos de aproximadamente 2-3 mm<sup>3</sup> en el flanco inguinal derecho con un trócar, en forma subcutánea (sc). En el caso de tumores PD se inocularon contralateralmente 40 mg de MPA depot (Medrosterona, Laboratorios Gador, Buenos Aires). Se dejaron siempre uno o dos animales por pasaje sin tratar con hormona para controlar la hormono-dependencia. Los tumores PI se transplantaron solamente en ratones sin tratar con MPA.

**Tumores utilizados:**

Se utilizaron tumores ductales inducidos por MPA en el año 1985: familia C4, C7 y tumores inducidos en el año 1989: la familia del tumor 59 de histología ductal y los tumores de histología lobulillar 55, 60. El tumor 22 surgió en un ratón sialoadenectomizado y tratado con MPA y el tumor 39 en un ratón tratado con progesterona (Tabla 2).

El tumor BET surgió en un experimento donde se investigaban los efectos de los estrógenos sobre el crecimiento tumoral. Se usó el tumor C7-HI que crecía sólo en presencia de MPA y regresionaba con pellets de E<sub>2</sub> de 5mg. Sin embargo, uno de los tumores comenzó a crecer nuevamente y se lo llamó BET. Este tumor adquirió simultáneamente la capacidad de crecer en forma autónoma y de ser

resistente a los estrógenos. Posteriormente se demostró que la resistencia a los estrógenos era un fenómeno reversible y en el momento actual es inhibible por estrógenos. Para obtener una línea tumoral resistente a los estrógenos, se creó la línea BET-R que se la mantiene en pasajes seriados en animales tratados con esta hormona.

Los tumores ductales tienen un crecimiento progestágeno-dependiente (PD). Por distintos métodos se pudieron seleccionar variantes con capacidad de crecer en ausencia de progestágenos, variantes PI. La tabla 2 resume las características de los tumores utilizados.

**Mantenimiento de líneas celulares :**

**Medio de cultivo:**

DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1) (Sigma) sin rojo fenol + sulfato de gentamicina comercial en concentración de 50 mg/l. Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada o deionizada + 10 % suero fetal bovino (SFB) (Gen S.A., Buenos Aires) decomplementado en presencia de 10nM Pg

**Medio de cultivo para obtener las células para realizar western blots (1% SFBch):**

DMEM/F12 + 1% SFB decomplementado y adsorbido con carbón-dextrano (SFBch).

**SFB decomplementado (SFB dec):**

SFB calentado a 56°C durante treinta minutos.

**SFB adsorbido con carbón-dextrano (SFBch):**

Se agregó carbón activado (Mallinckrodt) a una concentración final de 5% al SFB ya decomplementado y se agitó permanente durante 1 hora a 4°C. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó dos veces a 12.000 rpm durante 20 minutos. Se repitió el procedimiento con el sobrenadante pero esta vez se incubó durante

**Tabla 2.** Tumores utilizados en este trabajo. Se puede observar que de un tumor PD en algunos casos se han seleccionado más de una variante PI.

	Nombre PD	ER Fmoles/mg prot. x±DS (n=3-8)	PR Fmoles/mg prot. x±DS (n=3-8)	Nombre PI	ER Fmoles/mg prot. x±DS (n=3-8)	PR Fmoles/mg prot. x±DS (n=3-8)
<b>D U C T A L E S</b>	<b>C4-HD</b>	61±25	198±70	<b>C4-HI</b>	52±19	342±263
	<b>CC4-HD<sup>a</sup></b>	63±20	171±54	<b>CC4-HI</b>	34	210
	<b>59-HD</b>	200±37	251±93	<b>59-HI</b>	60±8	61±33
	<b>53-HD</b>	146±11	239±185	<b>53-HI</b>	129 126	961 160
<b>L O B U L L A R E S</b>	<b>C7-HD<sup>b</sup></b>			<b>C7-HI</b> <b>BET</b> <b>BET-R<sup>c</sup></b>	34±8 58±30 36±33	160±48 256±189 41±52
				<b>60</b>	-	-
				<b>55</b>	-	-
				<b>39</b>	-	-
				<b>22</b>	-	-

a :Es una variante de la cual se hizo un cultivo primario y se inoculó nuevamente a un ratón.

b: No se dispone más de la línea parental.

c: Variante estrógeno-resistente

Los valores corresponden a tumores obtenidos de ratones tratados con MPA en el caso de las PD y sin tratar con MPA en el caso de los PI.

toda la noche a 4°C y, finalmente, el suero se centrifugó 5 ó 6 veces hasta eliminar completamente el carbón. Una vez diluido en el medio de cultivo se esterilizó por filtración (0,22 μ).

Solución de tripsina-EDTA:

Tripsina (Gibco BRL) 0,25%, en PBS (sin Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup>).

EDTA (Gibco BRL) 0.2%.

PBS 10X:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (fosfato dibásico de sodio dodecahidratado, Baker): 30.06g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O(fosfato monobásico de sodio monohidratado, Anedra):2.56g
- NaCl:87.6g
- Se lleva a un litro con agua deionizada o bidestilada.

Se diluye 1:10 con agua bidestilada.

Líneas celulares utilizadas:

Se usaron 2 líneas celulares derivadas de C4-HD: C4-L1 y C4-L2 y una línea derivada del tumor C7-HI: C7-L1. In vitro las líneas C4-L2 y C7-L1 responden en forma proliferativa al MPA y la C4-L1 sólo en concentraciones μM. Al ser reinoculadas *in vivo*, la línea C4-L1 tiene un comportamiento PD mientras que la C4-L2 se asemeja más a una PI. En cuanto a la C7-L1 todavía no está finalizada su caracterización *in vivo*. Las líneas celulares se mantienen realizando repiques 1: 10 con tripsina-EDTA cada 7 días. Cuando los cultivos son confluentes, cuarenta y ocho horas antes de realizar los extractos se reemplazó el medio de cultivo por medio con 1% de SFBch, para evitar la regulación negativa de RP. Para los ensayos se utilizaron los siguientes repiques (R): C7-L1 = R18, C4-L1 = R24 y C4-L2 = R16.

**Caracterización de receptores de Progesterona usando la técnica de Western blot :**

**Preparación de extractos citosólicos :**

**Soluciones:**

Buffer de lisis: pH 7.4

Tris 20 mM (Baker)

EDTA 1.5mM (Gibco BRL)

DTT 0.25 mM (Sigma)

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 20 mM (Sigma)

Glicerol 10% (Raudo)

El pH se ajustó con KCl 0.4M

Combinación de inhibidores de proteasas 0.1% (benzamidina 1mM, EDTA 2mM, pepstatin A 5 µg / ml, leupeptin 10 µg / ml, bestatin 1 µg / ml) se prepara como stock 100X

PMSF 0.1M en etanol absoluto.

**Células en cultivo:**

Para realizar los extractos citosólicos a partir de células en cultivo, se lavaron las mismas en PBS, y se procedió a levantarlas con un rastillo en un volumen no mayor de 100 – 200 ul/ frasco de cultivo con buffer de lisis (en frío). El homogenato fue sonicado durante 15 segundos a intensidad 5. Se centrifugó 45 minutos a 40.000 rpm con una temperatura de 4°C (ultracentrífuga, Sorvall Combi Plus). El sobrenadante se guardó inmediatamente a -70°C y en el tanque de N<sub>2</sub>.

**Tejidos**

a) Utero de ratón, 48 hs después de tratamiento con 1µg de E<sub>2</sub> (control positivo).

- b) Músculo de ratón (control negativo)
- c) Tumores PD creciendo en presencia de MPA.
- d) Tumores PD a los cuales se eliminó el depósito de MPA 7 días antes.
- e) Tumores PI.
- f) Tumores lobulillares.
- g) Mama normal (ratón virgen de dos meses).

Los tejidos se homogeneizaron en un polytron (Teckmar) seteado en máximo (70), la operación se repitió dos veces durante 15 segundos en un volumen de 0.5 ml de buffer de lisis + 5 µl de Inhibidores de proteasas + 5 µl de PMSF / 20 mg de tumor. Los pasos siguientes fueron idénticos a los realizados para obtener extractos de células en cultivo.

#### Descripción de la técnica de western blot:

Se divide en dos etapas y permite detectar niveles de proteína en el orden de los µg.

a) Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) (Hames, 1987), se utiliza un sistema de buffer discontinuo, el mismo está basado en el método descripto por Laemmli (Laemmli, 1970) (tabla 3). En este tipo de geles la separación se ve afectada por la concentración del gel (acril/bisacril 29:1).

Elección de la concentración del gel : La separación de las bandas en una electroforesis en gel de poliacrilamida se refiere a la distancia entre las bandas independientemente del ancho de las mismas. Resolución se refiere a la separación de las bandas en relación con el ancho de las mismas. La resolución se ve maximizada por todos los factores que influencian el grosor de la banda como ser cantidad de muestra sembrada (no más de 25ul / hoyo). La separación dependerá del peso molecular (PM), pero no de la carga de la proteína de interés. Esto se debe a que el SDS es un detergente desnaturizante que elimina la conformación así como la densidad de carga de la proteína. Por lo tanto es

importante tener en cuenta que el PM que se obtiene es el correspondiente al polipéptido y no a la proteína nativa si ésta es oligomérica. El PM aparente se determina comparando la posición de la banda de interés con la posición relativa de los marcadores de PM. De esta forma es posible calcular el Rf (movilidad de la proteína bajo estudio referida a la movilidad del marcador), donde :

Rf = distancia recorrida por la proteína/distancia recorrida por el marcador.

La desnaturación de las proteínas se hace con calor (90–100 °C, 3-5 minutos) en presencia de exceso de SDS (3 :1) y un agente reductor de enlaces disulfuro como el  $\beta$ -mercaptoetanol o ditiotreitol la mayoría de los polipéptidos pegan SDS de una manera directamente proporcional a su peso, por lo tanto todos los polipéptidos quedan con la misma densidad de carga.

Cantidad ideal de proteína a sembrar es 50-100 $\mu$ g. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry. El gel se corrió durante 30 minutos a 15 mAmp/gel (gel concentrador) y 75-90 minutos a 20 mAmp/gel (gel separador).

Las proteínas separadas durante la electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para esto se arma un “sandwich” en el siguiente orden: esponja, 3 papeles whatman, gel, membrana, 3 papeles whatman, y esponja. El *buffer* de transferencia contiene metanol para fijar las proteínas a la membrana, es por este motivo que se trata de un factor importante a tener en cuenta. La transferencia se realizó a 80 V durante 2 hs. Para corroborar que la transferencia de las proteínas fue buena la membrana se tiñó con rojoponceau, y el gel con coomasie blue.

b) Revelado de las proteínas inmovilizadas sobre la membrana es posible detectar la proteína de interés mediante una unión antígeno-anticuerpo. Para eliminar posibles interacciones inespecíficas se realizó un bloqueo de dicha

membrana durante toda la noche (o.n.) a 4°C en 5% leche descremada en PBT 0.1%.

**Tabla 3:** Protocolo de preparación de geles utilizando un sistema de buffer discontinuo con SDS (modificación de Maniatis, 1989).

Solución	Gel Concentrador, 5%	Gel Separador, 7.5%
H <sub>2</sub> O	<b>4.8 ml</b>	<b>3.4 ml</b>
Acrilamida :bisacrilamida 29:1	<b>2.5 ml</b>	<b>850 µl</b>
SDS 20%	<b>50 µl</b>	<b>25 µl</b>
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	<b>2.5 ml</b>	---
1M Tris-HCl, pH 6.8	---	<b>625 µl</b>
TEMED	<b>6 µl</b>	<b>5 µl</b>
Persulfato de amonio (APS) 10%	<b>100 µl</b>	<b>50 µl</b>

Luego del bloqueo se lavó la membrana en PBT 0.1% y se incubó durante 2 horas con un anticuerpo monoclonal hPra 7 fabricado en ratón (4). Este anticuerpo reconoce las isoformas A y B del PgR de humano y de ratón. Se lavó nuevamente en PBT 0.1% durante 10 minutos (se repitió la operación 3 veces) y se incubó durante 1 hora con el segundo anticuerpo anti Ig de ratón obtenido en oveja acoplado a peroxidasa de rábano. La peroxidasa unida a la membrana se visualizó con un sustrato que luego de la reacción da un producto quimioluminiscente. La señal se detectó por exposición de la membrana a una película fotográfica.

**Tabla 4:** Condiciones de revelado de Membranas

Anticuerpo	Dilución (PBT 0.1%)	Lavados
1er Ac-anti-h7PgR	<b>1:100</b>	<b>3 PBT 0.1%</b>
2do Ac-anti mousse IgG	<b>1:1500</b>	<b>2 PBT 0.1%; 1 PBS</b>

Soluciones utilizadas:

Acrilamida 30% (Gibco BRL)  
Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (Tris, Baker; HCl, Raudo)  
Tris-HCl 1.0M pH 6.8 (Tris, Baker; HCl, Raudo)  
SDS 20% (Gibco BRL)  
Persulfato 10% (APS) (Gibco BRL)  
PBS-Tween 0.1% (PBT 0.1%) (Tween 20, Sigma)  
PBS pH 7.4  
NaCl 0.8% (Sigma)  
KCl 0.02% (Sigma)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.144% (Baker)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.024% (Baker)

Cracking Buffer 3X :

SDS 6%  
β- mercaptoetanol 15% v/v (Mallinkrodt)  
Glicerol 60% (Raudo)  
Tris 0.18M pH 6.8  
Azul de Bromo Fenol (BPB) 0.006% p/v (Sigma)  
Se diluye a 1X con la muestra, o con un volumen de muestra y otro de H<sub>2</sub>O destilada si la muestra está muy concentrada.

Ponceau S :

0.5% Red Ponceau (Sigma) en 1% AcH glacial (Merck para análisis)

Buffer de corrida :

Tris-Glicina-SDS 0.1% (Glicina, Gibco BRL)  
Se prepara Tris-Glicina como stock 10X

Buffer de transferencia :

Tris-Glicina-SDS 0.1%-Metanol 20% (Metanol, Merck para análisis)

Coomasie blue :

0.25 gr coomasie brillant blue R-250 (Gibco BRL)

metanol 75%

H<sub>2</sub>O 75%

AcOH 16%

Marcadores de peso molecular:

Prestained molecular weight markers (Gigco BRL).

Kaleidoscope prestained standards (Bio Rad)

Membrana de nitrocelulosa:

Trans-Blot transfer Medium (0.2 Um) (BioRad)

Solución de bloqueo:

Leche descremada (Molico) 5% en PBT 0.1%

Anticuerpos:

Anticuerpo monoclonal anti RP: hPRa 7 (NeoMarkers)

Anticuerpo policlonal anti Ig de ratón: Anti-mouse Ig, horseradish linked whole antibody (Amersham Life Science)

Sustrato quimioluminiscente:

ECL western blotting detection reagent (Amersham Life Science)

Renaissance western blot chemiluminescence Reagent (NEN Life Science Products)

Película fotográfica:

CUPRIX RP1 (Medical X-Ray film, Agfa).

**Método de Lowry :**

Curva standard de albúmina (Sigma) con valores en un rango desde 0-80 ug (por duplicado).

Sc1 : CuSO<sub>4</sub>1%, tartrato de Na K 1% en buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaOH

Se diluyó la muestra 3:100 y 5:100. De esta dilución se tomaron 100ul y se agregaron 0.9 ml de Sc1. Luego de 10 minutos se agregó reactivo de Folin (Folin-Ciocalteu, Merck) diluído a la mitad. Se esperó 30 minutos y se midió absorbancia a una longitud de onda de 750 nm (lector de ELISA).

**Estudios in vivo:**

**Hormonas utilizadas:**

17-β estradiol (E<sub>2</sub>): obtenido de Sigma Co, Missouri. Administrado en forma de pellets de silastic de 5mg.

Mifepristona: obtenida de Roussel Uclaf, Romainville, Francia. Administrada en forma sc en concentración de 6.75 mg / kg de peso por día. Se preparó una solución madre de concentración 22.5 mg / ml y diariamente se preparó la solución de trabajo 1:100, inyectándose 0.6 ml / ratón. La hormona se diluyó en solución fisiológica

Onapristona: obtenida de Schering Alemania. Administrada en forma sc en concentración de 10mg / kg de peso por día. Se preparó una solución madre de concentración 90 mg / ml, la solución de trabajo se preparó en forma diaria (1:100) inyectando 1 ml / ratón.

En experimentos anteriores se había evaluado el efecto de onapristona y E<sub>2</sub> sobre los tumores C7-HI, 59-2-HI, C4-HI y BET (Montecchia et al, enviado). En este trabajo de Seminario se estudió el efecto sobre 59-HI y sobre CC4-HI y se usó como control la línea 59-2-HI. Todos estos tumores tienen un crecimiento PI.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 25-50 mm<sup>2</sup> se comenzaron los tratamientos dejando un grupo control sin tratar. Se usaron 3-4 ratones por grupo. Los tumores fueron medidos con un calibre Vernier aproximadamente cada 2-3 días ( largo x ancho) y se graficó área vs tiempo.

**Análisis Estadístico:**

Para comparar tamaños tumorales en respuesta a distintos tratamientos se utilizó ANOVA y para comparar grupos particulares entre sí “t” de Tukey.

El análisis de los PMs se realizó con el programa Collage ® Image Analysis Software Version 4.0 ( para Macintosh), Fotodyne Incorporated. El mismo traza una recta de regresión con los valores correspondientes a cada marcador y su movilidad en el gel. Se obtiene entonces la recta de regresión y el desvío estándard (SD) de la misma. En función de estos datos el programa calcula el PM de cada banda en el gel. Además es posible realizar una integración del área ocupada con la banda para estimar la intensidad de la misma (a las cuales se les resta la intensidad correspondiente a la suciedad de fondo). Con estos datos y a partir de por lo menos dos repeticiones de cada muestra se calcula el PM medio +/- SD de las bandas de interés, y por otro lado la relación entre las intensidades de ambas isoformas en cada muestra.

# RESULTADOS

## **1-Caracterización de receptores de progesterona mediante la técnica de western blot:**

### **A- Puesta a punto de la técnica:**

Esta es la primera vez que se trabaja con esta técnica en nuestro laboratorio y fue puesta a punto junto con la Lic. María Fernanda Montecchia.

#### **Elección del buffer para la preparación de los extractos citosólicos:**

El agregado de ditiotreitol al *buffer* de lisis mejoró notablemente la calidad de los westerns. Actualmente usamos el mismo *buffer* que se utiliza para determinar los RP por la técnica bioquímica con el agregado de inhibidores de proteasas. Una vez preparados, los extractos se alicuotaron para evitar el uso de extractos que hayan sido previamente descongelados.

#### **Metanol:**

Cabe destacar que cuando se usó metanol de marca Dorwil la transferencia no fue eficiente. Al reemplazarlo por el de marca Merck (para análisis) la transferencia fue muy buena observándose bandas muy nítidas y oscuras al teñir con rojoponceau la membrana. Por otra parte al teñir el gel con coomasie blue se confirmó la ausencia de bandas.

#### **Anticuerpos:**

El AcM elegido fue el hPRa 7 de NeoMarkers. Para optimizar la visualización de las bandas se tituló el anticuerpo con un rango de diluciones entre 1:100 y 1:250. El segundo anticuerpo también se tituló con un rango entre 1:1000 y 1:2500. Se ensayaron tanto anticuerpos nuevos como reusados. A partir de los resultados obtenidos se eligió la combinación 1:100 (en el caso del primer AcM), 1:1500 (para el segundo AcM) (tabla 4). Para estos ensayos se decidió no utilizar anticuerpos reusados, aunque se demostró que funcionan cuando todas las otras condiciones son óptimas.

Bloqueo de la membrana:

Para evitar suciedad de fondo se incubó la membrana con los anticuerpos en presencia de distintas soluciones de bloqueo: PBT 0.1%, PBT 0.1% - leche descremada 5%, PBT 0.1% - leche descremada 3%, y PBT 0.1% - leche descremada 3% - glicina 3%. Se probaron todas las combinaciones posibles de anticuerpo primario y segundo anticuerpo en presencia o en ausencia de las soluciones de bloqueo. A partir de los resultados decidimos utilizar los anticuerpos no bloqueados porque del otro modo las señales observadas eran muy tenues y en algunos casos nulas.

Lavados:

Nuevamente con el objetivo de disminuir la suciedad de fondo se procedió a variar el número de lavados luego del primer y segundo anticuerpo resultando la combinación óptima la descripta en la tabla 4.

Marcadores de peso molecular:

Se utilizaron de rutina los marcadores de Gibco (prestained molecular weight markers) pero para asegurarnos de que las bandas consideradas de interés fueran las correctas también se corrieron ocasionalmente los marcadores de BioRad (Kaleidoscope prestained standards). Estos marcadores poseen cada uno un color distinto de manera que se facilita la identificación de los distintos PM. Esto nos permitió decidir qué marcadores debían ser eliminados durante la corrida para obtener una mayor separación de las bandas.

Sustrato quimioluminiscente para peroxidasa:

Se utilizó ECL (Amersham) obteniéndose un máximo de intensidad de la señal entre los 2-4 minutos de exposición, mientras que con Renaissance (NEN) el máximo se obtuvo entre 10-15 minutos.

## B- Expresión de isoformas de RP en tejidos controles y en el tumor C4-HD

En todos los experimentos se utilizó útero de hembras tratadas con estradiol ( $10\mu\text{g}$ ) durante dos días ( $\text{út} + \text{E}_2$ ) como control positivo. Antes de extraer los úteros se verificó que los animales estuviesen en estro ya que es el período donde la expresión del RP es máxima. Como control negativo se utilizó músculo de estos ratones ya que este tejido no expresa RP. Los geles se corrieron durante el tiempo necesario para permitir no solo la separación de las dos isoformas sino también la de posibles dupletes producto de modificaciones en los RP. En la mayoría de los casos se cuidó de no dejar caer el marcador de 68 kDa debido a que se ha reportó un inespecífico de un PM de aproximadamente 60 kDa correspondiente a la ovoalbúmina (Shyamala et al, 1990). La presencia de esta banda se tuvo en cuenta para corroborar que las muestras utilizadas contenían proteínas. Esto resultó útil en el caso de músculo donde es la única banda que se observa.

En la figura 5 se observan los *western blots* correspondientes al útero, músculo y C4-HD obtenido de ratones tratados con MPA (C4-HD+). Se observan 2 bandas específicas más intensas en útero y C4-HD+ que corresponderían a las isoformas A y B del ratón cuyos PM están descriptos en 115 y 83 kDa respectivamente (tabla 5). En algunos casos se observó una banda justo sobre la isoforma B que denominamos B'. En el caso del tumor C4HD+ la relación entre las intensidades de B y B' ( $B/B'$ ) es de 6.26. En un experimento en el que se utilizó tejido mamario como control se observaron las bandas A y B aunque con menor intensidad. En consecuencia, se decidió utilizar en todos los experimentos el útero como control positivo en lugar de la glándula mamaria. En el músculo no se detectaron bandas correspondientes a estos PM resultando un buen control negativo. En todas las muestras evaluadas excepto músculo se observaron tres bandas con PMs de 105, 91 y 69. Para investigar si eran bandas específicas se corrieron dos membranas gemelas (en

paralelo), a una de ellas la incubamos con el primer y segundo anticuerpo (fig. 5) y a la otra sólo la incubamos con el segundo anticuerpo (fig. 6). Los resultados en la figura 6 muestran claramente las tres bandas inespecíficas. Ocasionalmente en el útero (1/7) y en C4-HD aparece una banda inmediatamente abajo de la correspondiente a la isoforma A cercano a un PM de 78 Kda que llamaremos banda X. En la Tabla 5 se muestran las medias de PM de las distintas bandas mencionadas anteriormente obtenidas en distintos experimentos y en la Fig 5 se muestra un ejemplo representativo de cada uno

tejido	<b>B</b> $X \pm SD$ (n)	<b>A</b> $X \pm SD$ (n)	<b>X</b> $X \pm SD$ (n)
Út + E <sub>2</sub>	115.01 ± 3.34 (7)	84.60 ± 2.47 (6)	75.40 (1/6)
músculo	-	-	-
C4-DH +	113.94 ± 2.39 (5)	82.68 ± 1.11 (5)	-

(-) No tiene bandas detectables con esta técnica.

*Tabla 5: Pesos moleculares (PM) medios (en Kda) de las distintas isoformas del RP correspondientes a los controles positivo (útero + E<sub>2</sub>), negativo (músculo) y el tumor C4-HD obtenido de ratones tratados con MPA (C4-HD +). Los mismos se obtuvieron con el programa Collage ® Image Analysis Software. Cada tumor se ensayó al menos 5 veces utilizando extractos diferentes. .*

**Se concluye que la línea tumoral C4-HD inducida con MPA tiene ambas isoformas de RP similares a las encontradas en útero.**

#### **C- Evaluación de la expresión de isoformas del RP en distintas familias de tumores**

##### **i) Familia C4:**

Tanto el tumor C4-HD como su variante obtenida de cultivo primario la CC4-HD, en presencia de MPA expresan el mismo patrón de distribución de

isoformas (Figura 7). Cuando los tumores se obtienen de ratones sin tratar con MPA aparece más marcada la isoforma X (Figura 7, calle 5), y este efecto es mucho más marcado en las 2 variantes HI donde no sólo es más intensa la banda X sino también la de 69 kDa. No hay diferencias perceptibles en la isoforma B. En la Tabla 6 se muestran las medias de los PM obtenidos en distintos experimentos.

tumor	B $X \pm SD$ (n)	A $X \pm SD$ (n)	X $X \pm SD$ (n)
C4-DH +	$113.94 \pm 2.39$ (5)	$82.68 \pm 1.11$ (5)	-
C4-HD -	111.9 (1)	83.70 (1)	79.8 (1)
C4-HI	$113.96 \pm 3.88$ (3)	$81.10 \pm 1.84$ (2)	$75.85 \pm 3.23$ (2)
CC4-HD +	$114.5 \pm 0.70$ (2)	83.5 (1)	-
CC4-HI	$114.70 \pm 0.42$ (2)	84.10 (1)	78.60 (1)

(-)No tiene bandas detectables con esta técnica.

**Tabla 6:** Pesos moleculares (PMs) medios de las distintas isoformas del RP correspondientes a la familia C4. Los mismos se obtuvieron con el programa Collage ® Image Analysis Software. En todos los casos se ensayaron más de 3 muestras aunque se muestran las cuantificaciones de los señalados (n).

La proporción A: B varía entre los distintos tumores de esta familia en un rango entre 1 y 1.5 con la excepción del tumor C4-HD en ausencia de MPA. En este caso la proporción A:B se eleva hasta 2. Este dato estaría de acuerdo con el hecho que en esta familia el MPA regularía negativamente más la isoforma A que la B lo que se ve con mayor claridad en la Fig 9. En la Tabla 7 se muestran las proporciones de isoformas obtenidas en distintos experimentos.

tejidos	A/B $X \pm SD$ (n)	A/X $X \pm SD$ (n)	B/X $X \pm SD$ (n)
út +E <sub>2</sub>	$1.90 \pm 0.56$ (8)	-	-
C4-HD +	$1.27 \pm 1.59$ (4)	-	-
C4-HD -	$1.98 \pm 0.46$ (2)	1.22 (1)	0.97 (1)
C4-HI	$1.83 \pm 1.09$ (4)	$4.05 \pm 1.39$ (3)	0.59 (1)
CC4-HD +	$1.39 \pm 0.51$ (2)	-	-
CC4-HI-	1.23 (1)	$2.52 \pm 0.30$ (2)	6.92 (1)

(-) No se observó isoforma X en una cantidad que merezca ser tenida en cuenta.

**Tabla 7:** Proporción de isoformas del RP en la familia C4 y útero pretratado con E<sub>2</sub> ( $\bar{E}_1 + E_2$ ). Los datos se obtuvieron a partir de la integración de las bandas con el programa Collage © Image Analysis Software. En los casos donde se indica un solo valor este es representativo de otros tres experimentos que faltan ser cuantificados. La diferencia en la intensidad de las bandas se observó pero aún no han sido cuantificadas.

**Se puede concluir que en la familia C4:**

- a) El patrón de expresión de isoformas es similar entre el tumor PD en ausencia de MPA y las variantes PI, aunque en estas últimas la intensidad de la banda X es mucho más marcada.
- b) La banda X desaparece cuando los tumores PD son tratados con MPA.
- c) Las dos bandas inespecíficas de 69 kDa aparecen más intensas en los tumores PI.

**ii) Familia 59:**

Las bandas correspondientes a las isoformas A, B y X están presentes en todos sus miembros excepto en el tumor 59-HI, con un PM dentro del rango ya descripto (tabla 8). En este tumor, cuya expresión de isoformas es atípica se puede notar (Figura 8, calle 1) que la isoforma B está presente con una intensidad muy baja y en algunos casos no detectable, la isoforma A no está presente pero sí la X con un PM aproximado de 77 kDa (tabla 8). Por otra parte la otra variante PI, el 59-2-HI tiene un patrón de bandas muy similar al 59-HD en ausencia de MPA, aunque a igual de lo que ocurría con las variantes PI de la familia C4, la banda aparentemente inespecífica de 69 kDa es mucho más intensa que en los PD. El tratamiento con MPA en esta línea no siempre elimina completamente la banda X como ocurría con C4 (ver Figuras 8 calles 3 y 4 y Figura 9, calles 5 y 6), y sí regula negativamente la expresión de la isoforma B.. Tomando todas las bandas correspondientes a RP, la regulación negativa por MPA es muy marcada.

En la Tabla 8 se muestran los PM de las isoformas obtenidas de distintos experimentos.

Tumores	B $X \pm SD$ (n)	A $X \pm SD$ (n)	X $X \pm SD$ (n)
59-HD +	117.48 ± 27 (5)	84.72 ± 3.60 (5)	80.82 ± 3.14 (4)
59-HD -	114.20 (1)	81.40 (1)	76.10 (1)
59-HI	114.35±4.17 (2)	-	76.87 ±4.00 (6)
59-2-HI	115.73±4.15 (3)	81.80 ± 1.90 (4)	78.80 ± 5.94 (2)

(-) No tiene bandas detectables con esta técnica.

**Tabla 8:** Pesos moleculares (PMs) medios de las distintas isoformas del RP correspondientes a la familia 59. Los mismos se obtuvieron con el programa Collage ® Image Analysis Software. Todos los tumores se ensayaron al menos tres veces, en los casos donde sólo se indica un valor debe tenerse en cuenta que el experimento se repitió también tres veces. Las bandas están presentes pero los datos obtenidos aún no fueron cuantificados.

En la Tabla 9 se muestra la relación entre las isoformas de los tumores en distintos experimentos.

tumores	A/B $X \pm SD$ (n)	A/X $X \pm SD$ (n)	B/X $X \pm SD$ (n)
59-HD +	6.37 ± 3.02 (3)	2.96 (1)	0.96 ±0.19 (3)
59-HD -	0.96 (1)	2.33 (1)	2.44 (1)
59-HI	ND	-	ND
59-2-HI	0.96 ± 0.16 (2)	1.27 (1)	1.49 (1)

ND Los valores no pudieron ser determinados porque parecería haber solo isoforma X presente, si bien hay casos donde la isoforma B es muy tenue.

(-) No se observó la isoforma A.

**Tabla 9:** Proporción de isoformas del RP en la familia 59. Los datos se obtuvieron a partir de la integración de las bandas con el programa Collage ® Image Analysis Software. En los casos donde se indica un solo valor los experimentos se repitieron, la diferencia en la intensidad de las bandas se observó pero aún no han sido cuantificadas.

**Se concluye que en la familia 59:**

- Hay una variante PI (59-2-HI) que tiene un patrón de expresión de bandas muy similar a la variante PD en ausencia de MPA y otra variante PI (59-HI) la cual expresa la banda X y no la correspondiente a la isoforma A,

- b) El tratamiento con MPA regula negativamente la expresión de todas las isoformas, en especial la B y la X.
- c) La banda inespecífica de 69 kDa es más intensa en el tumor 59-2-HI.

### iii) Tumor 53-HD:

En la Figura 9, calles 7 y 8, se puede observar que se expresan las 3 bandas correspondientes a las isoformas B, A y X. En los tumores sin tratar con MPA la intensidad es mayor en la X que en la A y esta proporción se invierte en los tumores tratados con la hormona. También se nota una regulación negativa por MPA y se observa que la banda de 69 kDa está presente con mayor intensidad cuando el tumor crece en ausencia del progestágeno (fig.10 calles 7 y 8). En la Tabla 10 se observan los PM obtenidos en distintos experimentos.

tumores	B X ± SD (n)	A X ± SD (n)	X X ± SD (n)
53-HD +	117.7 ± 2.54 (4)	80.47 ± 2.45 (3)	75.20 (1)
53-HD -	118.00 ± 2.97 (2)	83.10 ± 0.99 (2)	76.40 (1)

**Tabla 10:** Pesos moleculares (PM) medios de las distintas isoformas del RP correspondientes al tumor 53. Los mismos se obtuvieron con el programa Collage ® Image Analysis Software Cada tumor se ensayó por lo menos por duplicado.

En la Tabla 11 se muestran las proporciones entre las isoformas en distintos experimentos.

	A/B X ± SD (n)	A/X X ± SD (n)	B/X X ± SD (n)
53-HD +	1.2 (1)	1.82 (1)	-
53-HD -	0.31 (1)	0.13 +/- 0.156 (2)	0.40 (1)

(-) la isoforma X está presente pero aún no se ha determinado su intensidad.

**Tabla 11:** Proporción de isoformas del RP en el tumor 53. Los datos se obtuvieron a partir de la integración de las bandas con el programa Collage ® Image Analysis Software. En los casos donde se indica un solo valor los experimentos se repitieron, la diferencia en la intensidad de las bandas se observó pero aún no han sido cuantificadas

**Se concluye que los tumores 53-HD tienen una expresión de bandas similar a las familias C4-HD y 59-HD, siendo más intensa la banda X en tumores obtenidos a partir de ratones sin tratar con MPA. El tratamiento con la hormona regula principalmente en forma negativa la expresión de esta isoforma.**

**iv) Familia de C7-HI y Bet:**

**Tumor C7-HI**

Como se ve en la Figura 10, calle 7, en este tumor no se detectó la isoforma A, sólo están presentes las isoformas B y X, esta última en mayor proporción (tabla 12).

**Familia Bet:**

Los resultados obtenidos con esta familia aún son preliminares. Tanto las variantes sensibles (Bet) como las resistentes al tratamiento estrogénico (Bet R) expresan aparentemente la isoforma X y no la A. La intensidad de esta banda es más fuerte en los tumores extraídos de animales tratados con estrógenos en el caso del tumor resistente (proporción B/X disminuye a la mitad en los tratados con E<sub>2</sub>). En el caso de la variante sensible Bet tratada con estradiol ( Bet + E<sub>2</sub>) la isoforma B parecería no expresarse y la X se observa en muy baja intensidad (Fig. 10 comparar calles 3 y 4). En la Tabla 12 se muestran los valores obtenidos para cada isoforma.

tumores	B X ± SD (n)	A X ± SD (n)	X X ± SD (n)
Bet + E <sub>2</sub>	ND	-	78-(1)
Bet	112.90 (1)	-	78(1)
Bet R +	116.90 (1)	-	78.2 (1)
Bet R -	116.90 (1)	-	78(1)
C7-HI	114.6±3.25 (2)	-	78.00 (1)

(-) No tiene bandas detectables con esta técnica.

**Tabla 12:** Pesos moleculares (PM) medios de las distintas isoformas del RP correspondientes a los tumores de la familia C7-HI y Bet. Los mismos se obtuvieron con el programa Collage ® Image Analysis Software. Todos los resultados de la familia Bet provienen de un solo experimento excepto el BET-R + que fueron 2 muestras (resultados preliminares).

**Estudios preliminares sugieren que los tumores C7-HI, Bet y Bet-R expresan la isoforma X pero no la A. El tratamiento estrogénico en los BET-R aumentaría la intensidad de esta isoforma.**

#### v) Tumores lobulillares:

Estudios bioquímicos demostraron que los tumores lobulillares inducidos por MPA no expresan RP, pero siempre cabía la posibilidad de que estuvieran presentes y truncados, o que no pudieran pegar el ligando. Como se observa en la Fig. 11, calles 5-8, las únicas bandas que aparecen en algunas muestras corresponden a marcación inespecífica. Como control se muestra un C4-HD+ y un C4-HI. Cabe destacar la fuerte intensidad de las bandas inespecíficas observadas en útero y los 2 controles positivos.

**Se concluye que los tumores lobulillares no tienen RP reconocibles por el anticuerpo hPR 7.**

#### vi) Líneas celulares:

Las tres líneas celulares surgidas a partir de cultivos primarios de un tumor PD (C4-L1 y C4-L2) y de otro PI (C7-HI) presentan bandas correspondientes al RP<sub>A</sub> y RP<sub>B</sub> (Fig. 12 calles 4, 5 y 6; tabla 14) con una proporción A: B entre 2.2 (C4-L1) y 2.6 (C7-L1). Un análisis cualitativo entre las

intensidades de las bandas de las tres líneas refleja una menor proporción de isoforma A y sobre todo B en la línea C4-L1.

Línea celular	B $X \pm SD$ (n)	A $X \pm SD$ (n)	X $X \pm SD$ (n)
C7-L1	115.90 (1)	85.10 (1)	-
C4-L2	118.50 (1)	85.00 (1)	-
C4-L1	117.40 (1)	85.00 (1)	-

(-)No tiene bandas detectables con esta técnica.

**Tabla 14:** Pesos moleculares (PM) medios de las distintas isoformas del RP correspondientes a las distintas líneas celulares obtenidas a partir de cultivos primarios. Los mismos se obtuvieron con el programa Collage ® Image Analysis Software Las tres líneas se ensayaron sólo una vez.

Se concluye que las líneas celulares logradas en el laboratorio a partir de un tumor PD y uno PI tienen una expresión similar de isoformas y a su vez similar a las que se observan en útero normal.

## **2- Respuesta *in vivo* a antihormonas de las líneas tumorales CC4-HI, 59-HI y 59-2-HI**

En el laboratorio ya se conoce que la línea C7-HI que hace 2 años regresionaba con el tratamiento con antiprogestágenos, ahora sólo detiene su crecimiento. En este trabajo se investigó la capacidad de responder a antiprogestágenos de la línea CC4-HI y de la 59-HI utilizando como control positivo de regresión la línea 59-2-HI.

En la Fig. 13A puede observarse que tanto los antagonistas de tipo 1 (onapristona) como los de tipo 2 (mifepristona) no tienen efectos sobre el crecimiento tumoral del tumor 59-HI con respecto al control, mientras que el tratamiento con E<sub>2</sub> indujo una regresión significativa del tamaño tumoral ( $p<0.01$ ) entre los días 5 y 50 después de haber comenzado el tratamiento.

En el caso del tumor CC4-HI, Figura 13 B, mientras el tratamiento con E<sub>2</sub> fue efectivo desde un principio en inhibir el crecimiento tumoral ( $p<0.05$ , a partir del día 5) ambos antiprogestágenos tardaron más tiempo, haciéndose manifiesto su efecto inhibidor recién 15 días después. A pesar de este retardo el efecto inhibidor es muy notorio.

En la Figura 13 C, se muestra el efecto de las mismas hormonas sobre la línea 59-2-HI, donde se observa que los 3 tratamientos son igualmente efectivos siendo significativas las diferencias de tamaño tumoral a partir del 4<sup>to</sup> día para las 3 hormonas ( $p<0.05$ ). También se puede observar que la respuesta es notable a partir del primer día para los estrógenos.

**Se concluye que el tumor 59-HI es resistente al tratamiento con antiprogestágenos siendo su comportamiento similar al de los tumores BET y BET-R con respecto a este parámetro. El tumor CC4-HI se considera sensible al tratamiento al igual que el 59-2-HI.**

### **3- Relación entre patrón de isoformas y respuesta a antiprogestágenos**

De los tumores estudiados, el 59-HI carece de isoforma A y presenta la isoforma X en todos los experimentos ( $n=6$ ) expresando, o no, la isoforma B. Este fue también el que demostró no responder a antiprogestágenos. En experimentos preliminares ( $n=1$ ) las líneas Bet y Bet-R, que en trabajos previos demostramos que eran resistentes a antiprogestágenos, parecen tener un patrón de bandas similar, donde la única banda que se observa es la correspondiente a la isoforma X. El tumor C7-HI en experimentos recientes demostró crecer más lentamente con mifepristona en lugar de regresionar y también demostró tener esta única banda X.

**Los resultados obtenidos sugieren una posible correlación entre la ausencia de la banda A y la falta de respuesta a antiprogestágenos. La banda B parecería estar o no presente, por lo tanto no parece estar asociada a este patrón de crecimiento.**

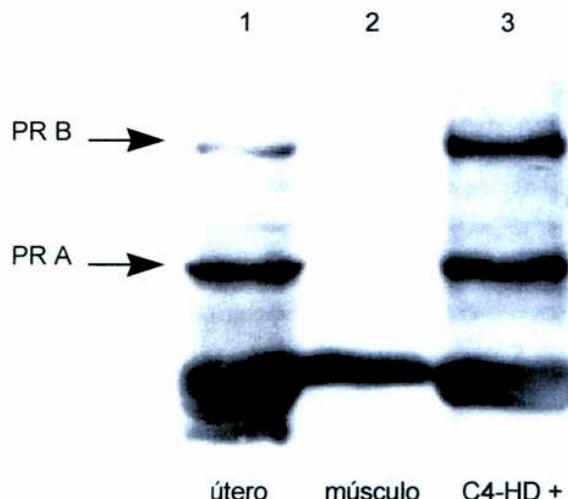


Figura 5: Western blot de extractos citosólicos de control positivo (úteros de hembras pretratadas con  $E_2$ ), control negativo (músculo de los mismos animales) y un tumor que se sabe expresa PR. Cada muestra (100 ug) se sembró en un hoyo y el gel se corrió durante 80 minutos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se visualizaron con el AcM hPRA-7 y reactivo quimioluminiscente. Se observan las isoformas A y B.

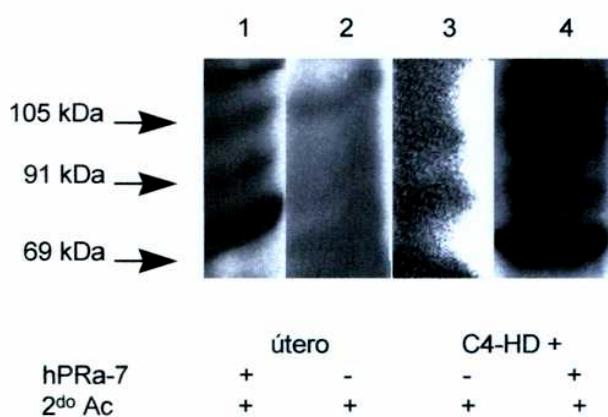
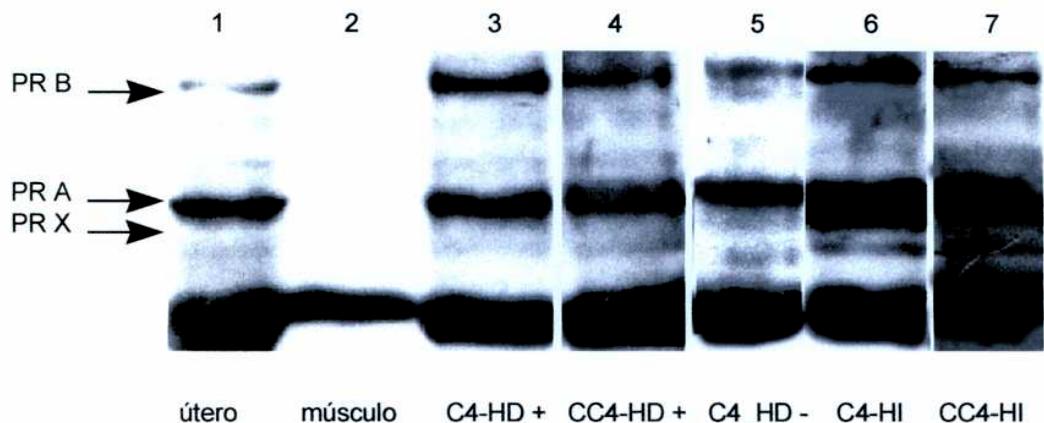
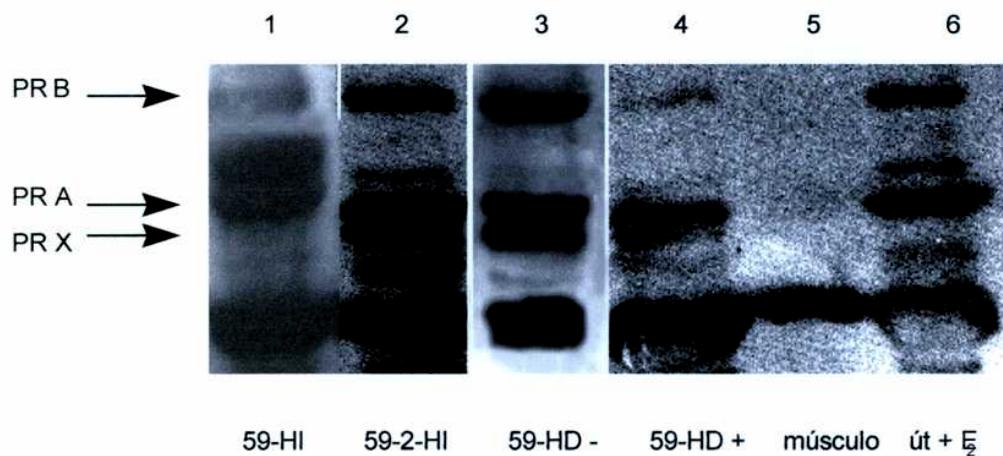


Figura 6: Control de inespecificidad del segundo anticuerpo. Los extractos, y condiciones de la electroforesis y revelado de la membrana son idénticos a la figura 5.



*Figura 7: Expresión de las distintas isoformas del PR en extractos citosólicos de tumores de la familia C4. Las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa se identificaron con el AcM hPRA-7. En cada hoyo se sembró igual cantidad de proteínas (100 ug) y es evidente que la banda de 69 kDa que da señal con el segundo anticuerpo solo está presente aquí también y con mayor intensidad en los tumores PI (C4-HI y CC4-HI).*



*Figura 8: Análisis de western blot del PR en extractos citosólicos de tumores de la familia 59. Los extractos se obtuvieron como se describe en materiales y métodos . Cada muestra (100 ug) se sembró en un hoyo y el gel se corrió durante 80 minutos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se visualizaron con el AcM hPRA-7 y reactivo quimioluminiscente. Se observa que el tumor 59-HI no tiene banda correspondiente a la isoforma A (PR A).*

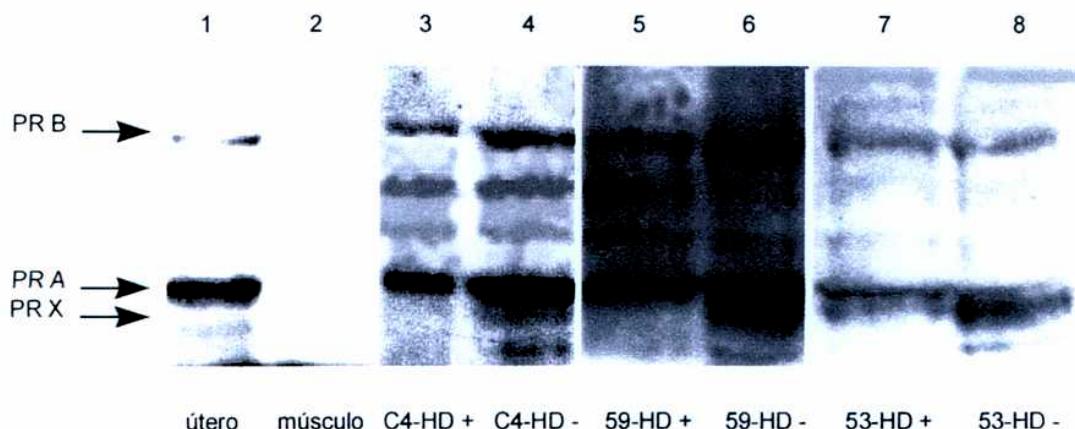


Figura 9: Regulación negativa del PR por MPA. Las muestras provenientes de tumores crecidos con MPA se designan como (+), las crecidas en ausencia del progestágeno como (-). Los tumores se crecieron con un depot de MPA pero a los (-) se les quitó el mismo una semana antes de preparar los extractos citosólicos. Se sembró 100 ug de proteínas por hoyo. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se visualizaron con el AcM hPRa-7 y reactivo quimioluminiscente. En todos los tumores se observa la regulación negativa por MPA.

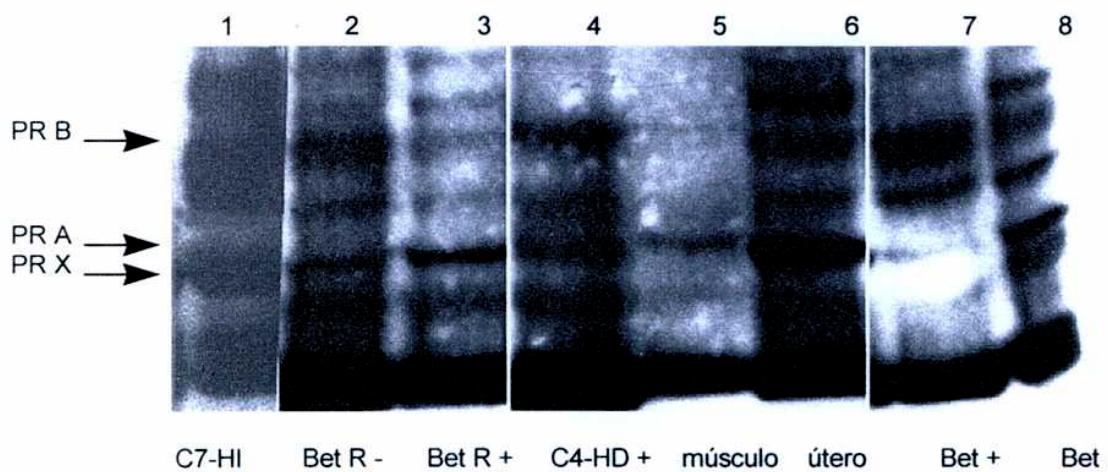
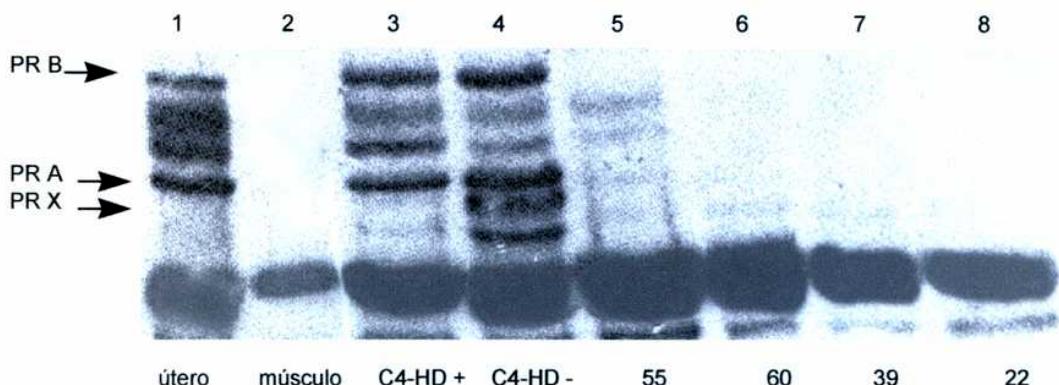
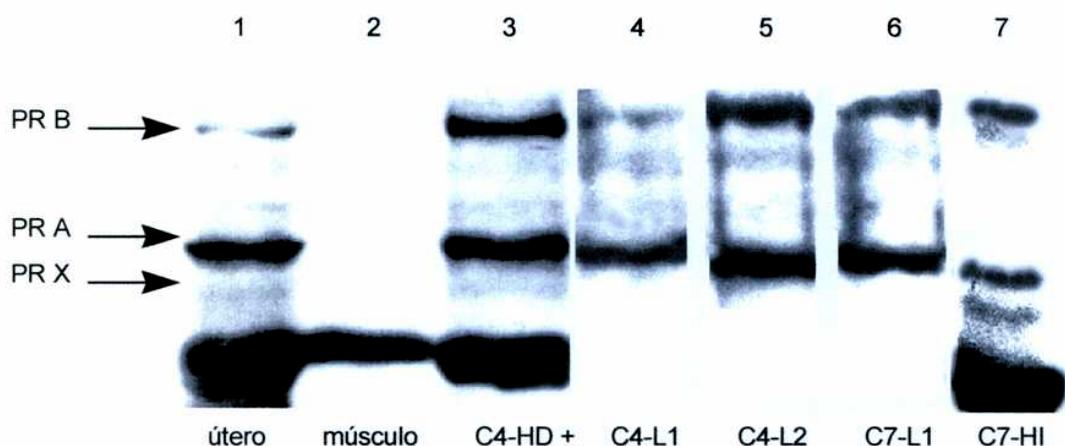


Figura 10: Análisis de las distintas isoformas del PR con la técnica de western blot en extractos citosólicos obtenidos de tumores de la familia Bet. Los geles se corrieron durante 90 minutos, luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El AcM utilizado para identificar las bandas fué h PRa-7. Los tumores marcados (+) crecieron con E<sub>2</sub> administrado en forma de pellets de silastic de 5 mg. En la calle 1 se puede observar que C7-H1 presenta una banda de gran intensidad comparada con las otras muestras que corresponde a la isoforma X.



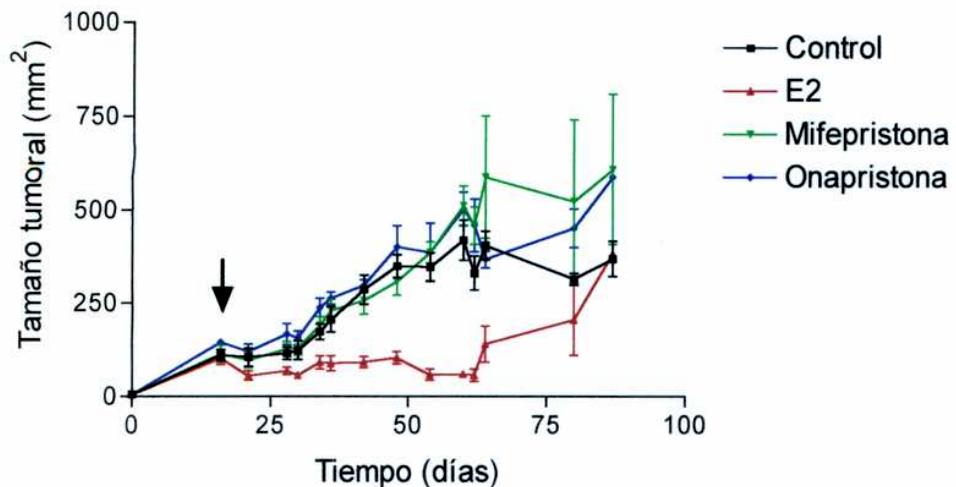
*Figura 11: Familia de tumores de origen lobulillar. Se estudió la expresión del PR en un western blot. Los extractos citosólicos se prepararon como se describió en materiales y métodos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se identificaron con el AcM h PRa-7 y reactivo quimioluminiscente. Nótese la completa ausencia de cualquiera de las isoformas del PR en las muestras de origen lobulillar comparadas con los controles positivos (útero y C4-HD). La banda de inespecífico que se observa tanto en músculo como en todos los demás extractos indica que si bien no se detectó el PR en las calles 5, 6, 7 y 8 se sembraron protáinas.*



*Figura 12: Identificación de las distintas isoformas del PR en líneas celulares obtenidas a partir de cultivos primarios de un tumor PD (C4-HD) y otro PI (C7-HI). Además del control positivo (útero) y negativo (músculo) se corrieron muestras de los tumores que originaron las líneas. Los extractos se realizaron a partir de cultivos celulares en los repiques R 18 para C7-L1, R 24 para C4-L2 y R 16 para C4-L2. Las células se levantaron con bufer de lisis (100 ul) y un rastriño. En todos los hoyos se sembró 100 ug de proteínas. El gel se corrió durante 75 minutos.*

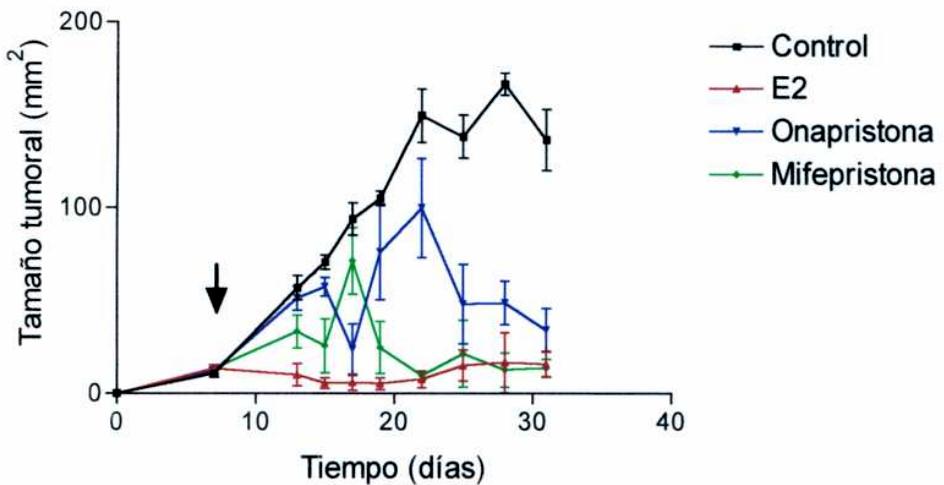
A.

Curva de Regresión Tumoral  
Línea 59-HI



B.

Curva de Regresión Tumoral  
Línea CC4-HI



C.

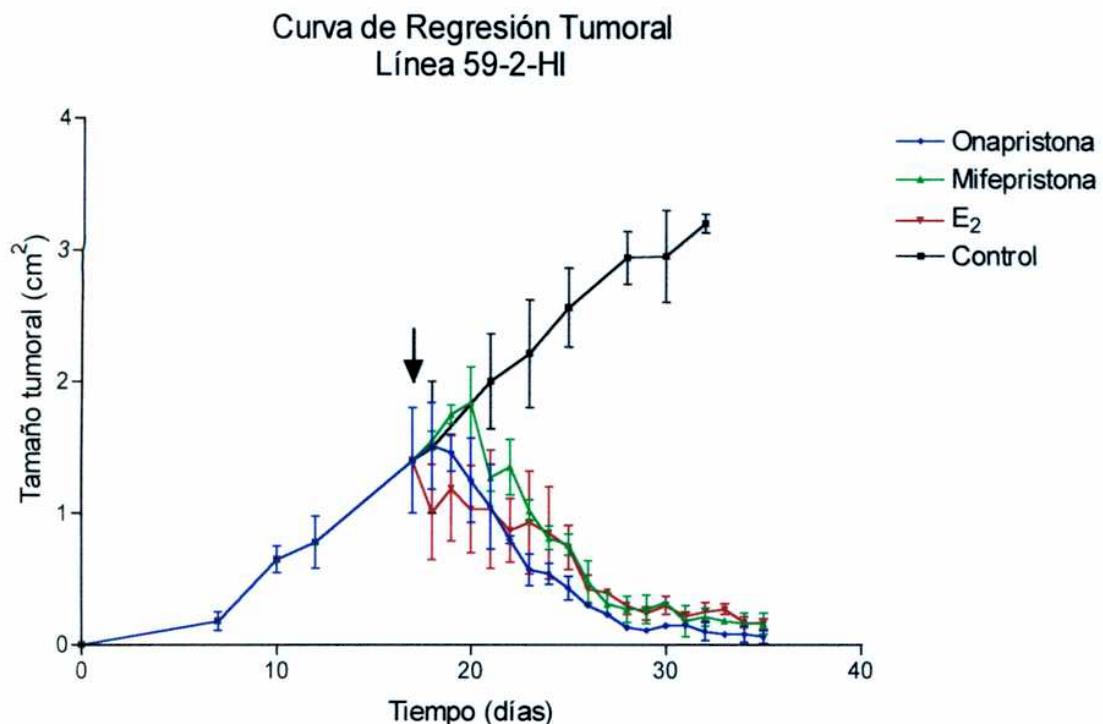


Figura 13: Regresión del tamaño tumoral en distintas líneas Pl. 59-HI (A), CC4-HI (B) y 59-2-HI (C). Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron un tamaño homogéneo, los animales se dividieron en grupos de 3 o 4 y luego se comenzaron los distintos tratamientos (↓). Tanto mifepristona como onapristona se administraron diariamente en forma sc. en concentraciones de 6.75 mg / Kg de peso y 10 mg / Kg de peso respectivamente. El 17-β-estradiol (E<sub>2</sub>) se administró como pellets de silastic de 5 mg.

# DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la presencia de las isoformas A y B en la mayoría de las líneas tumorales obtenidas a partir de adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. Se ha reportado que estas isoformas podrían tener efectos fisiológicos diferentes y que la proporción relativa entre ambas también estaría relacionada con los efectos diferenciales que ejerce la progesterona en distintos tejidos (*Graham et al, 1997*). En el humano está descripta una proporción de isoformas A: B de 1:1(*Graham et al, 1995*), mientras que en el ratón *Schneider et al (1991)* describen una proporción 3:1 tanto para el útero como para la mama normal. En nuestros experimentos usando úteros tratados con E<sub>2</sub> se obtuvo una proporción 2: 1. Debido a que es mucho más sencillo trabajar con útero de ratón que con tejido mamario y teniendo en cuenta que el patrón de bandas es exactamente igual entre ambos (*Schneider et al, 1991*), decidimos utilizar en todos los experimentos útero de ratón como control positivo.

Además de las isoformas descriptas A y B, también detectamos en la mayor parte de los tumores PD en ausencia de MPA (principalmente en las líneas 53 y 59) y en las PI respondedoras a antiprogestágenos, una tercer banda la cual denominamos isoforma X cuyo PM corresponde aproximadamente a 78 kDa. Recientemente, *Graham et al, 1995*, en un estudio caracterizando las isoformas de RP de 202 tumores humanos RP+ demostraron la presencia de una banda coincidente de 78 kDa en el 25.7% de las muestras y sugieren que podría tratarse de una variante de RP. En estos estudios no se hizo ninguna correlación entre respuesta a terapia, y presencia de esta banda. Analizando nuestros datos se podría sugerir que en nuestro modelo la presencia de esta banda en conjunción con la isoforma A sería un buen indicio de respuesta favorable a antiprogestágenos. Cabe destacar que un tumor que fue estudiado repetidas veces, el 59-HI que no responde a antiprogestágenos, carece de la banda A y expresa la X. Resultados preliminares obtenidos en otros 2 tumores similares en cuanto a la falta de respuesta a antiprogestágenos, tienen el mismo patrón de bandas. El tumor C7-HI que responde sólo retardando su crecimiento en presencia de antiprogestágenos también carece de la isoforma A pero expresa la X.

La isoforma B estuvo siempre presente en todos los tumores, excepto en algunas muestras del 59-HI y de Bet. En este trabajo no se consideraron las posibles diferencias

entre posicionamiento de esta banda entre tumores tratados con MPA y sin tratar con MPA porque el número de muestras cuantificadas no alcanza para un análisis estadístico adecuado. En general la tendencia es que en los tumores tratados con MPA la banda es un poco superior a la correspondiente en los animales no tratados, lo cual sería coherente con un pequeño desplazamiento hacia arriba debido a fosforilaciones. Ocasionalmente también se detectaron dupletes en esta banda. En este momento se están repitiendo estos experimentos para poder cuantificar y analizar estas posibles diferencias.

Con respecto a la isoforma C, recientemente descripta en tejidos humanos (Wei et al, 1997), no podemos identificarla con este anticuerpo ya que el PM de la isoforma C (60 kDa) coincide con el de albúmina y esta proteína es inmunoreactiva para este anticuerpo (Shyamala et al 1990).

En trabajos previos (Lanari et al, 1998) ya habíamos demostrado que el MPA inducía una regulación negativa de los RP. En este trabajo de Seminario se confirman estos resultados y además se ve que esta regulación es un poco diferente en los distintos tumores PD. En los tumores C4-HD y 53-HD la isoforma que disminuye principalmente es la A en cambio en el 59-HD hay una disminución más marcada de la B y X , y en menor proporción de la A. Nuevamente se requiere un número de muestras más grande para hacer el análisis estadístico correspondiente. En humanos se ha decripto que existe una proporción equimolar de isoformas (Scheridan et al, 1989) y se propone que los progestágenos inducirían una regulación negativa de ambas (Feil et al, 1988). Por otra parte los estrógenos, los reguladores principales del RP, inducirían un aumento de isoforma B disminuyendo la proporción relativa entre A y B (Graham et al, 1995).

El tumor Bet-R difiere de la línea parental Bet en su respuesta a los estrógenos. El Bet regresiona con el tratamiento estrogénico, mientras que el Bet-R no altera su crecimiento en presencia de E<sub>2</sub>. Este patrón de respuesta diferencial no se ve reflejado en cambios observables de patrón de bandas del RP. Al tratarlo con E<sub>2</sub> se vió un aumento en la intensidad de la banda X. Si bien se ensayaron sólo 2 muestras, éstos resultados son coincidentes con los resultados bioquímicos donde demostramos que los E<sub>2</sub> aumentan

significativamente la expresión de los RP por la técnica bioquímica (Montecchia et al, enviado a publicar). Los resultados obtenidos con Bet tratado con E<sub>2</sub> muestran que habría una disminución de RP. Por técnicas biquímicas se demostró que los estrógenos pueden estimular o inhibir la expresión de RP según el grado de regresión tumoral. Para establecer alguna conclusión debemos repetir estos estudios en paralelo realizando la técnica bioquímica.

Se ha planteado que en ocasiones receptores truncados podrían estar permanentemente activados simulando la acción del ligando (Fuqua et al, 1991). En este caso estos tumores serían negativos por técnicas de *binding*. En el laboratorio también tenemos líneas de tumores inducidos por MPA de histología lobulillar que no expresan receptores de progesterona cuantificados por la técnica bioquímica. Los estudios realizados en este trabajo demuestran claramente la ausencia de isoformas A,B y X que sean inmunoreactivas en estos tumores. Para descartar por completo esta hipótesis se deberían usar anticuerpos que reconocieran otros epitopes.

Por último hemos estudiado la expresión de estas isoformas en líneas celulares que se están desarrollando en el laboratorio. Fue curioso notar que tanto las 2 líneas derivadas de C4-HD como la línea derivada de C7-L1 tuvieran un patrón de expresión idéntico. Cabe recordar que la isoforma X está presente muy tenue sólo en alguna de las muestras de C4-HD en ausencia de MPA y el patrón que se observa es muy similar al C4-HD+ o sea sin la isoforma X. El tumor C7-HI por otra parte del cual deriva la línea C7-L1, tenía ausente la isoforma A y sólo mostraba la X. En el Western Blot que mostramos, si bien es de un solo experimento se ve claramente que es la isoforma A la que está presente y no la X. Estos resultados nos llevarían a pensar que la expresión de una u otra isoforma estaría dada por mecanismos regulatorios. Es difícil pensar en fosforilaciones ya que la diferencia de PM entre 78 y 83 es bastante considerable. Los extractos de las líneas celulares se hicieron preincubando las mismas durante 48 hs con medio de cultivo en presencia de 2.5% de suero adsorbido con carbón para evitar una posible regulación por hormonas.

Se ha reportado que los receptores de esteroides puede ser activados por otras vías de transducción de señales sin necesidad de que el ligando natural esté presente. Por ejemplo se ha demostrado que EGF puede tener efectos estrogénicos (Ignar-Trowbridge, 1992) y que el RP puede ser activado por AMPc, siendo en este caso la isoforma involucrada la B (Edwards *et al*, 1993). Resultados recientes de nuestro laboratorio sugieren que el RP está involucrado en el crecimiento tumoral en algunas líneas de crecimiento PI como la 59-2-HI donde oligonucléidos antisentido dirigidos contra el sitio de iniciación de la traducción de la isoforma A del RP inhiben el crecimiento (Tesis de Licenciatura de C. Lamb). Habíamos sugerido que en estos tumores los RP estarían activados por alguna otra vía. El patrón diferente observado en los tumores HD creciendo con MPA con respecto a la variante PI sugeriría que este crecimiento no se debería a un aumento de sensibilidad de progestágenos circulantes o síntesis de progesterona endógena.

Un resultado curioso que merece ser estudiado es que en muchas muestras de tumores PI aparecieron muy intensas las bandas de 105, 91 y 69 kDa que corresponden a bandas inespecíficas del 2<sup>do</sup> anticuerpo. Estos podría deberse a que: a) el segundo anticuerpo cruza con alguna proteína cuya expresión es regulada en ciertos tumores, b) estamos identificando bandas que corresponden a RP, pero su PM coincide con el de una proteína inespecífica y c) que ambas ocurran. Esto se investigará en próximos experimentos cambiando el segundo anticuerpo utilizado.

En resumen, en este trabajo se demuestra por primera vez la expresión de isoformas de RP en adenocarcinomas mamarios murinos; se observa una tercer banda compatible con una variante de RP que está presente en la mayoría de los tumores. Resultados preliminares sugieren que la ausencia de isoforma A parecería estar asociada a la falta de respuesta a antiprogestágenos. El tratamiento hormonal regularía diferencialmente la expresión de las distintas isoformas en diferentes tumores.

# **CONCLUSIONES**

- Logramos definir las condiciones experimentales para lograr cuantificar la expresión de isoformas de RP por western blots en tejidos murinos.
- Demostramos la presencia de la isoforma B de PM 115 kDa, de la isoforma A de PM 83 kDa y de una “isoforma” de menor PM correspondiente a 78 kDa que hemos llamado X .
- Los datos obtenidos sugieren que el tratamiento con MPA en los tumores PD regulan negativamente la expresión de la isoforma X en los tumores que la expresan (59-HD y 53-HD), la isoforma A (C4-HD, 59-HD y 53-HD) y a la B, principalmente en las líneas 53-HD y 59-HD y en menor magnitud en la C4-HD.
- Las variantes PI respondedoras a antiprogestágenos presentan un patrón de bandas similar a las variantes PD en ausencia de MPA (tumor 59-2-HI) o con mayor intensidad en la banda X (tumor CC4-HI).
- Demostramos la ausencia de la isoforma A en el tumor 59-HI que demostró ser resistente al tratamiento con antiprogestágenos. El hecho de que resultados preliminares con otros tumores que también son resistentes a antiprogestágenos indicarían que éstos carecerían de la isoforma A, sugiere el compromiso de esta isoforma en la respuesta a antihormonas.
- Demostramos una correspondencia entre los resultados obtenidos por la técnica bioquímica y los western blots en cuanto a la regulación hormonal con MPA y E<sub>2</sub> y en cuanto a la ausencia de RP en tumores lobulillares.
- Demostramos la expresión similar de isoformas A y B en líneas celulares obtenidas a partir de un tumor PD y de uno PI.

**En este trabajo se demuestra en adenocarcinomas mamarios murinos la presencia de las 2 isoformas clásicas descriptas para el RP (A y B) además de una de menor PM presente en algunos tumores. Los resultados obtenidos, si bien son preliminares, sugieren por primera vez una correlación entre expresión diferencial de isoformas y hormono-dependencia.**

# BIBLIOGRAFÍA

68,1989.

1. Anderson TJ, Battersby S, Macintyre CCA. Proliferative and secretory activity in human breast cancer during natural and artificial menstrual cycles. *Am. J. Pathol.*, 130: 193-204, 1988.
2. Bai W, Weigel NL. Phosphorilation of ser<sup>211</sup> on the chicken progesterone receptor modulates its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, 271:12801-12806, 1996.
3. Beck CA, Zhang Y, Weigel NL, Edwards DP. Two types of antiprogestins have distinct effect on site specific phosphorylation of human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 271:1209-1217, 1996.
4. Boyd-Leinen P, Fournier D, Spelsberg TC. Nonfunctioning progesterone receptors in the developed oviducts from estrogen withdrawn immature chicks and in aged nonlaying hens. *Endocrinology*, 111:30-36, 1982.
5. Campio L, Robustelli Della Cuna G, Taylor R W (eds). Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine-related tumors. In: *DNA flow cytometry of the endometrium*. New York: Raven Press, 2:7-14.
6. Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. Review. *Trends Biochem. Sci.*, 20:117-122, 1994.
7. Carson MA, Tsai MJ, Conneely OM, Maxwell BL, Clark JH, Dobson AD, Elbrecht A, Toft DO, Schrader WT, O'Malley BW. Structure-function properties of chicken progesterone receptor A synthesized from complementary DNA. *Mol. Endocrinol.*, 1:791, 1987.
8. Chauchereau A, Cohen-Solal K, Jolivet A, Baily A, Milgrom E. Phosphorilation sites of ligand-induced and ligand-independent activation of the progesterone receptor. *Biochemistry*, 33:13259-13303, 1994.
9. Chauchereau A, Loosfelt H, Milgrom E. Phosphorilation of transfected wild type and mutant progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 266:18280-18286, 1991.
10. Conneely OM, Dobson AD, Tsai MJ, Beattie WG, Toft DO, Huckaby DS, Zarucki T, Schrader WT, O'Malley BW. Sequence and expression of a functional chicken progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*, 1:517-525, 1987.
11. Conneely OM, Kettelberger DM, Tsai MJ, Schrader WT, O'Malley BW. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J. Biol. Chem.*, 264:14062-14064, 1989.
12. Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT, O'Malley BW. The A and B isoforms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149:493-501, 1987.
13. Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.*, 19:470-473, 1994.
14. Davis RJ. Trends. *Biochem. Sci.*, 19:470-473, 1994.
15. Denner LA, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL. Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.*, 265:16548-16555, 1990.
16. Denner LA, Weigel NL, Schrader WT, O'Malley BW. Hormone-dependent regulation of chicken progesterone receptor deoxyribonucleic acid binding and phosphorylation. *Endocrinology*, 125:3051-3058, 1989.

17. Denton RR, Koszewski NJ, Notides AC. Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequence on specific DNA binding. *J. Biol. Chem.*, 267:7263-7268, 1992.
18. Dran G, Luthy I, Molinolo AA, Montecchia MF, Charreau EH, Dosne Pasqualini C, Lanari C. Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 35:173-186, 1995.
19. Feil PD, Clarke CL, Satyswaroop PG. Progestin mediated changes in progesterone receptor forms in the normal human endometrium. *Endocrinology*, 123:2506-2513, 1988.
20. Garcia E, Bouchard P, De Brux J, Berdah J, Frydman R, Schaison G, Milgrom E, Perrot-Applanat M. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67:80-87, 1988.
21. García T, Jung-Testas I, Baulieu EE. Tightly bound nuclear progesterone receptor is not phosphorylated in primary chick oviduct cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:7573-7577, 1986.
22. Giguère V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 46:645-652, 1986.
23. Graham JD, Roman SD, Mc Gowan E, Sutherland RL, Clarke CL. Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 270:30693-30700, 1995.
24. Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken LS, Bilous AM, Clarke CL. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.*, 55:5063-5068, 1995.
25. Gronemeyer H, Turcotte B, Quirin-Stricker C, Bocquel MT, Meyer ME, Krozowski Z, Jeltsch JM, Lerouge T, Garnier JM, Chambon P. The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis. *EMBO J.*, 6:3985-3994, 1987.
26. Hames BD y Rickwood D. Gel electrophoresis of proteins, a practical approach ; Cap 1. IRL PRESS ; Oxford, Washington DC.1987.
27. Harris J.R., Lippman M.E., Veronessi U., Willet W. Breast cancer. Review articles. Medical progress. *New England Journal of Medicine*: first of three parts. 327 (1992) 319-328.
28. Harris J.R., Lippman M.E., Veronessi.U., Willet W. Breast cancer. Review articles. Medical progress. *New England Journal of Medicine*: second of three parts. 327 (1992) 390-398.
29. Henchuck TT, Walters MR. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [<sup>3</sup>H]R5020 photoaffinity labelling: evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology*, 120:1449-1456, 1987.
30. Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80:199-212, 1995.
31. Horwitz KB, Alexander PS. In situ photolinked nuclear progesterone receptor of human breast cancer cells: subunits molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology*, 113:2195-2201, 1983.
32. Horwitz KB, Tung L, Takimoto GS. Novel mechanisms of antiprogestin action. *Acta Oncologica* 35: 129-138, 1994.
33. Huckaby CS, Conneely OM, Beattie WG, Dobson AD, Tsai MJ, O'Malley BW. Structure of chromosomal chicken progesterone receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:8380-8384, 1987.

34. Jeltsch JM, Krozowski Z, Quirin-Stricker, Gronemeyer H, Simpson RJ, Garnier JM, Krust A, Jacob F, Chambon P. Cloning of the chicken progesterone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:5424-5428, 1986.
35. Kordon E, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH, Pazos P, Dran G, Lanari C. Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between hormone dependence and morphology. *Breast Cancer Res. Treat.*, 28:29-39, 1993
36. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
37. Lanari C, Kordon E, Molinolo A.A, Pasqualini CD, Charreau EH Mammary carcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: Hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int. J. Cancer.*, 43:845-850, 1989.
38. Lanari C, Kordon E, Molinolo AA, Elizalde P, Charreau EH Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int. J. Cancer*, 49:900-905, 1991.
39. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Cancer Lett.*, 33:215-223, 1986.
40. LeGoff P, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence. *J. Biol. Chem.*, 269:4458-4466, 1994.
41. Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Hancy AF, Green GL, Mc Carty KS. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67:334-340, 1988.
42. Mc Donnell DP, Goldman ME. Ru 486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.*, 269:11945-11949, 1994.
43. Mc Donnell DP, Shabaz MM, Vegeto E, Goldman ME. The human progesterone receptor A-form functions as transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 48:425-432, 1994.
44. Mester J, Baulieu EE. Progesterone receptors in the chick oviduct. Determination of the total concentration of binding sites in the cytosol and nuclear fraction and effect of progesterone on their distribution. *Eur. J. Biochem.*, 72:405-414, 1977.
45. Migliaccio A, Auricchio F. Hormone binding of estradiol 17  $\beta$ -receptor: evidence for its regulation by cytoplasmic phosphorylation and nuclear dephosphorylation. Prevention of dephosphorylation by antiestrogens. *J. Steroid Biochem.*, 15:369-376.
46. Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: Immunochemistry and hormonal receptors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 79:1341-1350, 1987
47. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature (London)*, 374:131-134, 1995.

48. Nardulli AM, Green GL, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology*, 122:935-944, 1988.
49. Nardulli AM, Katzenellenbogen BS. Progesterone receptor regulation in T47D human breast cancer cells: analysis by density labeling of progesterone receptor synthesis and degradation and their modulation by progestin. *Endocrinology*, 122:1532-1540, 1988
50. Nielsen CJ, Sando JJ, Pratt WB. Evidence that dephosphorylation inactivates glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:1398-1402, 1977.
51. Orti E, Mendel DB, Smith LI, Munck A. Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J. Biol. Chem.*, 264:9728-9731, 1989.
52. Pazos P, Lanari C, Meiss R, Charreau EH, Pasqualini CD. Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Breast Cancer Res. Treat.*, 20:133- 138, 1992.
53. Pekki A, Tuohimaa P. New freeze-dry and vapor fixation method for immunohistochemistry of soluble proteins. Subcellular localization of progesterone receptor. *J. Histochem. Cytochem.*, 37:1207-1213, 1989.
54. Pekki A, Ylikomi T, Syvälä H, Tuohimaa P. Progesterone receptor does not form oligomeric (8S), non-DNA-binding complex in intact cell nuclei. *J. Cell Biochem.*, 58:95-104, 1995.
55. Poletti A, Weigel NL. Identification of hormone-dependent phosphorylation site adjacent to the DNA binding domain of the chicken progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*, 7:241-246, 1993.
56. Prendergast P, Pan K, Edwards PD. Progesterone receptor induced bending of its target DNA: Distinct effects of the A and B receptor forms. *Mol. Endocrinol.*, 10:393-407, 1996.
57. Press MF, Udo JA, Greene GL. Progesterone receptor distribution in the human endometrium. *Am. J. Pathol.*, 131:112-124, 1988.
58. Rusconi S, Yamamoto KR. Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 6:1309, 1987.
59. Schrader WT, O'Malley BW. Progesterone-binding components of chicken oviduct. IV. Characterization of purified subunits. *J. Biol. Chem.*, 247:51-59, 1972.
60. Sheridan PL, Evans RM, Horwitz KB. Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J. Biol. Chem.*, 264:6520-6528, 1989.
61. Sheridan PL, Krett NL, Gordon JA, Horwitz KB. Human progesterone receptor transformation and nuclear down-regulation are independent of phosphorylation. *Molec. Endocr.*, 2:1329-1342, 1988.
62. Shi YE, Liu YE, Lippman ME, Dickson RB. Progestins and antiprogestins in mammary tumor growth and metastasis. In: Beier HM, Spitz IM (eds). *Progesterone antagonists in reproductive medicine and oncology*. Human reproduction. 9:1 New York: Oxford University Press, 162-173, 1994.
63. Shymala G, Schneider W, Schott D. Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology*, 126:2882-2889, 1990.

64. Sullivan WP, Beito TG, Proper J, Krco CJ, Toft DO. Preparation of monoclonal antibodies to the avian progesterone receptor. *Endocrinology*, 119:1549-1557, 1986.
65. Sullivan WP, Madden BJ, McCormick DJ, Toft DO. Hormone-dependent phosphorylation of the avian progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 263:14717-14723, 1988.
66. Sullivan WP, Smith DF, Beito TG, Krco CJ, Toft DO. Hormone-dependent processing of the avian progesterone receptor. *J. Cell Biochem.*, 36:103-119, 1988.
67. Syvälä H, Pekki A, Bläuer M, Pasanen S, Mäkinen E, Ylikomi T, Tuohimaa P. Hormone-dependent changes in A and B forms of progesterone receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 58:517-524, 1996.
68. Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature*, 333:185-188, 1988.
69. Vorherr H., Messer R. Breast cancer: Potentially predisposing and protective factors. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 130-335, 1978.
70. Wei LL, Norris BM, Baker C. An N-terminally truncated third progesteronereceptor protein PR<sub>C</sub>, forms heterodimers with PR<sub>B</sub> but interferes in PR<sub>B</sub>-DNA binding. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 62:287-297, 1997.
71. Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.*, 319:657-667, 1996.
72. Ylikomi T, Isola J, Ratia J, Vähä-Tahlo T, Tuohimaa P. Augmentation of progesterone receptor concentration by progesterone and estrogen treatment in chick oviduct. *J. Steroid Biochem.*, 20:445-447, 1984.
73. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL. Identification of a group of ser-pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*, 9:1029-1040, 1995.
74. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL. Identification of phosphorylation sites unique to the B form of the human progesterone receptor. *In vitro* phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, 269:31034-31040, 1994.

**Pág 10:**

**Primer párrafo:** renglón 5 corresponden las citas: (Wiegel, 1996; Giguère et al 1986).

**Segundo párrafo** renglón 3 correponden las citas: (Giguère et al 1986, Carson 1987); renglón 5: (Giguère et al 1986); renglón 7: ( Huckaby et al, 1987; Rusconi et al, 1987); renglón 10: (Horwitz et al, 1996); renglón 11 (García et al, 1988); renglón 13: (Conneely et al, 1989).

**Tercer párrafo:** renglón 6: (Beato et al, 1989).

**Página 11:**

**Primer párrafo:** renglón 1: (Carson et al, 1987); renglón 4: (Sullivan et al, 1988)

**Segundo párrafo:** renglón 2: (Carson et al, 1987); renglón 4: (Beck et al, 1992); renglón 5: (Lucibello et al, 1990; Allegretto et al, 1990) y (Chauchereau et al, 1994).

**Tercer párrafo:** renglón 3-4: (García et al, 1988; Lessey et al, 1988; Press et al, 1988); renglón 5 (Beck et al, 1996); renglón 8: (Horwitz et al, 1996; Tora et al, 1988); renglón 9: (Sheridan et al, 1989)

**Cuarto párrafo:** renglones 2-3: (Conneely et al, 1989; Jeltsch et al, 1986; Wei et al, 1997).

**Página 12:**

**Párrafo único:** renglón 3: (Denner et al, 1989); renglón 4: (Conneely et al, 1989); renglones 11-12 (Conneely et al, 1989); renglón 13: (Conneely et al, 1989).

**Página 13:**

Renglón 2: (Chauchereau et al, 1994; citado en Graham et al, 1997); renglón 5-6: (Horwitz et al, 1996; Mc Donnel et al, 1994 a y b); renglones 11-12: (Mc Donnel et al, 1994 a y b), renglón 13: (Horwitz et al, 1996), Mc Donnel et al, 1994 a y b); renglón 14: (Schneider et al, 1991); renglón 18: (Henchuk et al, 1987); renglón 21: ( Graham et al, 1995); renglón 23 (Sheridan et al, 1988); renglón 26: (Wei et al, 1994); renglón 29: (Horwitz et al, 1996).

**Segundo párrafo:** renglón 3: (Wei et al, 1997); renglón 4-5: (Feil et al, 1988); renglón 7: (Sheridan et al, 1989)

**Tercer párrafo:** renglón 2: (Sheridan et al, 1988); renglón 3: (Gronemeyer et al, 1987; Nardulli et al, 1988); renglón 5: (Ylikomi et al, 1984); renglón 8: (Sullivan et al, 1986); renglón 12: Syvala et al, 1996).

#### **Página 15:**

**Primer párrafo:** renglón 3: (Boyd-Leinen et al, 1982); renglón 4-5: (Mester et al, 1977); renglón 6: (Prendergast et al, 1996); renglón 8: (Sheridan et al, 1988); renglón 10: (Pekki et al, 1995; Nardulli et al, 1988).

**Segundo párrafo:** renglón 1-2 (Conneely et al, 1989); renglón 2: (Nielsen et al, 1977; Miglaccio et al, 1981); renglón 4: (Sheridan et al, 1989)...(Sullivan et al, 1988); renglón 8-9: (García et al, 1986; Conneely et al, 1989; Sullivan et al, 1988); renglón 11: (Denner et al, 1990).

**Tercer párrafo:** renglón 3: (Hill et al, 1995).

#### **Página 16:**

**Primer párrafo:** renglón 1: (Denner et al, 1990); renglón 1-2: (Sheridan et al, 1989; Zhang et al, 1994); renglón 2: (Chauchereau et al, 1991); renglón 3: (Denner et al, 1990); renglón 4: (Sheridan et al, 1989); renglón 6: (Orti et al, 1989); renglón 6-7: (Denton et al, 1992; Le Goff et al, 1994).

**Segundo párrafo:** renglón 3: (Denner et al, 1990; Poleti et al, 1993); renglón 4: (Cano et al, 1994; Davis et al, 1994); renglón 7: (Denner et al, 1990; Poleti et al, 1993); renglón 7: (Denner et al, 1990; Poleti et al, 1993); renglón 8: (Denner et al, 1990); renglón 12: (Zhang et al, 1994); renglón 14: (Zhang et al, 1995); renglón 15: (Zhang et al, 1994); renglón 17: (Prendergast et al, 1996).

#### **Página 17:**

**Primer párrafo:** renglón 2: (Nandi et al, 1995....); renglón 4: (citado en Lanari et al, 1997); renglón 5: (Schneider et al, 1989).

**Párrafo 2:** renglón 3: (Schneider et al, 1989); renglón 8: (Raynaud et al, 1986); renglón 10: (Klijin et al, 1990; Schneider et al, 1989); renglón 12: (Kahman et al, 1998)

- 1 Allegretto EA, Jansson T, Arguello A, Nagy JA, Beato M, Karin M. DNA-binding activity of AP-1 is increased through its interaction with Fos. *J Biol Chem* 42: 193-203, 1990.
- 2 Beato M, Chalopakis G, Schauer M, Stalev L. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 36: 737-747, 1990.
- 3 Graham JD, Clarke GL. Physiological action of progesterone in target tissues: 15-519. In: *Prog Prog Prostaglandins*.
- 4 Hartam S. Progesterone effects on deoxyribonucleic acid synthesis in normal mammary glands. *Endocrinology* 122: 464-479, 1982.
- 5 Kahmann S, Vaßen L, Klein-Hitpass L. Synergistic enhancement of PR<sub>a</sub>-mediated R486 and R5020 agonist activities through cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate represents a delayed primary response. *Molec End* 12: 2704-283, 1990.
- 6 Klijn JGM, Setyono-Han B, Sander HJ, Lamberts SWJ, De Jong FH, Deckers Foskens JA. Pre-clinical and clinical treatment of breast cancer with mifepristone. *Human Reproduction* 9: 181-189, 1994.
- 7 Kordon E, Guerri F, Molinolo A, Elizelde P, Charreau EH, Pasqualini CP, Munoz E, Plazaola A, Tello P, Aranda O. Effect of clomiphene citrate on LH&beta;-induced luteinization in the rat ovary. *Reproduction* 105: 101-107, 1994.

~~de~~ de erratas de Bibliografía

1. Allegretto EA, Smeal T, Angel P, Spiegelman BM, Karin M. DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos. *J Cell Biochem* 42: 193-206, 1990.
2. Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 32: 737-747, 1989.
3. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues 18: 502-519, 1997.
4. Haslam S. Progesterone effects on deoxyribonucleic acid synthesis in normal mouse mammary glands. *Endocrinology* 122: 464-470, 1988.
5. Kahmann S, Vaßen L, Klein-Hitpass L. Synergistic enhancement of PR<sub>B</sub>- mediated RU 486 and R5020 agonist activities through cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate represents a delayed primary response. *Molec End* 12: 278-289, 1998.
6. Kiljin JGM, Setyono-Han B, Sander HJ, Lamberts SWJ, De Jong FH, Deckers GH, Foekens JA. Pre-clinical and clinical treatment of breast cancer with antiprogestins. *Human Reproduction* 9: 181-189, 1994.
7. Kordon E, Guerra F, Molinolo A, Elizalde P, Charreau EH, Pasqualini CD, Montecchia F, Pazos P, Dran G, Lanari C. Effect of sialoadenectomy on MPA-induced Mammary carcinogenesis. Correlation between histology and EGF receptor content. *Int. J. Cancer* 59:196-203, 1994.
8. Lanari C, Montecchia MF, Pazos P, Simian M, Vanzulli S, Lamb C, Molinolo AA. Inducción de adenocarcinomas mamarios por progestágenos en ratones BALB/c. *Medicina* 57 (Supl II):55-69, 1997.
9. Lucibello FC, Slater EP, Joos KU, Beato M, Muller R. Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in Fos B. *EMBO J* 9: 2827-2834, 1990.
10. Molinolo A, Simian M, Vanzulli S, Pazos P, Lamb C, Montecchia MF, Lanari C. Involvement of EGF in medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary gland hyperplasia and its role in MPA-induced mammary tumors in BALB/c mice. *Cancer Letters* 126: 49-57, 1998.
11. Nandi S, Guzman R, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: A unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3650-3657, 1995.

12. Pazos P, Lanari C, Elizalde P, Montecchia F, Charreau EH, Molinolo AA. Promoter effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) in N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induced mammary tumors in BALB/c mice. *Carcinogenesis* 19: 529-531, 1998.
13. Raynaud JP, Ojasoo T. The design and use of sex steroid antagonists. *J Steroid Biochem* 25: 811-833, 1986.
14. Russo I, Gimotty P, Dupuis M, Russo J. Effect of medroxyprogesterone acetate on the response of the rat mammary gland carcinogenesis. *Brit J. Cancer* 59: 210-216, 1989.
15. Schneider M, Michna H, Nishino Y, El Etreby F. Antitumor activity of the progesterone antagonists ZK 98.299 and RU 38.486 in the hormone-dependent MXT mammary tumor model of the mouse and the DMBA- and the MNU- induced mammary tumor models of the rat. *Europ J of Cancer and Clinical Oncol* 25: 691-701, 1989.
16. Wei LL, Miner R. Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res* 54: 340-343, 1994.
17. Welsch C. Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles B. Huggins. *Cancer Res*. 45: 415-3443.

## Fe de Erratas

Todas las correcciones que aquí se indican fueron hechas en el manuscrito entregado en la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales.

### Agradecimientos:

Párrafo 1 (p.1), línea 4 (l.4). Donde dice: A Caro y Fer por haberme enseñado todos los "trucos" que a ellas tanto les costó aprender.

Debe decir: A Caro y Fer por haberme enseñado todos los "trucos" que a ellas tanto les costó aprender.

p.1, l.6. Donde dice: ...ambiente cálido y confortable para en donde es posible expresarse con total libertad.

Debe decir: ...ambiente cálido y confortable en donde es posible expresarse con total libertad.

p.6, l.1. Donde dice: ...Gisellpor su disposición....

Debe decir: ...Gisell por su disposición...

p.10, l.1. Donde cice: Sergio Iglesias.

Debe decir: Sergio Iglesias.

p.10, l.3. Donde dice: ...a el por el tiempo dedicado...

Debe decir: ...a él por el tiempo dedicado...

### Introducción:

Página 1 (pg.1), p.1, l.3. Donde dice: ...acetato de medroxiprogesterona (MPA) ((Lanari et al ...

Debe decir: ...acetato de medroxiprogesterona (MPA) (Lanari et al ...

pg.1, Figura 1. En el óvalo donde dice: Carcinomas lobulillares. RE+/-, RP+/-, PI, R-.

Debe decir: Carcinomas lobulillares. RE+/-, RP+/-, PI, R-.EGF +.

Pg.5, Tabla 1. En sensibilidad a hormonas para carcinomas lobulillares, donde dice: No retrogradan en respuesta a es-Trógenos.

Debe decir: No retrogradan en respuesta a es-trógenos.

Pg.9, p.1, l.2. Donde dice: ...de los estrógenos en el endometrio durante a primera parte del ciclo...

Debe decir: ...de los estrógenos en el endometrio durante la primera parte del ciclo...

pg.11, p.2, l.6. Donde dice: ...y Rel A(Milgrom *et al*, 1986)...

Debe decir: : ...y Rel A (Milgrom *et al*, 1986)...

pg.12, Figura 5. En el modelo del RP humano, debajo de cada dominio aparecen los siguientes números: 1, 16, 56, 63, 68 y 93. Estos corresponden a la cantidad de aminoácidos que forma cada dominio y por un error en la impresión no se ve el último dígito. Los números antes mencionados deben cambiarse por: 1, 165, 567, 633, 680 y 933.

pg.13, anteúltima línea. Donde dice: El PgR<sub>C</sub> solo abarca el segundo dominio de dedos de zinc, ...

Debe decir: El RP<sub>C</sub> sólo abarca el segundo dominio de dedos de zinc, ...

pg.14, l.4. Donde dice: (Satyswaroop.a *et al*, 1988).

Debe decir: (Satyswaroop *et al*, 1988).

pg.16, p,2, l.15. Donde dice: Algunos antagonistas como el mifepristona...

Debe decir: Algunos antagonistas como la mifepristona...

pg.17. p.1, l.5. Donde dice: ... (Etreby *et al*, 1991).

Debe decir: ... (El Etreby *et al*, 1991).

pg.17. p.2, l.10. Donde dice: ... (Etreby *et al*, 1989).

Debe decir: ... (El Etreby *et al*, 1989).

pg.20, p.3. l.2. Donde dice: Se utilizaron tumores ductales inducidos por MPA en el año 1985: familia C4, C7 y...

Debe decir: Se utilizaron tumores ductales inducidos por MPA en el año 1985: familia C4, C7, 53 y...

pg.20, p.4, l.2. Donde dice: Se usó el tumor C7-HI que crecía solo en presencia de MPA...

Debe decir: Se usó el tumor C7-HD que crecía solo en presencia de MPA...

pg.24, p.2, I.3. Donde dice: ...con un rastrillo en un volumen no mayor de...

Debe decir: ...con un rastrillo en un volumen no mayor de...

pg.24, última línea. Donde dice: Utero

Debe decir: Útero.

pg.25, p.2, I.3. Donde dice:...volumen de 0.5 ml...

Debe decir: ...volumen de 0.5 ml...

pg.25, p.5, I.5. Donde dice:...maximizada por todos los factores que influencian el grosor...

Debe decir: ...maximizada por todos los factores que influencian el grosor...

pg.27, p.1, I.6. Donde dice: ...acoplado a peroxidasa de rábano.

Debe decir: ...acoplado a peroxidasa de rábano.

Pg.27, tabla 4. Donde dice: 1er Ac-anti-h7PgR.

Debe decir: 1er Ac-anti-hPRa-7.

### Resultados:

pg.33, p.4, I.6. Donde dice: ..., 1:1500 (para el segundo AcM)...

Debe decir:..., 1:1500 (para el segundo anticuerpo políclonal)...

pg.35, p.1, I.6. Donde dice: ...para permitir no solo la separación...

Debe decir: : ...para permitir no sólo la separación...

pg.36, p.1, I.4. Donde dice: Ocasionalmente en el útero (1/7) y en C4-HD...

Debe decir: Ocasionalmente en el útero y en C4-HD...

pg.36, leyenda de la tabla 5. Donde dice: Pesos moleculares (PM) medios (en Kda) de las...

Debe decir: Pesos moleculares (PM) medios (en kDa) de las...

Donde dice: Cada tumor se ensayó al menos...

Debe decir: Cada tejido se ensayó al menos...

pg.37, p.2, I.2. Donde dice: ...en el tumor C4-HD + y C4-HD -es que la ...

Debe decir: ...en el tumor C4-HD + y C4-HD - es que la ...

pg.38, anteúltima línea. Dice: Las diferencias no son estadísticamente significativas (A : B disminuye... Pero no se puede decir si las diferencias son

estadísticamente significativas o no porque se trata de un único valor. Aún hace falta repetir estos experimentos para aumentar el número de la muestra, y entonces sí estaremos en condiciones de hacer las pruebas estadísticas correspondientes.

En todas las leyendas de las figuras en las que se muestran resultados de *western blot*. Donde dice PR, debe decir RP.

Figura 10. Leyenda. I.5. Donde dice: En la calle 1 se puede observar que C7-H1 presenta una...

Debe decir: En la calle 1 se puede observar que C7-H1 presenta una...

pg.42, p.1, I.1. Donde dice: ... (Fig. 10 comparar calles 3 y 4).

Debe decir: ... (Fig. 10 comparar calles 7 y 8).

Figura 11: Donde dice C4-HD -.

Debe decir C4-HI.

Figura 11. Última línea. Donde dice: ... 5, 6, 7 y 8 se sembraron protáinas.

Debe decir: ... 5, 6, 7 y 8, se sembraron proteínas.

pg.43. Tabla 14. La leyenda dice pesos moleculares medios de las distintas isoformas del receptor de progesterona. Pero no se trata de medias +/- SD sino de valores únicos.

pg.43, p.3, I.4. Donde dice: ... tratamiento con progestágenos.

Debe decir: ... tratamiento con antiprogestágenos.

Figuras:

Figura 8:

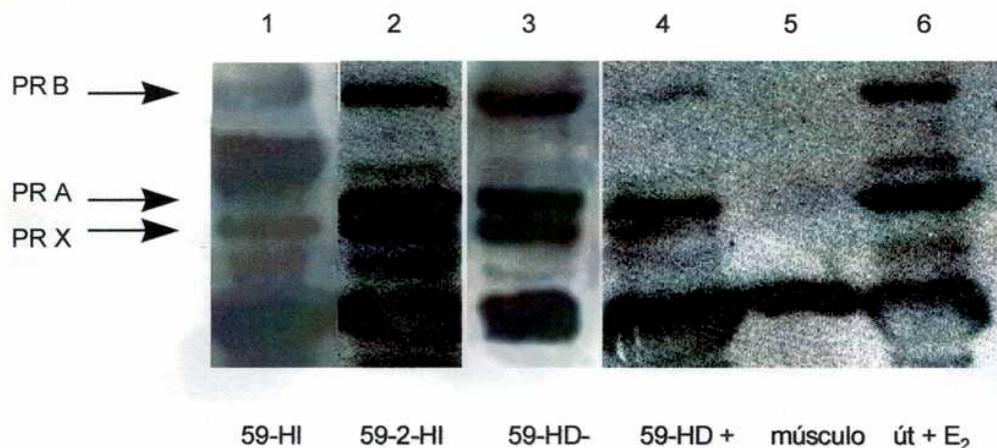


Figura 10:

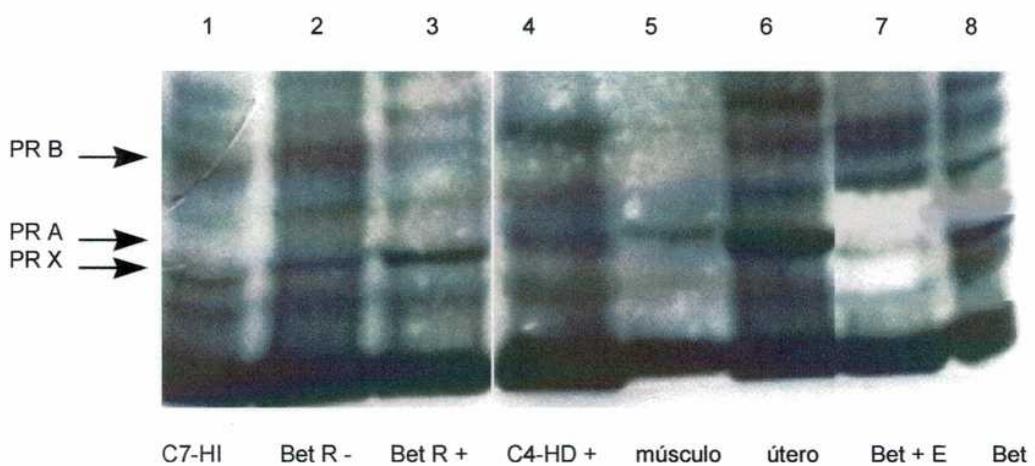


Figura 12:

