

Tesis de Posgrado

Influencia hormonal en el desarrollo del melanoma maligno humano

Morvillo, Verónica

1999

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en 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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Morvillo, Verónica. (1999). Influencia hormonal en el desarrollo del melanoma maligno humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3245_Morvillo.pdf

Cita tipo Chicago:

Morvillo, Verónica. "Influencia hormonal en el desarrollo del melanoma maligno humano". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3245_Morvillo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES



INFLUENCIA HORMONAL EN EL DESARROLLO
DEL MELANOMA MALIGNO HUMANO

Autor: Lic. Verónica Morvillo

Director: Dr. José Mordoh

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE
LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas

"Fundación Campomar"

-1999-

M. Morvillo

RESUMEN

El melanoma es una neoplasia que surge como consecuencia de la proliferación descontrolada de los melanocitos. El comportamiento de este tipo tumoral es impredecible dado que puede variar desde la regresión espontánea hasta una rápida progresión y muerte del portador del tumor. El aumento de la incidencia de esta enfermedad se halla entre las más altas, y hasta el momento no se han desarrollado terapias que sean realmente efectivas.

Varios estudios han demostrado que el desarrollo del melanoma de piel es más desfavorable en pacientes hombres que en mujeres, y que la supervivencia de las mujeres es considerablemente mayor.

Ha sido teóricamente propuesto que los andrógenos tienen un papel clave en el peor pronóstico masculino, y que una terapia con antiandrógenos podría tenerse en consideración en pacientes hombres con melanoma.

En este trabajo de Tesis se investigó, en primer lugar, la presencia de receptores androgénicos (RA) en el melanoma humano, se procedió luego a la caracterización bioquímica y biológica de los mismos y por último se analizó la influencia de la acción antiandrogénica en el curso clínico de esta enfermedad.

En los estudios realizados se utilizaron tres líneas derivadas de melanoma humano obtenidas en el laboratorio: IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. Los análisis de Scatchard de las tres líneas estudiadas, utilizando la unión del andrógeno sintético marcado RI881, revelaron la presencia de un solo tipo de receptor con una constante de disociación aparente (Kd) de 11 nM a 37 °C y una capacidad de binding de 326 fmol/mg de proteína, 58,4 fmol/10⁶ células o de 35.000 sitios por célula para IIB-MEL-J, una Kd de 15 nM a 37 °C y una capacidad de binding de 280,6 fmol/mg de proteína, 30,8 fmol/10⁶ células o de 18.500 sitios por célula en el caso de IIB-MEL-LES y Kd de 14 nM a 37 °C, capacidad de binding de 206,4 fmol/mg de proteína, 25,59 fmol/10⁶ células o de 15.400 sitios por célula en el caso de IIB-MEL-IAN.

Los estudios sobre la especificidad de la unión del ligando radiactivo a estos receptores, revelaron un comportamiento atípico de los mismos en las tres líneas analizadas. No sólo los andrógenos testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT), R1881 y el antiandrógeno hidroxiflutamida (OH-Flu) compitieron con [³H]-R1881, sino que estradiol (E₂), progesterona (Pg) y cortisol (F), a 500 X de exceso, también fueron capaces de desplazar la unión del esteroide sintético al RA.

A nivel inmunocitoquímico, no existieron evidencias de la presencia de receptores estrogénicos o de progesterona en las tres líneas de melanoma, mientras la inmunoreactividad para RA fue positiva en las tres líneas estudiadas. La tinción nuclear fue vigorosa, y la intensidad marcada, por encima del 70% de las células analizadas.

La presencia del RA fue analizada, además, en biopsias correspondientes a metástasis de melanomas provenientes de distintos pacientes. En todos los casos la reactividad obtenida con el anticuerpo monoclonal (AMC) AN1-15 fue positiva y la intensidad marcada.

Estudios *in vitro* sobre la acción de distintas hormonas y antihormonas revelaron que DHT, T, E₂, o Pg estimularon la proliferación celular de IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN mientras OH-Flu, casodex (Cas) o Tamoxifeno (Tam) la inhibieron significativamente.

La acción inhibitoria del crecimiento celular ejercida por los antiandrógenos también se manifestó *in vivo* cuando se utilizó flutamida (Flu) en ratones atímicos portadores de tumores. Estos animales mostraron una disminución significativa del crecimiento tumoral y un marcado aumento de la supervivencia respecto de animales controles o sometidos a distintas terapias.

Los resultados indican la existencia de RA en melanoma humano y un claro efecto protector por parte del antiandrógeno Flu.

Palabras claves: línea celular de melanoma, receptor androgénico, andrógeno, antiandrógeno, flutamida, ratones atímicos.

TITLE: Hormonal Influence on Development of Human Malignant Melanoma

AUTHOR: Lic. Verónica Morvillo

DIRECTOR: Dr. José Mordoh

INSTITUTION: Instituto de Investigaciones Bioquímicas, FCEyN y "Fundación Campomar"

ABSTRACT

Cutaneous malignant melanoma is becoming increasingly important in western countries due to its rising incidence, especially on the white population. A significant difference in survival between male and female patients has been reported, and the proportion of females cured was much greater than that of males. It has been theoretically proposed that an androgen dependency of melanoma could explain the longer survival time in women patients irrespective of the hormonal status of the female host.

To evaluate the presence of androgen receptors in human melanoma cell lines, Scatchard analysis was performed in whole cells with [³H]-R1881. IIB-MEL-J cells in culture revealed a single binding component with an apparent dissociation constant (K_D) at 37°C of 11 nM and a binding capacity of 326 fmol/mg protein, 58,4 fmol/10⁶ cells or 35.000 binding sites/cell. For IIB-MEL-LES cell, the K_D obtained was 15 nM at 37°C, with a binding capacity of 280,6 fmol/mg total cell protein, 30,8 fmol/10⁶ cells, or 18.500 binding sites/cell. IIB-MEL-IAN cells showed a K_D of 14 nM at 37°C with a binding capacity of 206,4 fmol/mg total cell protein, 25,59 fmol/10⁶ cells, or 15.400 binding sites/cell. Competition analysis revealed an atypical relaxation of specificity, since not only androgen testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), R1881 and antiandrogen hydroxy-flutamide (OH-Flu) competed for [³H]-R1881 binding, but also estradiol (E₂), progesterone (Pg), and cortisol (F) at 500-fold excess concentration.

Immunocytochemistry of human melanoma cell lines IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN was performed with monoclonal antibody anti-AR AN1-15. Cells lines were deeply stained, the intensity of the staining being high in the majority of specimen. When the same cells were tested with monoclonal antibodies raised against estrogen and progesterone receptors, no staining was found.

All of the specimens of melanoma metastases that were tested for the presence of AR were deeply stained, the intensity of the staining being high in the majority of the specimens.

Several hormones and antihormones were tested for their ability to stimulate cell proliferation on both cell lines with similar results. DHT, T, E₂ or Pg stimulate significantly cell proliferation, this increase being reversed by OH-Flu, casodex (Cas) or tamoxifen (Tam).

In addition, male and nude mice transplanted with IIB-MEL-J tumors were treated with flutamide (Flu) when tumors were palpable. Flu was effective in diminishing tumor growth and increasing survival rate of animals.

As a conclusion, the presence of functional androgen receptors in these cells has been demonstrated by growth inhibition *in vitro* and *in vivo* with antiandrogens.

In this study, we demonstrate a clear stimulation of cell proliferation by an androgen in human melanoma cell lines. The pure antiandrogen Flu showed an inhibitory effect on the cell growth in nude mice and a remarkable increase in survival rates of nude mice. Binding studies by Scatchard plot and competition studies showed the presence of androgen receptor with atypical sensitivity to different steroids. An interesting consequence of the present results is the possibility of clinical application of antiandrogen treatment to melanoma patients with androgen receptor.

Key words: melanoma cell line, androgen receptor, androgen, antiandrogen, flutamide, nude mice.

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| 1.- NEOPLASIA: DEFINICION Y CLASIFICACION DE TUMORES | 3 |
| 1.1.- Etiología del cáncer y heterogeneidad celular tumoral..... | 5 |
| 2.- CANCER Y SISTEMAS DE ESTUDIO..... | 7 |
| 2.1.- Cultivo de tejidos | 7 |
| 2.2.- Biopsias | 10 |
| 2.3.- Modelos animales..... | 10 |
| 3.- MELANOMA CUTANEO - BIOLOGIA DEL MELANOCITO Y DEL MELANOMA- OPCIONES DE TRATAMIENTO..... | 12 |
| 3.1.- Incidencia del melanoma..... | 13 |
| 3.2.- Histopatología del melanoma | 14 |
| 3.3.- Características clínicas del melanoma | 17 |
| 3.4.- Melanoma primario y metastático | 21 |
| 3.5.- Tratamiento del melanoma maligno humano | 23 |
| 3.6.- Influencia hormonal en el melanoma..... | 26 |
| 3.7.- Receptor androgénico, andrógenos y antiandrógenos | 27 |
| OBJETIVOS..... | 32 |
| RESULTADOS | 33 |
| 1.- DETERMINACION DE RECEPTORES ANDROGENICOS Y DE SU ESPECIFICIDAD EN LINEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO... 33 | |
| 2.- UNION DE [³ H]-E ₂ Y [³ H]-R5020 A CELULA ENTERAS IIB-MEL-J | 37 |

| | |
|---|----|
| 3.- MARCACION DE RECEPTORES DE ESTEROIDES EN LINEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO..... | 38 |
| 4.- EXPRESION DE RECEPTORES DE ANDROGENOS EN BIOPSIAS DE TEJIDOS TUMORALES Y NORMALES | 42 |
| 5.- DETERMINACION DEL EFECTO DE ANTIANDROGENOS Y ANDROGENOS SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR..... | 48 |
| 6.- ACCION ANDROGENICA Y ANTIANDROGENICA EN IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES E IIB-MEL-IAN | 51 |
| 7.- ACCIONES CRUZADAS DE ESTEROIDES Y ANTIESTEROIDES CON EL RECEPTOR ANDROGENICO DE IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES E IIB-MEL-IAN..... | 57 |
| 8.- EFECTO DE LA FLUTAMIDA SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DEL MELANOMA HUMANO <i>IN VIVO</i> | 63 |
| 9.- EFECTO DEL TAM Y ACCION COMBINADA DE FLU Y TAM SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DEL MELANOMA HUMANO <i>IN VIVO</i> | 69 |
| 10.- ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS DE ACCIONES CITOTOXICAS DE DROGAS EN RATONES ATIMICOS..... | 72 |
| 11.- EVALUACION DE LA ANGIOGENESIS DE TUMORES DE RATONES TRATADOS CON FLU, TAM O COMBINACION..... | 73 |
| DISCUSION | 74 |
| CONCLUSIONES..... | 84 |

| | |
|--|------------|
| MATERIALES Y METODOS | 86 |
| 1.- LINEAS CELULARES Y CULTIVO DEL STOCK | 86 |
| 1.1.- Líneas de melanomas humanos | 86 |
| 1.2.- Líneas de carcinomas mamarios humanos..... | 87 |
| 2.- CAPTACION DE [³H]-R1881 EN CELULAS ENTERAS Y ESTUDIOS DE COMPETENCIA..... | 87 |
| 3.- CAPTACION DE [³H]-E₂ Y [³H]-R5020 EN CELULAS IIB-MEL-J | 88 |
| 4.- DETERMINACION DE RECEPTORES HORMONALES | 89 |
| 4.1.- Inmunocitoquímica..... | 89 |
| 4.2.- Inmunohistoquímica..... | 92 |
| 5.- EXPERIMENTOS DE CRECIMIENTO CELULAR..... | 93 |
| 6.- ESTUDIO DE LA ACCION DE DROGAS ANTINEOPLASICAS Y DE LA ANGIOGENESIS <i>IN VIVO</i> | 94 |
| 6.1.- Tumores desarrollados a partir de IIB-MEL-J expandidas en cultivo de tejidos..... | 94 |
| 6.2.- Tumores desarrollados por transplantes..... | 94 |
| 6.3.- Evaluación de la angiogénesis..... | 95 |
| ABREVIATURAS..... | 96 |
| REFERENCIAS..... | 98 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 108 |

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El melanoma es una neoplasia que surge como consecuencia de la proliferación descontrolada de los melanocitos. Estos son células especializadas en la biosíntesis y transporte de la melanina.

El comportamiento de la neoplasia es impredecible dado que puede variar desde la regresión espontánea hasta una rápida progresión y muerte del portador del tumor.

El aumento de la incidencia de esta enfermedad se halla entre las más altas y hasta el momento no se han desarrollado terapias que sean realmente efectivas.

Un dato alarmante es el aumento de la incidencia del melanoma cutáneo así como el aumento de la mortalidad en la población blanca portadora de este tipo tumoral durante los últimos 30 a 50 años.

A pesar de los importantes avances realizados en los últimos años en relación con la detección y tratamiento del melanoma, poco se ha progresado en el manejo terapéutico de la enfermedad cuando ésta es detectada en estadios avanzados. Los mecanismos básicos involucrados en la iniciación y desarrollo del melanoma humano y su progresión maligna, son hasta el momento pobremente comprendidos.

El pronóstico de la enfermedad se ve afectado por factores clínicos e histológicos y por la localización anatómica de la lesión. El espesor y/o nivel de invasión del melanoma, índice mitótico, infiltración tumoral de linfocitos, ulceración o hemorragia en el sitio primario y el sexo del paciente son algunos de los factores que afectan el pronóstico de la enfermedad [León P., 1991].

Es por ésto que grandes esfuerzos en la investigación en melanoma están destinados a la búsqueda de nuevos indicadores que permitan predecir con mayor certeza la marcha de la enfermedad y, en lo posible, provean información acerca de la capacidad del tumor de responder a determinadas terapias antineoplásicas.

La clínica oncológica cuenta con una amplia gama de tratamientos disponibles como distintos esquemas quimioterapéuticos y regímenes que contienen combinaciones de agentes que pueden actuar sinérgicamente sobre las células tumorales.

No obstante, a pesar de la creciente complejidad en las terapias para melanoma, que incluyen diversos agentes citotóxicos y modificadores de la respuesta biológica, la supervivencia de los pacientes con enfermedad metastásica no ha mejorado en las últimas décadas.

En base a este conjunto de evidencias, resulta clara la necesidad de alcanzar un mayor conocimiento de la biología del melanoma y de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

Este trabajo de Tesis intenta ser un aporte al respecto, y se ha centrado principalmente en lograr una mejor comprensión del funcionamiento hormonal del melanoma humano y de sus implicancias, con el propósito de seleccionar algún tipo de terapia alternativa para el tratamiento de la neoplasia.

A continuación, y previo al desarrollo del trabajo experimental, se definen conceptos básicos empleados en este estudio, se presentan los sistemas corrientes de clasificación de neoplasias, los distintos modelos experimentales de trabajo utilizados en la investigación del cáncer, así como algunos aspectos teóricos relevantes y antecedentes que han servido de base a este trabajo de Tesis. También se señalan aspectos relativos a la regulación hormonal del melanoma, a la importancia que han tenido los receptores hormonales en el estudio del cáncer así como a las posibles aplicaciones clínicas de hormonas y antihormonas en la terapia antitumoral.

1.- NEOPLASIA: DEFINICION Y CLASIFICACION DE TUMORES

Las evidencias actuales indican que el cáncer es una enfermedad de origen genético que resulta de la acumulación de cambios a nivel del DNA, heredables ó no, en una célula. Estos cambios llevan a una proliferación descontrolada y a la capacidad de invadir tejidos adyacentes y colonizar otros órganos [Klein G., 1985; Vogelstein B., 1993; Fearon E.R., 1990]. La mayoría de las mutaciones que originan un cáncer son somáticas, sin embargo aproximadamente el 1% de todos los cánceres se dan en individuos que presentan una predisposición heredada a la enfermedad. Se ha reconocido que existen más de 100 tipos diferentes de cáncer. Cada uno de ellos posee un desarrollo característico, definido por la edad media de los individuos en los que aparece, el ritmo de crecimiento y la tendencia a extenderse y ser letal. Por ello, cada tipo puede ser considerado como una enfermedad distinta.

Dado que el crecimiento y renovación de los tejidos normales de un organismo está homeostáticamente controlado, los diversos tipos celulares ya diferenciados deben mantenerse en cantidad y posiciones relativas adecuadas. Una célula que pierde el control de la proliferación originará un **tumor** o **neoplasia**. Sin embargo, esto no necesariamente constituye un cáncer. De acuerdo a su comportamiento los tumores pueden ser clasificados en “**benignos**” o “**malignos**”:

1- Decimos que un tumor es **benigno** cuando las células neoplásicas permanecen circunscriptas a una única masa tumoral en el lugar de origen, es decir sin invadir tejidos adyacentes. Estos tumores generalmente presentan un crecimiento lento, pueden alcanzar volúmenes muy grandes y en general no representan un peligro para la vida del paciente. El tejido normal circundante está siempre bien delimitado y puede obtenerse una completa cura por remoción quirúrgica del tumor.

2- En cambio un tumor es considerado **maligno** o **canceroso** cuando sus células tienen la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y migrar hacia otros órganos. La invasividad usualmente implica la liberación de células a partir del tumor primario con capacidad de alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos, entrar en el torrente circulatorio, extravasarse en sitios distantes del lugar de origen, implantarse y proliferar en el nuevo ambiente formando un tumor secundario o **metástasis**. Al multiplicarse, las células metastásicas destruyen la arquitectura normal de los tejidos que invaden, alterando la fisiología del órgano afectado.

Las neoplasias malignas pueden originarse en muchos tipos celulares y se clasifican según el tejido y tipo celular de origen. Así, un hepatoma es un cáncer de células de hígado, un glioma es un cáncer de células gliales, un melanoma es un cáncer originado en las células productoras de melanina, denominadas melanocitos, etc. La gran diversidad de tumores malignos humanos se pueden clasificar en tres grandes categorías:

- i) **Carcinomas:** Se originan a partir de tejidos epiteliales y constituyen más del 90 % de los cánceres humanos, siendo los más frecuentes los carcinomas de pulmón, mama y colon.
- ii) **Sarcomas:** Neoplasias de origen mesenquimático (hueso, músculo, vasos sanguíneos, fibroblastos). Representan aproximadamente el 8 % de los tumores humanos.
- iii) **Leucemias y Linfomas:** En este caso, las neoplasias provienen de células hematopoyéticas, tanto de células circulantes como del sistema linfoide.

Existen además **tumores** originados en **tejido nervioso**. Estos tipos tumorales se subdividen en otras varias categorías según el tipo celular involucrado, la localización en el organismo y la estructura del tumor.

1.1.- Etiología del cáncer y heterogeneidad celular tumoral

Aunque no existe una perfecta correlación, existe una tendencia a desarrollar cáncer en aquellas células que continúan proliferando en la vida adulta, a diferencia de las células nerviosas, que raramente desarrollan cáncer en los adultos. Los epitelios que están en contacto con agentes externos potencialmente nocivos manifiestan una tendencia a desarrollar carcinomas con mayor frecuencia, de allí la importancia de los hábitos alimentarios, del contacto con sustancias tóxicas y de la exposición de la piel a factores ambientales perjudiciales. Experimentalmente se ha podido identificar una primera etapa en la progresión tumoral (etapa de iniciación), irreversible, en la que las células adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente en cultivo pero aún no son tumorigénicas, es decir no producen tumores al ser inyectadas en ratones atímicos (ver sistemas de estudio, en ésta Introducción) [Giovanella B., 1985]. La capacidad tumorigénica es adquirida posteriormente, en etapas más avanzadas de la progresión neoplásica.

Durante la progresión tumoral ocurren diversas mutaciones, anormalidades cromosómicas y aún cambios epigenéticos, evidenciándose una tendencia de la población neoplásica a incrementar su capacidad proliferativa y lograr una mayor independencia de los mecanismos que regulan la división celular [Vogelstein B., 1993; Solomon E., 1991; Fujii H., 1996]. Estos cambios permiten, a su vez, que las células malignas puedan adquirir la capacidad de invadir el tejido adyacente y metastatizar [Fidler I.J, 1982; Frixen U.H, 1991].

Ha sido ampliamente reportado que las células cancerosas se caracterizan por una elevada inestabilidad genómica, es decir que presentan tasas de mutación varios órdenes de magnitud superiores a las células normales. Esto es especialmente evidente en cuanto a la frecuencia de grandes rearrreglos cromosómicos como amplificaciones y translocaciones [Tlsty T.D, 1989; Wright J.A, 1990]. Los mecanismos subyacentes a esta inestabilidad genética están recién comenzando a comprenderse.

Distintos trabajos han demostrado que mutaciones en el gen p53 tendrían un rol central en este proceso [Hartwell L.,1992; Livingstone L.R., 1992; Yin Y.,1992].

Sin embargo, existen evidencias de que éste no sería el único mecanismo involucrado [Fishel R., 1996; Kahlenberg M.S., 1996].

Los múltiples avances en la comprensión de la biología del cáncer han demostrado claramente que el desarrollo y progresión de un tumor están estrechamente ligados a alteraciones en los mecanismos moleculares que controlan el ciclo de división celular.

Por lo tanto, numerosas investigaciones en los últimos años se han dirigido al estudio de los genes regulatorios involucrados en el control de la proliferación. Dichos genes han sido clasificados, en términos generales, en dos grandes grupos: aquéllos cuya expresión estimula un incremento en el número de células y aquéllos cuyo producto contribuye a disminuirlo.

Correspondientemente, hay dos caminos mutacionales posibles hacia la pérdida del control de la proliferación celular e invasividad característicos del cáncer:

- Transformar un *gen estimulador* en hiperactivo. Este tipo de mutación tiene en general un efecto dominante, y el gen alterado es llamado **oncogen** (siendo el alelo normal un proto-oncogen).
- Inactivar un *gen inhibitorio*. Estas mutaciones usualmente tienen un efecto recesivo, es decir que ambas copias génicas en la célula deben ser inactivadas o delecionadas para liberar a la célula de la inhibición. Este tipo de genes son llamados **genes supresores de tumor**.

Durante las distintas etapas de la progresión tumoral ocurren diversas mutaciones que activan oncogenes específicos e inactivan genes supresores de tumor. En los últimos años se ha progresado en la identificación de estos genes y su rol en la carcinogénesis [Bishop J.M., 1991; Hunter T., 1993; Hinds P.W., 1994; Weinberg R.A., 1994; Cox L.A., 1994; Fearon E.R., 1990].

2.- CANCER Y SISTEMAS DE ESTUDIO

A pesar de que en los múltiples proyectos de investigación en cáncer se persigue lograr una mayor comprensión de la biología de los tumores humanos, y en última instancia llegar a su curación, debido a razones éticas las posibilidades de experimentación directa en pacientes son obviamente muy limitadas. Por lo tanto, se han desarrollado diversos sistemas experimentales utilizados como modelo para el estudio del cáncer en el laboratorio. El empleo de **animales portadores de tumores** autólogos, o bien xenotransplantados con tumores humanos, es de gran utilidad como sistema *in vivo* para la investigación tanto básica como aplicada en cáncer. Sin embargo, en muchos casos es necesario contar con modelos simplificados para realizar estudios a nivel tisular, celular, subcelular o molecular. Para esto, resultan útiles tanto las muestras tumorales provenientes de **biopsias** como los sistemas de **cultivo de tejidos**, ya sean cultivos primarios de corta duración o líneas celulares obtenidas a partir de células cancerosas. Por último, con el advenimiento de la **biología molecular** aplicada al cáncer, se logra estudiar íntimamente las modificaciones moleculares que ocurren en una transformación maligna.

2.1.- Cultivo de tejidos

La mayoría de las células animales y vegetales pueden dividirse y aún diferenciarse en placas de cultivo de tejidos. Para esto, es necesario un ajuste adecuado de las condiciones experimentales en las cuales se intenta cultivar las células (agregado de nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, sustrato para la adhesión celular, control del pH y temperatura) según sean los requerimientos de las mismas.

El comportamiento de las células neoplásicas puede ser estudiado utilizando cultivos celulares. Se puede así ensayar el efecto del agregado o remoción de moléculas específicas al cultivo (como hormonas o factores de crecimiento), evaluar la acción citotóxica de diversos tratamientos antitumorales (drogas quimioterapéuticas, tratamientos hormonales, anticuerpos), estudiar la expresión de antígenos presentes en tumores mediante técnicas inmunológicas, etc.

Es posible preparar cultivos celulares directamente a partir de tejido tumoral obtenido de biopsias (**cultivos primarios**). En estos casos es necesario degradar la matriz extracelular y disociar las células del tejido, generalmente mediante el empleo de enzimas proteolíticas, hasta obtener una suspensión de células aisladas. A partir de esta suspensión, varias técnicas pueden utilizarse para separar los distintos tipos celulares presentes en el tejido, ya sea en base a sus propiedades diferenciales (por centrifugación, adherencia a plástico o vidrio, etc.) o mediante el empleo de anticuerpos específicos.

Si bien el trabajo con cultivos primarios es complejo y de corta duración, para ciertos estudios resultan interesantes ya que reflejan bastante fielmente las características de las células tal cual fueron obtenidas del tumor.

En muchos casos las células de los cultivos primarios pueden removerse de las placas de cultivo y re-plaquearse formando entonces cultivos secundarios. Este procedimiento puede repetirse por semanas o meses. La mayoría de las células son capaces de proliferar en cultivo un número limitado de generaciones y luego mueren. Ocasionalmente algunas pocas sufren cambios genéticos que les permiten atravesar el período de crisis, adquiriendo la capacidad de multiplicarse indefinidamente. Estas células “inmortalizadas” constituyen una **línea celular** continua. Si bien el establecimiento de líneas celulares a partir de tejidos normales es posible, resulta bastante más probable partiendo de células provenientes de tumores malignos. La adquisición del fenotipo canceroso permite una más fácil adaptación al crecimiento indefinido en cultivo.

Las líneas celulares son muy útiles como fuente constante de células bien caracterizadas y de un tipo relativamente uniforme. Más aún, dichas células pueden conservar su viabilidad indefinidamente si se congelan en nitrógeno líquido. Por otra parte, permiten realizar experimentos usando medios de crecimiento bien definidos y así poder medir las respuestas celulares a diversos factores externos. Sin embargo, es importante tener en cuenta cuando se trabaja con líneas celulares, que estas células casi siempre difieren en forma importante de sus progenitoras en los tejidos de los cuales derivan.

La mayoría de las veces sufren cambios a través de los sucesivos pasajes, mostrando incluso alteraciones en el número de cromosomas (aneuploidía).

De manera que, aunque representa una gran ventaja el poder estudiar el comportamiento complejo de las células en las condiciones estrictamente definidas de una placa de cultivo, las observaciones y conclusiones deben en última instancia verificarse a través de experimentos *in vivo*.

Las líneas de melanoma: En nuestro laboratorio hemos establecido tres líneas de melanoma humano: IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. IIB-MEL-J se originó a partir de una lesión de melanoma metastásico en pulmón [Guerra L., 1989], IIB-MEL-LES a partir de metástasis ganglionares axilares, e IIB-MEL-IAN de un ganglio metastásico amelanótico. Los estudios histopatológicos de estas dos últimas líneas revelaron que las metástasis utilizadas provenían de melanomas de tipo epitelioide amelanótico maligno [Kairiyama C., 1995]. Estas líneas celulares, en esta Tesis, se han utilizado como modelo de cáncer de piel tanto *in vivo* como *in vitro*.

Líneas celulares de cáncer de mama: La línea celular hormono-independiente IIB-BR-G, ha sido obtenida en nuestro laboratorio a partir de células provenientes de la disgregación de un carcinoma primario de mama [Bover L., 1991]. Dicha línea celular presenta características indiferenciadas, con alto índice mitótico, capacidad tumorigénica y metastásica en ratones atímicos y no expresa receptores de estrógeno ni progesterona. Esta línea celular se ha utilizado en este trabajo de Tesis, esencialmente, como control negativo en la expresión de receptores androgénicos.

La línea celular MCF-7, utilizada en este trabajo de Tesis, deriva de un derrame pleural de una paciente con cáncer de mama [Soule H.D., 1973]. Estas células expresan receptores de estrógeno y progesterona, y representa un buen modelo *in vitro* para el estudio de los tumores de mama hormono-dependientes.

El análisis de ésta y otras líneas celulares positivas para receptores hormonales, han aportado información valiosa acerca de los mecanismos de acción de las hormonas sobre las células tumorales, las proteínas inducidas por las mismas, y los mecanismos de acción de antihormonas [Watts C.K., 1994; Gudas J.M., 1995].

2.2.- Biopsias

El estudio de biopsias tumorales, obtenidas quirúrgicamente, tiene la ventaja de reflejar fielmente las características del tumor tal cual se presenta en el paciente. En primer lugar, el análisis de la biopsia permite su clasificación anatomopatológica; esto aporta información sobre el origen de la neoplasia, su grado de agresividad y pronóstico. Ofrece además la posibilidad de investigar, sobre cortes histológicos de las muestras tumorales, la expresión de diversas moléculas (antígenos asociados a tumor, receptores celulares, productos de oncogenes, etc.), habiéndose desarrollado para esto distintas técnicas como la inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, hibridización *in situ* y más recientemente PCR (*polymerase chain reaction*) *in situ*. Las biopsias conservadas en condiciones apropiadas proveen, también, abundante material para la obtención de proteínas y ácidos nucleicos para estudios a nivel molecular.

2.3.- Modelos animales

Los **animales portadores de tumores** son ampliamente utilizados en el estudio del cáncer; ya sean tumores autólogos (espontáneos o inducidos artificialmente) o tumores transplantados (xenotransplantes). El uso de xenotransplantes de tumores humanos es especialmente útil en evaluaciones pre-clínicas de nuevos tratamientos, como la aplicación de drogas quimioterapéuticas, empleo de anticuerpos monoclonales, solos o conjugados con radioisótopos, drogas o toxinas, etc.

Para la realización de estos transplantes se requiere que el sistema inmune del animal esté deprimido o anulado de alguna manera. Se usa entonces una cepa mutante de ratones carentes de timo, inmunodeficientes, denominados ratones

atímicos o “nude mice”. Debido a la deficiencia inmunológica en células T, estos animales pueden aceptar xenotransplantes de distintos tejidos, incluyendo tumores humanos [Shin S.I., 1979].

Para la obtención del tumor en el ratón pueden realizarse injertos subcutáneos de pequeños fragmentos tumorales provenientes de biopsias, o bien inocularse células tumorales de cultivos. Una vez desarrollado el tumor, éste puede retransplantarse de ratón en ratón por tiempo indefinido.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que cuando el tumor es pasado de animal en animal por muchas generaciones sucesivas, sus propiedades pueden modificarse. Generalmente a través de los pasajes ocurre una selección de células con mayor capacidad proliferativa.

Para el desarrollo de la presente Tesis se ha hecho uso del modelo *in vivo* IIB-MEL-J_{NUDE} e IIB-MEL-LES_{NUDE} originados por el xénotransplante de los tumores metastásicos de melanoma que permitieron el establecimiento de las líneas celulares respectivas.

Otra técnica en uso es el ensayo de la cápsula subrenal, en la cual se transplantan pequeños fragmentos tumorales heterólogos en ratones que pueden ser o no inmunodeficientes. Esta técnica permite solamente ensayos a corto plazo pues deben realizarse dentro de los primeros 5 a 7 días de transplantado el tumor, antes que se produzca el rechazo del mismo. Se utiliza especialmente para la determinación de la respuesta a quimioterapia de tumores humanos [Griffin T.W., 1983].

Por otra parte, gracias a los importantes avances tecnológicos de los últimos años, es posible introducir genes en forma permanente en ratones, inyectando el ADN en óvulos fertilizados. Estos a menudo desarrollarán en un ratón, conteniendo el fragmento de ADN con el gen de interés integrado en alguno de sus cromosomas. Si el cromosoma modificado está presente en las células de la línea germinal, este animal pasará el gen extraño a la progenie.

Animales que han incorporado, de esta forma, permanentemente el ADN son denominados **transgénicos**, y el gen extraño, **transgen** [Palmiter R.D., 1986; Boyd A.L., 1993]. Estos ratones transgénicos han resultado de enorme utilidad para el estudio de la función y regulación de diversos genes.

Varias cepas de ratones transgénicos han sido generadas llevando genes implicados en el desarrollo y/o evolución del cáncer (oncogenes). Los transgenes pueden expresarse en todos los tejidos o diferencialmente en ciertos tejidos de interés, según la especificidad del promotor bajo el cual hayan sido colocados.

Esta metodología permite estudiar la participación de distintos oncogenes en el proceso de carcinogénesis. Más aún, por cruzamientos entre cepas transgénicas para distintos oncogenes ha podido obtenerse progenie llevando ambos simultáneamente, lo que permite analizar la acción sinérgica de distintos oncogenes para el desarrollo de una neoplasia [Adams J.M., 1991; Fanidi A., 1992; Hunter T., 1991].

3.- MELANOMA CUTANEO- BIOLOGIA DEL MELANOCITO Y DEL MELANOMA- OPCIONES DE TRATAMIENTO

El melanoma cutáneo resulta de la transformación maligna de las células pigmentadas de la piel, los melanocitos, y es uno de los tumores más intensamente estudiados en los últimos años.

Históricamente, la descripción más temprana sobre el melanoma se remonta a los escritos de Hipócrates en el siglo V a.c. y la enfermedad ha sido descrita en varias momias incaicas. En 1835, el profesor de cirugía Cruveilhier (1797-1874) describió: "*....La escisión se vió seguida de una recidiva. La subsiguiente amputación de la mano consiguió una curación local, pero aparecieron metástasis en los pulmones, el corazón, estómago....*" (Ehring F., 1995). Sin embargo, el término melanoma fue sugerido por Carswell en 1938 en un trabajo que describe las características malignas del tumor (Balch Ch.M., 1992).

El melanoma cutáneo es considerado un tumor de comportamiento impredecible ya que el pronóstico puede variar entre una remisión espontánea (en un porcentaje menor al 2% de los casos) a una rápida progresión y muerte del paciente.

El interés sobre la investigación en melanoma tanto por investigadores clínicos como experimentales se ha desarrollado por una serie de razones:

- 1) El aumento de esta patología en los últimos 40 años.
- 2) La resistencia de los melanomas avanzados a las terapias convencionales, lo cual resulta en una alta tasa de mortalidad.
- 3) La accesibilidad a nevos cutáneos o lunares y a los melanomas para llevar a cabo los estudios experimentales.
- 4) La facilidad de crecer células de melanoma metastásico *in vitro*.

3.1.- Incidencia del melanoma

El melanoma representa el 1% de los cánceres de los Estados Unidos. Si bien corresponde al 3% de los neoplasmas cutáneos, su potencial maligno se refleja en el hecho de que resulta en el 65% de las muertes por cáncer de piel. La incidencia del melanoma es prácticamente igual entre hombres y mujeres. Sin embargo, se observan diferencias en cuanto al pronóstico de la enfermedad. Aproximadamente el 50% de los melanomas se detectan en pacientes de menos de 55 años de edad y la aparición del melanoma en niños es extremadamente baja.

La incidencia del melanoma está creciendo en mayor proporción que cualquier otro tipo de cáncer, a excepción del cáncer de pulmón en mujeres, en los Estados Unidos, Australia, el norte de Europa y en Canadá (Herlyn M., 1993). Afortunadamente, el aumento en la incidencia de la enfermedad supera al aumento en la mortalidad sugiriendo que la creciente diferencia entre la incidencia y la mortalidad se relaciona con las mejoras en el diagnóstico temprano y con que los protocolos de tratamiento han logrado retrasar la mortalidad de los pacientes que padecen esta enfermedad.

Aún no se conocen todos los factores etiológicos que llevan al desarrollo del melanoma. Sin embargo hay 3 factores que deben ser considerados:

- 1) La incidencia del melanoma es mayor en la población blanca que en cualquier otra raza siendo 10 veces mayor en los individuos blancos que en negros. Existe una correlación negativa entre el grado de pigmentación de la piel y el melanoma (Crombie I.K., 1979),
- 2) Estudios epidemiológicos y clínicos señalan un rol fundamental de la irradiación solar sobre el desarrollo del melanoma (Rigel D.S., 1992),
- 3) El melanoma puede ser hereditario. La susceptibilidad genética al melanoma fue descrita por primera vez en 1978 por Clark y Greene en 2 familias (Greene M.H., 1979). Actualmente los melanomas familiares representan el 5-10% del total de los casos de melanoma estudiados.

3.2.- Histopatología del melanoma

Dado que el melanoma cutáneo surge por la transformación maligna de las células pigmentadas de la piel (melanocitos), gran parte de las características de las células del melanoma cutáneo reflejan las de su contraparte normal (melanocitos epidérmicos). Sin embargo, las diferencias entre las células de melanoma y las de los melanocitos son muy marcadas: las células de melanoma crecen independientemente del agregado de factores de crecimiento, poseen acentuadas anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, y son capaces de invadir otros tejidos y de generar metástasis.

Los melanocitos embriológicamente derivan de una población troncal (stem) de melanoblastos que se originan en la cresta neural, inmediatamente luego del cierre del tubo neural. La migración de los melanoblastos comienza muy temprano, a la segunda semana y media de la gestación del embrión humano. Los melanoblastos ya están comprometidos a diferenciarse en melanocitos antes o durante la migración desde el tubo neural. Los melanoblastos *in vivo* comienzan a melanizarse justo antes de llegar a su destino [Nordlund J.J., 1986; Rawles M., 1947; Weston J.A., 1970]. En el lugar de destino, los melanocitos son células dendríticas pigmentadas (melanina) que se localizan en la base de la epidermis.

La población de melanocitos en la piel es particularmente densa en los **nevos**, comunmente llamados lunares. También se encuentran en el ojo y otros epitelios, incluyendo orofaringe, esófago, intestino delgado y grueso, vejiga, ano y vagina. Se han encontrado melanocitos en la cápsula de los ganglios linfáticos, dando lugar a la especulación de que algunos melanomas de origen primario desconocido podrían derivar de ganglios linfáticos.

En la piel, los melanocitos están presentes en la capa basal y despliegan sus dendritas hacia los queratinocitos que los rodean. La melanina, el pigmento sintetizado por la enzima tirosinasa, es transportada en melanosomas a través de las prolongaciones dendríticas hasta los queratinocitos. En el adulto los melanocitos se dividen con una frecuencia muy baja, tal vez una vez al año [Pawelek J., 1979]. Avances muy recientes en técnicas de cultivo han permitido delinear cuales son los factores que controlan el crecimiento de melanocitos normales, melanocitos de nevos y de células de melanoma.

El estudio de los requerimientos para la proliferación *in vitro* de melanocitos normales ha ayudado a identificar factores que están activados en las células malignas, y que serían potencialmente responsables de la independencia que exhiben las células malignas a factores exógenos de crecimiento y diferenciación. Las células de melanoma, a diferencia de los melanocitos normales, presentan importantes parámetros diferenciales cuando son puestas en cultivo: 1) cambios morfológicos; 2) vida media ilimitada en cultivo; 3) numerosas anomalías cromosómicas; 4) alta densidad de saturación de la monocapa; 5) crecimiento independiente de anclaje en agar blando; 6) tumorigenicidad en ratones atímicos; 7) ausencia o menor requerimiento de factores de crecimiento exógenos y 8) producción de factores de crecimiento endógenos.

Lesiones precursoras más comunes de melanoma: Si bien existen muchas controversias respecto de la naturaleza y características de las lesiones que potencialmente pueden dar origen a un melanoma, se ha puesto especial interés en identificar dichas lesiones, cuyo análisis resulta muy útil, no sólo para la comprensión de la biología del melanoma, sino también para la detección de individuos con riesgo de contraer melanoma (tabla 1).

Los **nevus melanocíticos** (lunares) pueden ser considerados como neoplasias benignas aunque por muchos años se ha señalado que los **nevus** tienen cierta relación con el melanoma [Elder D.E., 1987; Greene M.H., 1985].

El término **nevo displásico**, se refiere a una lesión intermedia con una disposición arquitectónica desordenada. Las características clínicas se describen en función de su tamaño, bordes y color. Los nevus displásicos tienen usualmente un diámetro de 5 mm, con bordes difusos y color irregular. Histológicamente, las lesiones contienen melanocitos atípicos distribuidos al azar con núcleos grandes, y cambios arquitectónicos debido al irregular arreglo del tejido conectivo que lo rodea [Clark W.H., 1991]. Uno de los factores de riesgo que mejor correlaciona con el melanoma son los nevus displásicos en individuos con historia de melanoma familiar. Los nevus displásicos son considerados precursores de melanoma ya que el 30% de los melanomas espontáneos y el 70% de los melanomas familiares se desarrollan en la cercanía de nevus displásicos [Greene M.H., 1985; Reimer R.R., 1978].

También se cree que los nevus congénitos gigantes pueden derivar en melanomas [Reed W.B., 1985]. Sin embargo, hay una gran proporción de melanomas que parece desarrollarse sin la evidencia de un nevo contiguo [Elder D.E., 1987; Gruber S.B., 1989].

En cuanto a los melanomas primarios, Clark y col. han distinguido entre los melanomas *in situ* que poseen grandes células epiteloides con núcleos hiperromáticos y los melanomas con fase de crecimiento radial (RGP). Estos tienen las mismas características que los melanomas *in situ*, pero algunas células melanocíticas individuales han invadido la dermis. Los melanomas RGP generalmente tienen más de 10 mm de diámetro y son asimétricos. Se pueden observar células en mitosis en la epidermis, pero no en la dermis. Según Clark, de 147 casos estudiados durante más de 10 años, ninguno recurrió ni metastatóizó luego de la cirugía [Clark W.H., 1991].

La metástasis es el paso final del proceso de progresión tumoral. Los pacientes con metástasis sistémicas de melanoma, tienen un pronóstico muy poco alentador con una sobrevivida promedio de 6 meses [Balch C.M., 1992].

Generalmente, el paciente con metástasis fallece por el compromiso anatómico directo y las alteraciones fisiológicas causadas por las metástasis en los órganos comprometidos. Pulmón, cerebro e hígado son los sitios más comunes donde se encuentran metástasis de melanomas, sin embargo, estas pueden encontrarse en cualquier sitio del cuerpo.

Tabla 1: Precursores potenciales de melanoma y proliferaciones melanocíticas *de novo*:

| |
|---|
| Nevos melanocíticos: |
| Nevos displásicos |
| Nevos comunes adquiridos |
| Nevos congénitos: |
| Gigantes |
| Pequeños e intermedios |
| Nevos azules |
| Proliferaciones melanocíticas <i>de novo</i>: |
| Lentigo maligna |
| Proliferaciones lentiginosas de palma, planta y mucosas |

3.3.- Características clínicas del melanoma

Poblaciones de alto riesgo: El típico paciente de melanoma es de piel blanca con tendencia a las quemaduras solares antes que al bronceado, aún luego de una breve exposición solar. Los fenotipos pelirrojo y rubio se encuentran asociados con mayor riesgo al desarrollo del melanoma.

El riesgo de desarrollar un melanoma primario es elevado en pacientes con múltiples nevus displásicos o con antecedentes familiares de melanoma y en aquellas personas con más de 20 nevus [Balch C.M., 1992].

Signos y síntomas: Si bien el melanoma puede localizarse en cualquier sitio del cuerpo, es más común en las extremidades inferiores en las mujeres y en el torso en los hombres. Entre las características típicas del melanoma cutáneo se incluyen la variación del color de la piel, la superficie irregular con relieve, el perímetro irregular con indentaciones y los cambios en el tamaño.

El común denominador de todos los tipos de melanomas cutáneos es su naturaleza cambiante.

Cualquier lesión pigmentada que sufre cambios en el tamaño, configuración o color debería considerarse como un potencial melanoma, y debería ser analizado histopatológicamente.

Clasificación de melanomas: Los melanomas invasivos pueden dividirse en 4 subtipos de acuerdo a su patrón de crecimiento (Barnhill R.L., 1989). Cada uno de estos subtipos presentan características clínicas únicas con diferente pronóstico:

1. Melanoma Extensivo Superficial- “Superficial Spreading Melanoma” (SSM). Cerca de 70% de los melanomas son SSM. Generalmente se desarrollan en nevos preexistentes, y pueden llegar a ocurrir a cualquier edad posterior a la pubertad. Al principio la lesión se presenta chata, luego la superficie se torna irregular, usualmente asimétrica. A medida que la lesión crece, la superficie se vuelve brillante y los bordes indentados.

2. Melanoma Nodular- “Nodular Melanoma” (NM). El segundo tipo más frecuente de melanoma es el NM (15-30% de los pacientes). Son tumores muy agresivos, y generalmente se desarrollan con mayor rapidez que los SSM. Pueden darse a cualquier edad y los sitios más comunes son el tronco, cabeza y cuello. Generalmente son más oscuros y con más relieve que los SSM, y más uniformes en su coloración. Una característica típica es que carecen de fase de crecimiento radial u horizontal.

3. Melanoma Lentigo Maligno- “Lentigo Maligna Melanoma” (LMM).

Este tipo de melanoma parece ser una entidad separada de los otros tipos de melanoma, con menor capacidad de metastatizar. Se da en un bajo porcentaje (4-10%), generalmente en el rostro de mujeres de piel blanca.

4. Melanoma Acral Lentiginoso- “Acral Lentiginous Melanoma” (ALM).

Se presenta como una lesión muy pigmentada, chata o nodular en las palmas de las manos, planta del pie o cerca del nacimiento de las uñas. El ALM aparece en muy baja proporción en pacientes blancos (2-8%), pero constituye el 35-60% de los casos de melanomas en pacientes de piel oscura, incluyendo asiáticos e hispanicos. La irregularidad de la coloración es uno de los rasgos típicos del ALM. Son mucho más agresivos que los LMM y con mayor tendencia a generar metástasis.

Sistema de estadificación del melanoma: La existencia de un sistema uniforme de clasificación y estadificación del melanoma es de fundamental importancia para la comparación de resultados de los distintos tratamientos entre los diversos centros sanitarios de un país o entre países.

En 1988 la AJCC (American Joint Committee on Cancer) junto con la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) realizaron una propuesta unificadora para clasificar el melanoma cutáneo.

Este sistema de clasificación universal fue desarrollado a nivel internacional con la colaboración y concertación de centros de todo el mundo relacionados con el melanoma (tabla 2).

Tabla 2 : Sistema de estadificación para el melanoma de la AJCC/UICC, 1988

| ESTADIO | CRITERIO |
|----------------|--|
| IA | Melanoma primario $\leq 0,75$ mm de profundidad y/o nivel de Clark II (pT1); sin metástasis ganglionares o sistémicas (N0, M0) |
| IB | Melanoma primario 0,76 a 1,50 mm de profundidad y/o nivel de Clark III (pT2); N0, M0 |
| IIA | Melanoma primario 1,51 a 4,00 mm de profundidad y/o nivel de Clark IV (pT3); N0, M0 |
| IIB | Melanoma primario $> 4,00$ mm de profundidad y/o nivel de Clark V (pT4); N0, M0 |
| III | Metástasis en ganglios (Cualquier pT, N1 o N2, M0) |
| IV | Metástasis sistémicas (Cualquier pT, cualquier N) |

pT: tumor primario (primary Tumor); **N0**: ausencia de metástasis en ganglios, **NX**: Número de ganglios comprometidos. **N**: Nódulos linfáticos; **M0**: ausencia de metástasis sistémicas.

La invasividad tumoral y las metástasis son las mayores causas de fracasos en los tratamientos de pacientes con cáncer, y especialmente con melanoma. Un estudio de supervivencia de 15 años, llevado a cabo en las Universidades de Alabama, en Birmingham y la Universidad de Sidney, realizado en más de 4.000 pacientes con melanoma, demostró que los pacientes con estadios de melanoma III y IV al momento del primer diagnóstico, afortunadamente sólo constituyen el 15% del total [Ketcham A.S. y Balch C.M., 1992].

Este porcentaje presenta, de acuerdo al grado de compromiso metastásico, diferentes pronósticos. Según Balch C.M. y col. [1981], el 40% de los pacientes con melanoma estadio III, con metástasis en un sólo nódulo linfático loco-regional, presenta una sobrevida mayor a 10 años; por el contrario, sólo el 15% de aquéllos con dos o más ganglios involucrados permanece con vida a los 10 años del diagnóstico. Los pacientes con metástasis sistémicas de melanoma, estadio IV, tienen un pronóstico muy poco alentador, con una sobrevida promedio de tan sólo 6 meses.

El paciente con enfermedad metastásica sucumbe por el compromiso anatómico directo y por las alteraciones fisiológicas causadas por las metástasis en los órganos comprometidos, y/o por las complicaciones asociadas a la terapia antineoplásica. Estos datos estadísticos y clínicos de melanoma metastásico, evidencian la gran capacidad de los melanocitos malignos de invadir y desarrollar colonias metastásicas en otros órganos.

3.4.- Melanoma primario y metastático

El melanoma primario cutáneo puede originarse en, o cerca de, una lesión precursora de las mencionadas anteriormente (tabla 1) o en la piel normal (Gruber SB., 1989). Cualquiera sea el precursor, el crecimiento del melanoma puede darse de dos maneras, que han sido designadas como **crecimiento bifásico** o **crecimiento monofásico** [Clark W.H. Jr, 1967 y 1987; Reed R.J., 1985].

Crecimiento bifásico:

El patrón bifásico se caracteriza porque el melanoma presenta *fase de crecimiento radial (RPG)* y *fase de crecimiento vertical (VPG)*.

La fase intraepidérmica del crecimiento bifásico ha sido denominado como *fase de crecimiento radial* [Clark W.H.Jr, 1967 y 1984; Elder D.E., 1979]. SSM, LMM y ALM presentan este patrón de crecimiento radial.

Si no es interrumpido por la terapia, eventualmente se puede formar un tumor invasivo, con capacidad de generar un nódulo expansible que puede invadir e infiltrar la dermis reticular o el tejido adiposo subcutáneo.

El subsecuente crecimiento del nódulo expansible dentro de la dermis es la *fase de crecimiento vertical* [Clark W.H. Jr, 1984; Elder D.E., 1979].

Crecimiento monofásico:

En este caso el crecimiento del melanoma procede puramente en *fase vertical*, sin fase de crecimiento radial. El melanoma con este patrón de crecimiento es también conocido como NM, porque en la mayoría de las instancias, cuando el tumor es diagnosticado, ya se ha desarrollado un nódulo expansible en la dermis papilar. [Clark W.H. Jr, 1967 y 1987; Elder D.E., 1979].

Existen diferencias biológicas entre la fase de crecimiento radial y vertical. La fase de crecimiento radial se caracteriza porque la lesión crece en forma autónoma e invade la dermis papilar, pero usualmente carece de potencial metastásico [Clark W.H.Jr, 1987; Elder D.E., 1984]. La fase de crecimiento vertical implica un cambio cualitativo que resulta en la selección de una población o clon de células que tiene ventajas proliferativas respecto de las demás células. Además, la propiedad de formar agregados compactos de células parece correlacionar con la capacidad de metastatizar [Clark W.H.Jr, 1987]. El crecimiento vertical difiere del crecimiento radial desde el punto de vista citológico y arquitectónico. La fase de crecimiento vertical generalmente presenta células de mayor tamaño, con mayor grado de atipia y aumento del tamaño nuclear, respecto de la fase de crecimiento radial. También las células que entran a la fase vertical de crecimiento pueden concomitantemente reducir, o directamente perder, la síntesis de pigmentos, de allí que los nódulos y metástasis sean frecuentemente amelanóticos.

Para analizar el proceso metastásico, los investigadores han separado invasión y metástasis en una serie de pasos secuenciales bien definidos. Para describir la secuencia de eventos bioquímicos que ocurren durante la invasión de la célula tumoral a la matriz extracelular, ha sido propuesta una hipótesis por Poste G. y Fidler I.J., (1980) que considera tres etapas:

- 1) En la primer etapa la célula tumoral se adhiere a la matriz extracelular, ECM (Extracellular Matrix). Este proceso puede estar mediado por glicoproteínas específicas o factores de adhesión tales como laminina y fibronectina, y por receptores en la membrana basal de la célula tumoral.
- 2) El segundo paso es la degradación local de la matriz por proteasas asociadas a la célula tumoral. Estas proteasas pueden degradar las proteínas de adhesividad y estructurales, como el colágeno de la ECM. La cantidad de enzimas proteolíticas activas en la superficie de la membrana celular sería tan alta que se produce un desbalance en detrimento de los inhibidores naturales de proteasas que están presentes tanto en la ECM como en el plasma.
- 3) En la tercer etapa se produce la locomoción de la célula tumoral hacia la región de la matriz modificada por la proteólisis. La dirección de la locomoción puede ser influenciada por factores quimiotácticos del órgano huésped (órganos preferenciales para la colonización metastásica) y también por factores de locomoción propios de la célula tumoral. La invasión continua de la matriz extracelular se realiza por repeticiones cíclicas de estos tres eventos.

3.5.- Tratamiento del melanoma maligno humano

Los melanomas localizados, es decir que no se han diseminado, son altamente curables y generalmente constituyen lesiones delgadas circunscriptas a la dermis papilar. El tratamiento para este tipo de melanoma consiste en la escisión quirúrgica [Holmstrom H., 1992].

Para los tumores que se han diseminado a ganglios linfáticos regionales suele utilizarse una escisión amplia del tumor primario y la remoción de los ganglios linfáticos regionales complicados [Karakousis C.P., 1991].

La utilización de la quimioterapia adyuvante no ha demostrado ser capaz de producir un aumento de la supervivencia, mientras la quimioterapia administrada por perfusión arterial aislada continúa siendo estudiada en pruebas clínicas [Coit D.G., 1992]. Para la terapia adyuvante con interferón (IFN) α -2b, se ha descrito un aumento del período de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con ganglios linfáticos positivos [Kirkwood J.M., 1996].

Con respecto al melanoma avanzado, éste es refractario a la mayoría de las terapias sistémicas estándares, y los pacientes portadores de este tipo tumoral son considerados candidatos para las pruebas clínicas. De todos modos, se ha reportado que varios modificadores de la respuesta biológica y agentes citotóxicos producen respuestas objetivas [Legha S.S., 1989].

La tasa de respuesta objetiva a la dacarbazina y las nitrosureas, carmustina y lomustina, es de aproximadamente el 20%. Generalmente se obtienen respuestas de corta duración, oscilando entre 3 y 6 meses. De todos modos, en un número limitado de pacientes, se han reportado respuestas completas con remisiones a largo plazo. Otros agentes con actividad mínima son los alcaloides vinca, compuestos de platino y taxanes.

Estudios de fase II combinando distintos fármacos, mostraron tasas de respuestas más altas (25 y 45%) respecto de las terapias realizadas con un único agente [Legha S.S. 1989]. Las pruebas aleatorias en las que se comparan estos regímenes de combinación con dacarbazina, no han mostrado consistentemente ninguna ventaja; tampoco la adición de tamoxifeno mostró beneficio en las tasas de respuesta [Anderson C.M., 1995]. Por otro lado, las combinaciones de quimioterapia y de agentes biológicos han revelado resultados alentadores [Anderson C.M., 1995].

Igualmente, la combinación de distintas drogas y/o agentes tumoristáticos continúa siendo una estrategia de uso frecuente para tratar de controlar el crecimiento tumoral.

Así, se ha reportado que el Tam aumenta marcadamente la tasa de respuesta del melanoma maligno al tratamiento con cisplatino, carmustina y dacarbazina y que, además, ocurre una interacción sinérgica entre el Tam y el cisplatino en cuanto a sus efectos citotóxicos sobre líneas de melanoma humano [Mc. Clay EF., 1993].

El tamoxifeno es un antiestrógeno esteroideo, y representa la primer terapia endocrina para el tratamiento de cáncer de mama avanzado. Es un agente tumoristático y ha sido evaluado como adyuvante en la quimioterapia en pacientes en estadio II de cáncer mamario. Las distintas estrategias de tratamiento tienen por objetivo mantener el control del crecimiento tumoral dependiente de hormonas, pero muchos de los protocolos terapéuticos han fallado debido al desarrollo de resistencia tumoral.

Este antiestrógeno actúa a diferentes niveles por inhibición del RE, de la calmodulina [Lamb P.H.Y., 1984] y de la actividad de la protein-quinasa C [O' Brian C.A., 1985] no siendo dependiente de la presencia detectable de RE. Pero en el caso del melanoma maligno humano el mecanismo de acción del antiestrógeno es poco conocido.

Una actividad antiproliferativa del Tam ha sido descrita por otro grupo en distintas líneas de melanoma humano por unión al tipo II del RE [Piantelli M., 1995].

Masiel y col. han demostrado que pacientes portadores de melanoma en estadio III que fueron tratados con tamoxifeno, manifestaron una inhibición del crecimiento tumoral [Masiel A., 1981]. De todos modos la utilización de Tam, en estudios de fase III, como agente único o combinado con quimioterapia, ha arrojado resultados contradictorios [Rusthoven, 1998].

Entre las terapias biológicas más activas contra el melanoma se encuentra la utilización de IFN- α e interleuquina 2 (IL-2). Las tasas de respuesta para IFN- α oscilan entre 8 y 22%, y entre 10 y 20% para IL-2. La combinación de estas terapias en pacientes en estadio III, no ha mostrado diferencias respecto de los tratamientos con un único agente [Saparano J.A., 1993].

Por otra parte, la adición de células "killer" activadas por linfoquinas, linfocitos autólogos activados por IL-2 *ex vivo* y linfocitos de infiltración tumoral (linfocitos derivados de tumores) cultivados en presencia de IL-2, no han producido mejoras en las tasas de respuesta o en las remisiones durables.

3.6.- Influencia hormonal en el melanoma

Aunque el melanoma maligno no es considerado un tumor dependiente de hormonas, existen claras evidencias que sugieren que ciertas influencias endocrinas podrían estar determinando su comportamiento biológico.

Es interesante destacar que el desarrollo del melanoma es más desfavorable en pacientes hombres que en mujeres.

En ningún otro tipo de cáncer la diferencia en la supervivencia entre hombres y mujeres es tan grande como en pacientes con melanoma de piel [Thorn M., 1989, Worth A.J., 1989].

En las mujeres, más a menudo que en los hombres, los tumores primarios se ubican en sitios más favorables para el diagnóstico, como ser cara y parte inferior de piernas, mientras en los hombres se localizan más frecuentemente en el tronco [Rampen F.J.H., 1984, Shaw H.M., 1980]. Se ha sugerido, entonces, que el melanoma de piel en mujeres se diagnostica en estadios más tempranos. De todos modos, el estudio de distintos parámetros, como intervalos entre estadios sucesivos de la enfermedad, supervivencia luego de la diseminación sistémica, tiempo en que se duplica el volumen del tumor y metástasis pulmonares, sugieren que existen verdaderas diferencias biológicas entre el melanoma en hombre y en mujer. Considerando todos estos parámetros, se ha determinado claramente que las mujeres alcanzan consistentemente un mejor pronóstico que los hombres [Rampen F.H.J., 1980].

El objetivo se centró entonces en la búsqueda de alguna correlación entre el desarrollo tumoral y el sexo del paciente [Shaw H.M., 1978], con la subsecuente aplicación de algún tipo de terapia hormonal alternativa.

En un principio se sugirió que el comportamiento más leve o indolente del melanoma desarrollado en la mujer tenía relación con una frecuencia mayor de receptores estrogénicos [Walker M.J., 1987], aunque solamente entre un 20 y 30% de los especímenes de melanoma analizados resultaron RE positivos [Creagan E.T., 1980, Furnival C.M., 1981].

Los intentos para correlacionar, en el melanoma, niveles de RE y de RPg con respuestas clínicas favorables frente a la manipulación endocrina, han resultado infructuosos [Rampen F.H.J., 1980].

Actualmente, se sabe que receptores estrogénicos y progestínicos no representan marcadores de importancia en el pronóstico del melanoma maligno [Walker M.J. 1991].

Por otra parte, se ha sugerido que el peor pronóstico masculino podría relacionarse con la presencia de andrógenos [Shiu M.H., 1976; Rampen F.J.H., 1980]. Esto explicaría la ocurrencia incidental de la rápida progresión del melanoma durante la gestación y la regresión espontánea asociada a veces con el término de la preñez, dada la abundante cantidad de andrógenos secretados durante este estadio. Durante la preñez se ha registrado un gran número de casos fatales por melanoma. Son bien conocidos los cambios en la pigmentación asociados a este período, así como el aumento de sustancias estimulantes de melanocitos en la sangre y orina de mujeres embarazadas. También, se describe que estas pacientes tienen más frecuentemente tumores en el tronco; sitio inusual para desarrollar melanoma en mujeres, y común en pacientes hombres. La explicación está nuevamente en correlación con la influencia estimuladora de los andrógenos para la evolución del melanoma [Driscoll M.S; 1993; Slingluff C.L., 1992].

A partir de estos datos era posible plantearse, entonces, el interrogante de por qué el melanoma en hombres tiene peor pronóstico que en mujeres.

Varios estudios han tratado de correlacionar la evolución del melanoma y la acción hormonal, sugiriendo que la determinación de la presencia de receptores hormonales específicos podría representar un marcador de gran valor para predecir la respuesta clínica frente a tratamientos endocrinos.

3.7.- Receptor androgénico, andrógenos y antiandrógenos

El RA, junto con otros receptores de diversas hormonas esteroideas, pertenece a una familia de receptores nucleares con alta homología entre sí cuyos miembros regulan numerosos procesos fisiológicos y morfológicos en respuesta a la unión con sus ligandos. Estos receptores actúan como factores transcripcionales dependientes de ligando.

Cuando las hormonas se unen al receptor correspondiente inducen un cambio conformacional, lo que permite que el complejo hormona-receptor interactúe con secuencias del ADN específicas en los promotores de diversos genes blanco. De esta forma estos complejos regulan (induciendo o inhibiendo) la expresión de otros genes.

El análisis de la estructura molecular del RA permitió distinguir distintos dominios funcionales. El dominio llamado C, corresponde a la región de unión al promotor de genes regulados por andrógenos, en especial a una secuencia en el ADN denominada "elemento respondedor a andrógenos (ARE)". Este dominio posee dos regiones de unión al ADN con estructuras de tipo "dedos de zinc". El RA posee, además la región de unión a andrógenos que mapea en el dominio E, un dominio D que actúa como bisagra uniendo las dos regiones anteriores (C y E) y el dominio A/B que interviene en la regulación de la actividad del RA como factor transcripcional. Existen además otras regiones importantes en la función de RA como una señal de localización nuclear y una región de dimerización [Brann D.W., 1995; Evans R.M., 1988, Luisi B.F., 1991; Tan J.A., 1988].

El dominio E, ubicado en el extremo C-terminal de la molécula, es una secuencia que presenta gran homología entre los distintos miembros de la familia de receptores de esteroides. Las principales mutaciones puntuales para el RA han sido descritas en este dominio [Janne O.A., 1993].

Esta porción es la responsable de la alta afinidad de unión de andrógenos y de la inhibición de la actividad transcripcional del receptor en ausencia de hormona.

El RA se expresa en una variedad de tejidos y cambia a través del desarrollo, con el paso del tiempo y en la transformación maligna. El RA puede ser activado por dos ligandos, testosterona y 5α -dihidrotestosterona. Estos esteroides son los dos principales andrógenos fisiológicos y juegan un rol esencial en la diferenciación, desarrollo y mantenimiento de las funciones reproductivas normales de los individuos. De todos modos, el RA muestra una moderada afinidad por una variedad de hormonas esteroideas.

El RA actúa como un modificador transcripcional de una variedad de genes por unión a un elemento respondedor de andrógenos.

La capacidad de los elementos respondedores para conferir a los andrógenos especificidad de acción, puede depender de los factores específicos de transcripción de la célula y de los elementos *cis-acting* de DNA cercanos a él. Sin embargo, en ciertas instancias, ellos pueden mediar diferentes respuestas fisiológicas. Por ejemplo DHT, pero no T, es capaz de mediar el desarrollo sexual completo de los genitales externos masculinos.

En algunos casos, el RA puede inducir respuestas fisiológicas opuestas en tipos tisulares similares, dependiendo de su ubicación. En otros casos, debido a mutaciones, se altera la expresión o actividad del RA, conduciendo a patologías tales como el cáncer de próstata [Keller E.T., 1996].

Así, numerosos estudios realizados tanto en tumores primarios como en líneas celulares derivadas de cáncer de próstata han demostrado que los andrógenos actúan como agentes mitogénicos, induciendo la proliferación celular. De ahí que la terapia hormonal más ampliamente aceptada en pacientes con cáncer de próstata se basa en el uso de antagonistas de andrógenos, como la flutamida [Delaere K.P.J., 1991].

La presencia de RA en carcinomas prostáticos resulta un marcador muy importante para predecir la respuesta a terapias hormonales; por lo tanto su determinación en las biopsias tumorales es hoy una práctica clínica de rutina. Cabe señalar sin embargo, que la respuesta a las terapias hormonales suele ser transitoria, observándose frecuentemente una evolución hacia la hormono-resistencia.

En general, muchas patologías relacionadas con una sobreproducción androgénica, y vinculadas a órganos tales como piel y próstata, son atacadas mediante la utilización de antiandrógenos. Así, diferentes protocolos terapéuticos, pero basados en la acción antiandrogénica, se han desarrollado para el tratamiento específico del cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, acné, alopecia e hirsutismo femenino [Liao S., 1994; Battmann T., 1994].

La piel, en particular, es un target para los andrógenos y contiene receptores específicos para éstos [Choudhry R., 1992; Liang T., 1993].

El aumento de la producción androgénica en mujeres (hirsutismo) es controlado mediante la administración de un antiandrógeno puro como la flutamida.

Esta estrategia es buena para proteger las células de la piel del hiperandrogenismo.

El hirsutismo femenino se manifiesta por el crecimiento de pelo en sitios anatómicos considerados como características secundarias masculinas, especialmente en el área facial y en el tórax.

La enfermedad se desencadena a partir de un exceso de producción androgénica por parte de los ovarios o de las glándulas adrenales, por un exceso local de formación de andrógenos en la piel, por hipersensibilidad de la piel a los andrógenos o por combinación de cualquiera de las situaciones mencionadas previamente [Luthy I.A., 1987].

Entre los antiandrógenos de utilización frecuente para el tratamiento de patologías vinculadas con la sobreproducción androgénica se encuentra la flutamida (Sch-13521). Este compuesto es una anilina sustituida, 4'nitro-3'trifluorometil isobutiranilida, que no tiene actividad estrogénica, antiestrogénica, progestacional, antiprogestacional, androgénica, adrenocortical o antigonadotrófica. Es un antiandrógeno puro no esteroideo, que a diferencia de los agentes esteroideos que poseen efectos centrales y periféricos, sólo evidencia efectos periféricos. La flutamida ejerce su acción por bloqueo del transporte de testosterona o por inhibición de la unión de la hormona al receptor nuclear de la célula target [Neri R.O., 1972].

La flutamida es utilizada usualmente para el tratamiento del carcinoma prostático debido a que están claramente demostrados los efectos beneficiosos de la privación de andrógenos en el tratamiento de este tipo tumoral [Sufrin G., 1975].

Debido al déficit de andrógenos, inducido en la próstata, se bloquea la retroalimentación negativa ejercida por los andrógenos sobre hipotálamo e hipófisis, produciendo en consecuencia un incremento en la liberación de gonadotrofinas y en la producción de testosterona.

En relación con esto, la flutamida, normalmente, no produce impotencia en pacientes sexualmente activos, siendo un compuesto con pocos efectos colaterales [Delaere K.P.J., 1991].

En pacientes con cáncer de próstata, se ha demostrado que la administración crónica por más de 4 años no ocasiona efectos colaterales [Berrevoets C.A., 1993].

En general, los antiandrógenos actúan por inhibición de la unión de los andrógenos al receptor. Algunos mecanismos lo relacionan con la inducción de una conformación anormal del receptor por impedimento de translocación del receptor al núcleo, disociación del complejo-receptor-heteromérico, disociación del receptor y de la unión del receptor al DNA e impedimento de la interacción del receptor unido al DNA con los factores de transcripción.

Con respecto a la flutamida, el compuesto se comporta como un verdadero antagonista, produce transporte nuclear pero falla para trans-activar elementos respondedores a andrógenos, bloqueando la activación por andrógenos [Zhong-Xun Z., 1994].

Los estudios sobre el mecanismo de acción de la flutamida realizados en ratas, revelaron que la droga inhibe la formación de complejo andrógeno-RA y disminuye el transporte y la retención nuclear del andrógeno, ejerciendo un claro efecto antiandrogénico sobre las estructuras sexuales secundarias [Peets E.A., 1974].

Debido a que la capacidad de los andrógenos y de los estrógenos para estimular el crecimiento de algunos cánceres endocrinos está bien establecido, muchas terapias endocrinas se basan en el bloqueo de la actividad hormonal.

Generalmente se utilizan compuestos no-esteroides como Tam y Flu, esteroides como ICI 182.780 y acetato de ciproterona e inhibidores esteroides y no-esteroides de aromatasas. Andrógenos y estrógenos regulan la expresión de algunas proteínas implicadas en el control de la proliferación celular. Algunas de estas proteínas son factores de crecimiento o sus receptores. Alternativamente los esteroides pueden regular la expresión de ciertas ciclinas o inhibidores de quinasas y controlar directamente la progresión del ciclo celular.

Como se mencionó previamente, numerosos estudios realizados, tanto en tumores de próstata como en líneas celulares de próstata y de melanoma humano, han demostrado que los andrógenos actúan como agentes mitogénicos, induciendo la proliferación celular [Delaere K.P.J., 1991; Rampen F.J.H.; 1980; Shaw H.M., 1978].

La idea de utilizar antagonistas de andrógenos, como la flutamida, para llevar a cabo una terapia hormonal en pacientes con melanoma, podría representar una alternativa terapéutica interesante.

OBJETIVOS:

Como hemos visto en esta Introducción, la evolución de los melanomas humanos es de difícil predicción y la respuesta a las terapias antineoplásicas es pobre. Por otra parte, y a pesar de la alta complejidad alcanzada en el tratamiento de este tipo tumoral, el melanoma humano continúa siendo una causa de muerte de importancia entre los hombres caucásicos. Resulta necesario entonces lograr una mayor comprensión de la biología del melanoma e investigar nuevas modalidades terapéuticas.

En base a estas observaciones, el objetivo principal planteado en este trabajo de Tesis ha sido: el estudio de la influencia hormonal, en particular, de la acción androgénica y antiandrogénica, en el desarrollo del melanoma maligno humano. Los datos obtenidos se presentan y discuten en el Capítulo Resultados de esta Tesis.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- DETERMINACION DE RECEPTORES ANDROGENICOS Y DE SU ESPECIFICIDAD EN LINEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO

Con el propósito de evaluar la existencia de receptores androgénicos (RA) en melanoma humano, se efectuaron análisis de células enteras de tres líneas celulares. Las líneas IIB-MEL-J [Guerra L., 1989], IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN [Kairiyama C., 1995] fueron originalmente establecidas a partir de lesiones de melanomas metastásicos provenientes de tres pacientes de sexo masculino.

Las células se incubaron en presencia de 2,5 a 25 nM de metiltienolona ($[^3\text{H}]$ -R1881) en medio melanoma control y en presencia de un exceso de 1000x de acetona de triamcinolona (TA), tal como se indica en Materiales y Métodos (Mat. y Mét.).

El $[^3\text{H}]$ -R1881 es un esteroide sintético que se une con alta afinidad al RA, no es metabolizado fácilmente durante el ensayo y no interactúa con proteínas transportadoras de hormonas sexuales (SHBG) [Bonné C., 1976]; pero, dado que se une también con alta afinidad al receptor de progesterona (RPg) [Ojasoo T., 1978], se hace necesario el agregado de un exceso de TA para evitar la eventual unión a dicho receptor [Asslin J., 1979].

Los análisis de Scatchard de las tres líneas estudiadas, mostrados en la figura 1, revelaron la presencia de un solo tipo de receptor con una constante de disociación aparente (K_d) de 11 nM a 37 °C y una capacidad de unión de 326 fmol/mg de proteína, 58,4 fmol/ 10^6 células o de 35.000 sitios por célula para IIB-MEL-J; una K_d de 15 nM a 37 °C y una capacidad de unión de 280,6 fmol/mg de proteína, 30,8 fmol/ 10^6 células o de 18.500 sitios por célula en el caso de IIB-MEL-LES; y una K_d de 14 nM a 37 °C, capacidad de unión de 206,4 fmol/mg de proteína, 25,59 fmol/ 10^6 células o de 15.400 sitios por célula en el caso de IIB-MEL-IAN.

Las rectas de mejor ajuste se determinaron por análisis de regresión lineal y el coeficiente de determinación r^2 fue de 0,91 ($p= 0,0119$) en el caso de IIB-MEL-J; 0,94 ($p= 0,0063$) para IIB-MEL-LES y de 0,98 ($p= 0,0002$) para IIB-MEL-IAN. Los valores de p se calcularon utilizando el test de F.

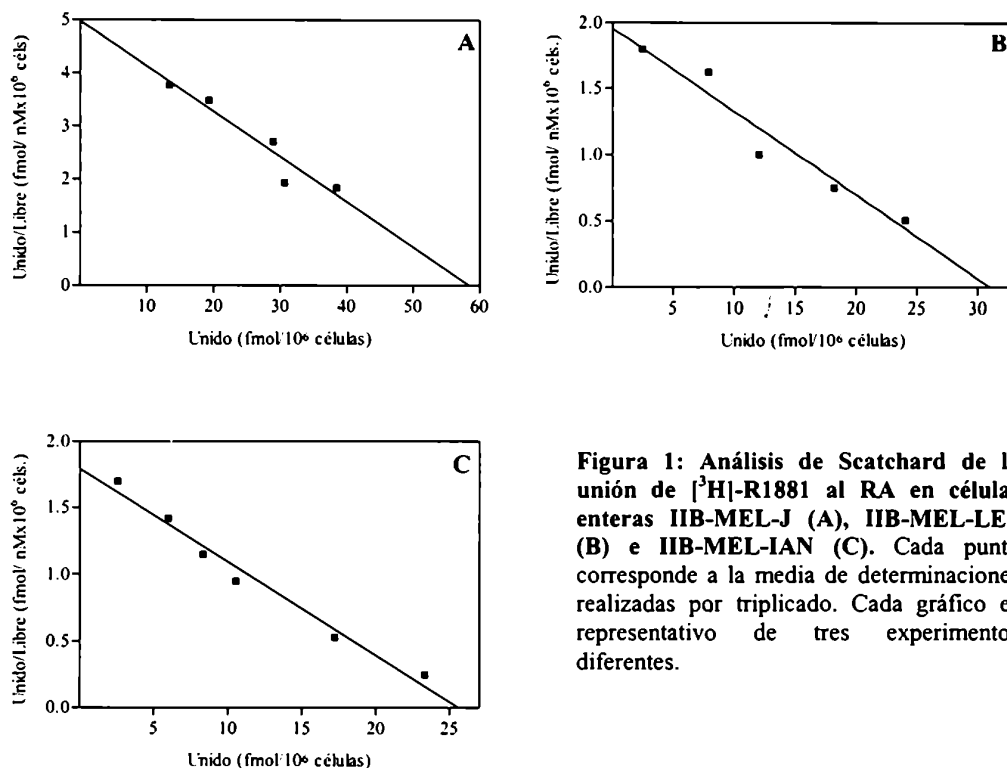


Figura 1: Análisis de Scatchard de la unión de $[^3\text{H}]\text{-R1881}$ al RA en células enteras IIB-MEL-J (A), IIB-MEL-LES (B) e IIB-MEL-IAN (C). Cada punto corresponde a la media de determinaciones realizadas por triplicado. Cada gráfico es representativo de tres experimentos diferentes.

Para determinar la especificidad de la unión del esteroide sintético al RA se incubaron, en ensayos separados, células enteras IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN en presencia de concentraciones no saturantes del ligando $[^3\text{H}]\text{-R1881}$, TA en un exceso de 1000 veces y distintas concentraciones de testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT), R1881, hidroxi-flutamida (OH-Flu), estradiol (E_2), progesterona (Pg) o cortisol (F) no marcados, según se indicó en (Mat. y Mét.)

Los resultados mostrados en la tabla 1 (A), (B) y (C) revelan que no sólo los andrógenos (T, DHT, R1881) y el antiandrógeno (OH-Flu) compitieron con [³H]-R1881, sino que E₂, Pg y F en un exceso de 500x fueron capaces de desplazar la unión del esteroide sintético al RA en los tres casos estudiados.

La inespecificidad en la competencia de las hormonas y antihormonas por la unión del [³H]-R1881 al RA reveló un comportamiento atípico para los receptores descritos en estas líneas celulares.

Tabla 1: Especificidad de la unión de [³H]-R1881 a células enteras IIB-MEL-J (A), IIB-MEL-LES (B) e IIB-MEL-IAN (C). Estos resultados son representativos de 3 experimentos por cada línea celular. Cada punto corresponde a la media de determinaciones realizadas por triplicado \pm SEM (error estándar de la media) #p<0,01; *p<0,001 con respecto al control por ANOVA seguido por el test de comparación múltiple Tukey- Kramer.

Control: ausencia de hormona competidora inerte.

| A) HORMONA | 100 X (DPM \pm SEM) | 500 X (DPM \pm SEM) | 1000 X (DPM \pm SEM) |
|----------------------|---|---|--|
| Control | 45.750 \pm 2.037 | 45.750 \pm 2.037 | 45.750 \pm 2.037 |
| T | 26.765 \pm 2.037* | 22.408 \pm 728* | |
| DHT | 29.956 \pm 315# | 23.869 \pm 820* | |
| R1881 | 20.734 \pm 1.036* | 16.189 \pm 2.350* | |
| OH-Flu | | | 25.040 \pm 1.778* |
| E₂ | | 18.935 \pm 655* | |
| Pg | | 20.230 \pm 311* | |
| F | | 21.414 \pm 1.735* | |
| DOCA | | 26.760 \pm 422* | |

| B) HORMONA | 100 X (DPM ± SEM) | 500 X (DPM ± SEM) | 1000 X (DPM ± SEM) |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Control | 20.429 ± 2.896 | 20.429 ± 2.896 | 20.429 ± 2.896 |
| T | 8.400 ± 585* | 7.779 ± 430* | |
| DHT | 8.194 ± 996* | 6.734 ± 369* | |
| R1881 | 8.383 ± 786* | 8.084 ± 654* | |
| OH-Flu | | | 7.597 ± 513* |
| E₂ | | 12.741 ± 1.227# | |
| Pg | | 8.831 ± 238* | |
| F | | 9.569 ± 764* | |
| DOCA | | 9.197 ± 123* | |

| C) HORMONA | 100 X (DPM ± SEM) | 500 X (DPM ± SEM) | 1000 X (DPM ± SEM) |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Control | 4.978 ± 312 | 4.978 ± 312 | 4.978 ± 312 |
| T | 2.957 ± 125* | 2.392 ± 96* | |
| DHT | 3.008 ± 406* | 2.488 ± 197* | |
| R1881 | 2.405 ± 106* | 1.983 ± 133# | |
| OH-Flu | | | 2.387 ± 236* |
| E₂ | | 3.258 ± 200* | |
| Pg | | 3.059 ± 218* | |
| F | | 3.582 ± 123* | |
| DOCA | | 3.082 ± 69* | |

2.- UNION DE [³H]-E₂ Y [³H]-R5020 A CELULAS ENTERAS IIB-MEL-J

Con el objeto de investigar las características de la unión del [³H]-R1881 al RA, se realizaron ensayos bioquímicos de unión de [³H]-E₂ y del progestágeno tritiado [³H]-R5020 en presencia y ausencia de DHT inerte en células IIB-MEL-J.

Cuando [³H]-E₂ fue competido con el antiestrógeno frío dietilestilbestrol (Des) en ausencia de DHT inerte, se obtuvo una unión específica de 83.050 ± 15.731 dpm. Esta unión fue completamente suprimida al realizar los ensayos en presencia de DHT inerte (tabla 2A).

Ensayos similares utilizando [³H]-R5020 mostraron que la unión específica del ligando radiactivo competido con el mismo compuesto frío en ausencia de DHT fue de 90.439 ± 12.687 dpm. Esta unión se anuló totalmente en presencia de DHT (tabla 2B).

Estos resultados sugieren una acción cruzada por parte de E₂ y Pg con el RA.

Tabla 2: Unión de [³H]-E₂ (A) o de [³H]-R5020 (B) a células IIB-MEL-J en presencia o ausencia de DHT. Los resultados de cada tabla son representativos de 2 experimentos. SEM representa el error de la media de puntos realizados por triplicado.

| A | [³H]-E₂ (dpm ± SEM) | [³H]-E₂ + Des (dpm ± SEM) | Unión Específica (dpm ± SEM) |
|--------------|--|--|---|
| - DHT | 373.846 ± 5.626 | 290.796 ± 21.755 | 83.050 ± 15.731 |
| + DHT | 295.448 ± 13.510 | 355.148 ± 43.256 | - |

| B | [³H]-R5020 (dpm ± SEM) | [³H]-R5020 + R5020 (dpm ± SEM) | Unión Específica (dpm ± SEM) |
|--------------|--|--|---|
| - DHT | 505.106 ± 16.694 | 414.667 ± 14.292 | 90.439 ± 12.687 |
| + DHT | 265.259 ± 9.245 | 257.602 ± 17.778 | - |

3.- MARCACION DE RECEPTORES DE ESTEROIDES EN LINEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO

Para determinar la expresión de RA, receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RPg) se realizaron inmunocitoquímicas (ICQ) de células IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN creciendo en monocapas celulares sobre portaobjeto o embebidas en medio de inclusión de tejidos (OCT), según se indica en Mat. y Mét.

La utilización del anticuerpo policlonal anti-RA AR52 [Tan J., 1988] reveló una tinción vigorosa (+++) en núcleo y en el citoplasma (++) de células IIB-MEL-J (datos no mostrados). A partir de estos resultados, a fin de evitar la alta reactividad citoplasmática encontrada con este anticuerpo, se efectuaron inmunocitoquímicas utilizando el anticuerpo monoclonal (AMC) anti-RA ANI-15 [Chang C., 1989].

Para las determinaciones de RE y RPg se utilizaron kits de AMC anti-RE y anti-RPg respectivamente. Los preparados se observaron al microscopio, evaluándose la expresión de los receptores hormonales.

Los resultados de la tabla 3 revelan inmuno- reactividad positiva para RA, con tinción nuclear vigorosa (76% a 100% de las células analizadas) e intensidad marcada, y reactividad negativa para RE y RPg en las tres líneas de melanoma estudiadas. Estos resultados se obtuvieron en células creciendo en monocapa celular y en pellets de OCT.

Los análisis de ICQ con ANI-15 de la línea celular de carcinoma mamario IIB-BR-G [Bover L., 1991] revelaron inmuno-reactividad negativa para este tipo celular (dato no mostrado).

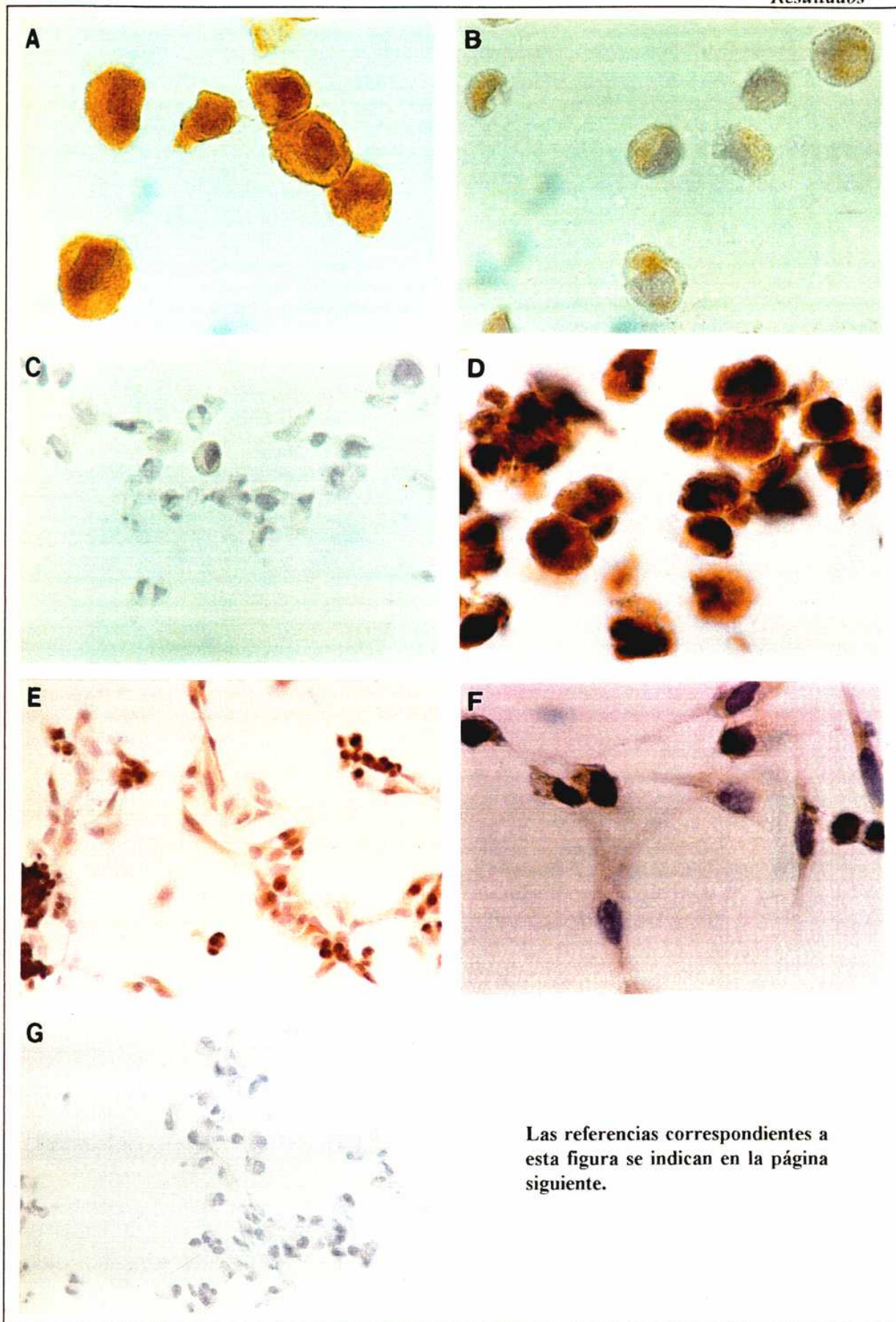
Tabla 3: Reactividad de AMC anti-receptores hormonales en líneas de melanoma en monocapas celulares y en OCT. Se utilizó AMC AN1-15 para RA, AMC ER-ICA para RE y AMC PR-ICA para RPg.

| Positividad de Células^a | | | |
|---|------------------|--------------------|--------------------|
| | IIB-MEL-J | IIB-MEL-LES | IIB-MEL-IAN |
| RA | ++++ | ++++ | ++++ |
| RE | - | - | - |
| RPg | - | - | - |

a: porcentaje promedio de células positivas= +: 0-25%, ++: 26-50%, +++: 51-75 %, ++++: 76-100 %, se considera como 100% al total de células tumorales.

-: inmuno-reactividad negativa.

En la figura 2 se muestran microfotografías de los análisis ICQs realizados en las tres líneas de melanoma humano. Las células RA positivas presentaron una intensa coloración marrón en sus núcleos y leve tinción citoplasmática propia de este anticuerpo.



Las referencias correspondientes a esta figura se indican en la página siguiente.

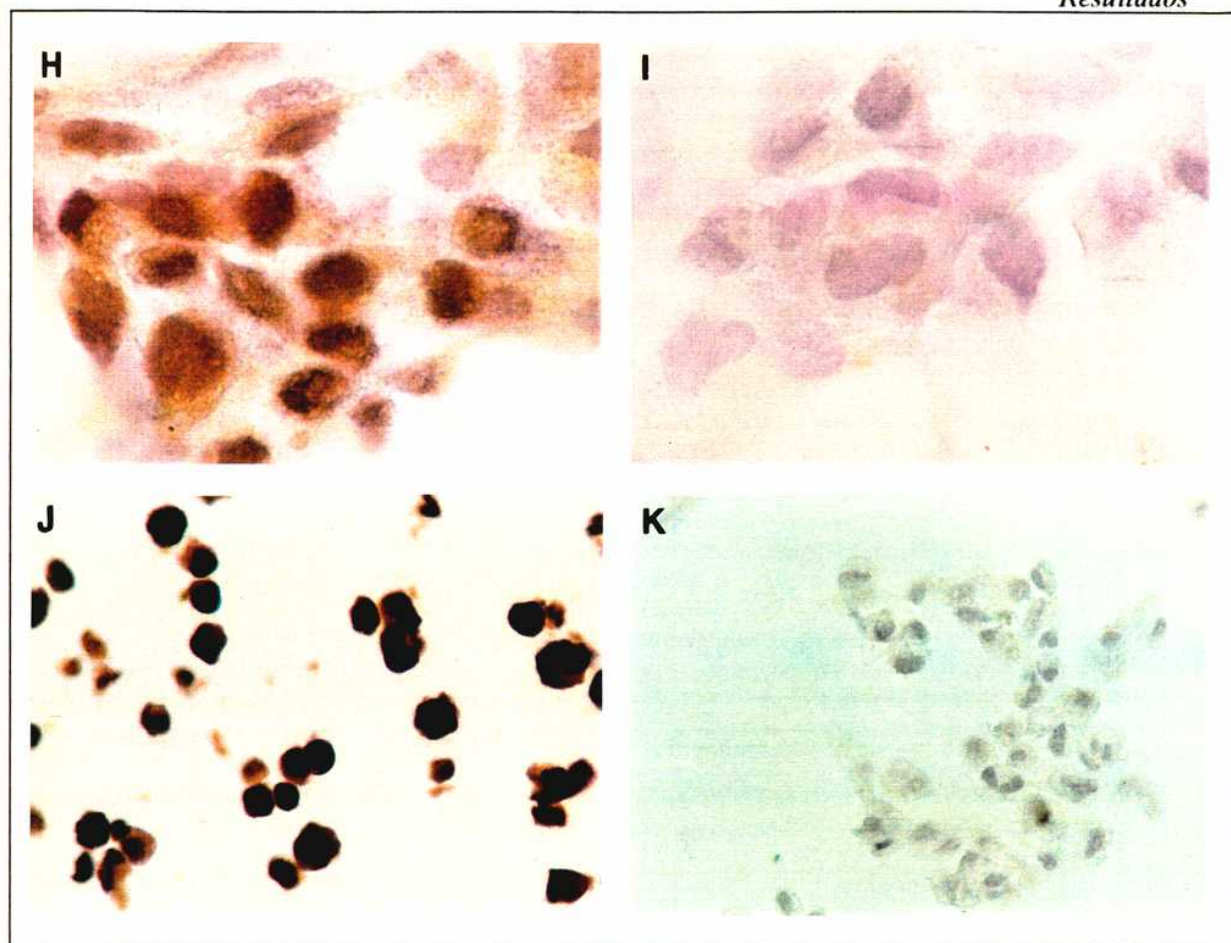


Figura 2: Determinación por inmunocitoquímica de receptores hormonales en IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. Se determinó la presencia de receptores hormonales mediante ICQ utilizando: A) AMC anti-RA AN1-15 en IIB-MEL-J en OCT (100x), B) PBS de IIB-MEL-J en OCT (100x), C) AMC ER-ICA en IIB-MEL-J en OCT (40x), D) AMC anti-RA AN1-15 en IIB-MEL-LES en OCT (100x), E) AMC anti-RA AN1-15 en IIB-MEL-LES fijadas (40x), F) PBS en IIB-MEL-LES fijadas (100x), G) AMC PgR-ICA en IIB-MEL-LES fijadas (40x), H) AMC anti-RA AN1-15 en IIB-MEL-IAN fijadas (100x), I) PBS de IIB-MEL-IAN fijadas (100x), J) AMC anti-RA AN1-15 en IIB-MEL-IAN en OCT (40x) y K) AMC ER-ICA en IIB-MEL-IAN en OCT (40x).

Estos resultados confirman, por un lado, la expresión de RA, y por otro, una acción cruzada de las hormonas con dicho receptor. Esto último se concluye debido a la negatividad obtenida en las determinaciones ICQs ensayadas en las tres líneas de melanoma y por los estudios de competencia y desplazamiento de ligandos radiactivos.

4.- EXPRESION DE RECEPTORES DE ANDROGENOS EN BIOPSIAS DE TEJIDOS TUMORALES Y NORMALES

Con la idea de analizar si la presencia de RA en las líneas celulares (*Resultados 3-*) era extensible a tumores de melanoma humano, se analizó por inmunohistoquímica (IHQ) la expresión de RA en biopsias tumorales obtenidas de 10 pacientes con metástasis de melanoma.

Para esto, se realizaron cortes histológicos de dichos tumores en crióstato, y sobre cada sección se realizaron IHQs con AMC AN1-15, tal cual se describe en Mat. y Mét. Los preparados se observaron al microscopio, evaluándose los porcentajes de células que expresan RA y la intensidad de la reacción.

Los resultados expresados en la tabla 4, indican que el 100% (10/10) de los tumores analizados presentaron reactividad positiva con al AMC AN1-15. En la mayor parte de los casos se obtuvo una intensidad marcada y un alto porcentaje promedio de células.

Tabla 4: Inmunohistoquímica del RA en cortes por congelación de metástasis de melanomas de distintos pacientes utilizando el AMC anti-RA, AN1-15.

| Paciente | Sexo | Positividad de células^a | Intensidad^b |
|-----------------|-------------|---|-------------------------------|
| C.T. | M | ++++ | Marcada |
| G.B. | M | ++++ | Marcada |
| G.H. | F | ++++ | Marcada |
| M.B. | M | ++++ | Marcada |
| J.E. | M | ++++ | Marcada |
| J.L. | M | +++ | Marcada |
| A.V. | F | ++++ | Marcada |
| O.O. | M | ++++ | Marcada |
| M.G. | F | ++ | Marcada |
| E.C. | M | +++ | Moderada |

a: porcentaje promedio de células positivas= +: 0-25%, ++: 26-50%, +++: 51-75 %, ++++: 76-100 %, se considera como 100% al total de células tumorales.

b: intensidad de la reacción= leve, moderada, marcada.

En la figura 3 se muestran algunas de las microfotografías de IHQs con AN1-15 descritas en la tabla 4. Puede observarse que las células tumorales presentaron coloración marrón en sus núcleos mientras que los fibroblastos adyacentes resultaron negativos para el RA.

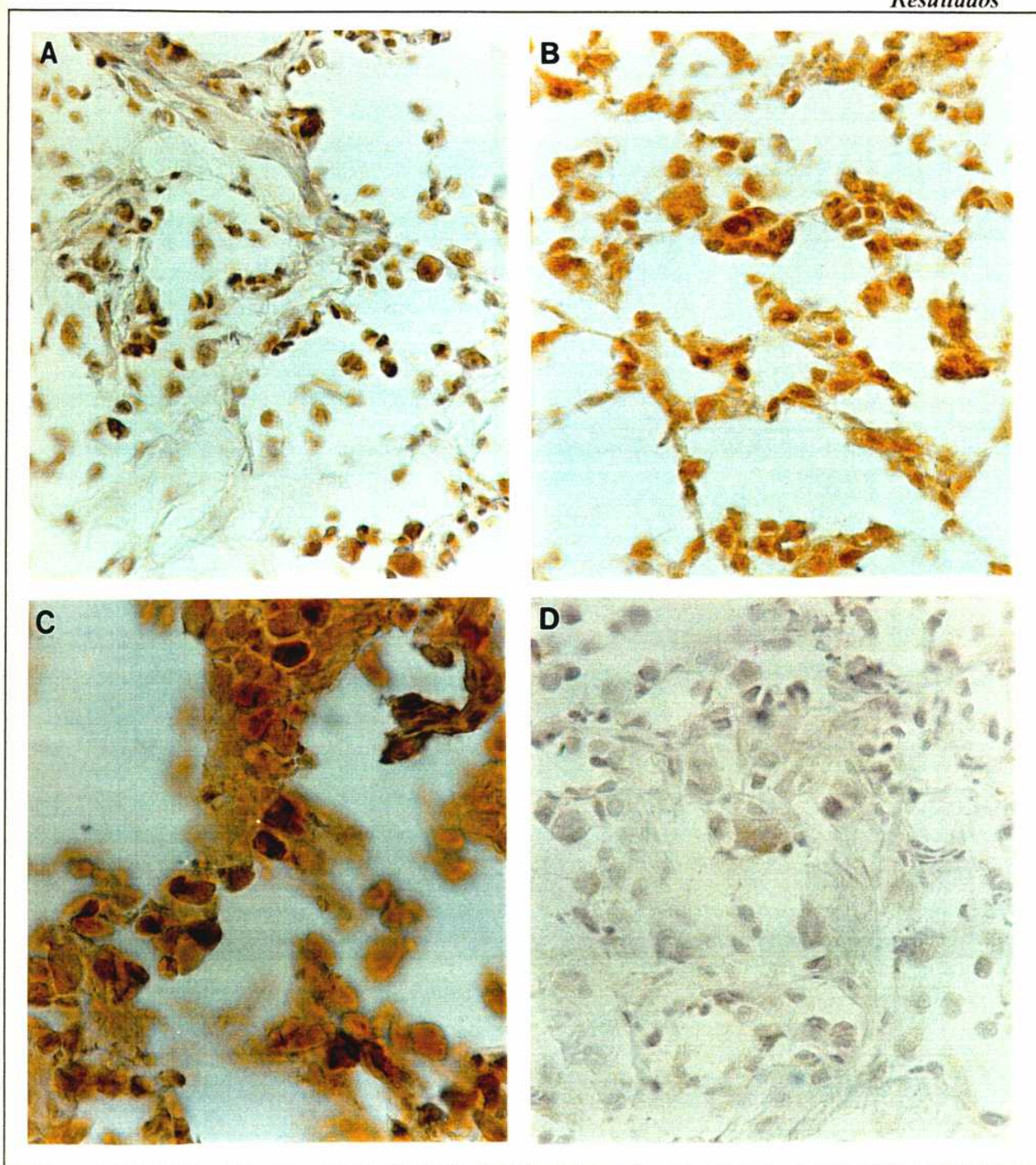


Figura 3: Determinación de RA por inmunohistoquímica en tejidos tumorales. Se determinó la presencia de RA en metástasis de melanomas provenientes de distintos pacientes utilizando el AMC ANI-15. A) G.B. (20x), B) A.V. (20x), C) C.T. (40x) y D) PBS de G.B. (40x).

En la tabla 5 se muestran los resultados de inmunohistoquímicas utilizando AN1-15 en biopsias de tejidos humanos normales. Como se indica en la tabla 5, tejidos normales de mama, pulmón, timo y tiroides resultaron negativos para RA mientras piel y tejidos típicamente respondedores a los andrógenos resultaron marcadamente reactivos para el anticuerpo anti-RA. En el caso de piel normal la tinción fue intensa en queratinocitos y en glándulas sudoríparas. La localización subcelular del RA fue, principalmente, nuclear.

Tabla 5: Determinaciones inmunohistoquímicas del RA en cortes por congelación de tejidos humanos normales utilizando el AMC anti-RA, AN1-15.

| Tejidos examinados | Tipo celular | Positividad de células ^a | Intensidad ^b |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Timo | - | - | - |
| Tiroides | - | - | - |
| Glándula mamaria | - | - | - |
| Pulmón | - | - | - |
| Piel | Queratinocitos superficiales | ++++ | Marcada |
| | Queratinocitos intermedios | +++ / ++++ | Marcada |
| | Queratinocitos basales | +++ / ++++ | Marcada |
| | Dermis | - | - |
| | Glándulas sudoríparas | ++ | Marcada |
| Próstata | Epitelio | ++ / ++++ | Marcada y moderada |
| | Estroma | | |
| | Fibroblastos | - | |
| Epidídimo | Epitelio | ++ / ++++ | Marcada |
| | Estroma | - | |
| | Músculo liso | - | |
| Testículo | Células de Sertoli | ++ / +++ | Leve y moderada |
| | Células germinales | - | - |
| | Células de Leydig | ++ | Leve |
| | Fibroblastos | - | - |

a: porcentaje promedio de células positivas= +: 0-25%, ++: 26-50%, +++: 51-75 %, ++++: 76-100 %, se considera como 100% al total de células tumorales.

b: intensidad de la reacción= leve, moderada, marcada.

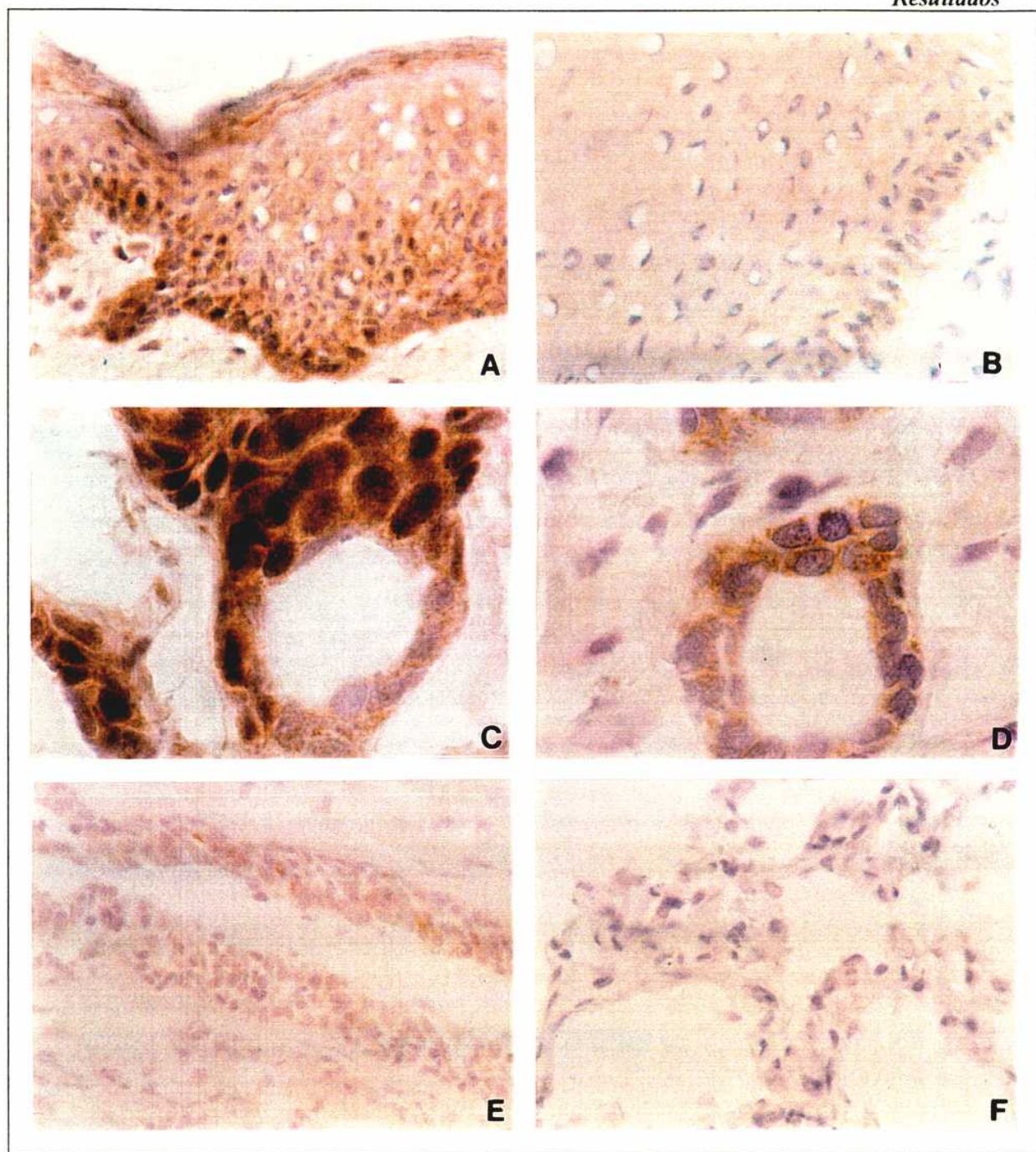


Figura 4: Determinación de RA por inmunohistoquímica en biopsias de tejidos normales humanos. Se determinó la presencia de RA utilizando el AMC AN1-15 en: A) piel (40x), C) próstata (100x), E) mama (40x) y F) pulmón (40x). Se muestran los PBS realizados en: B) piel (40x) y D) próstata (100x).

5.- DETERMINACION DEL EFECTO DE ANTIANDROGENOS Y ANDROGENOS SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR

Con el propósito de estudiar la acción biológica del receptor, se crecieron células IIB-MEL-J en presencia del antiandrógeno Flutamida (Flu) y de su metabolito biológicamente activo, hidroxiflutamida (OH-Flu), en medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino (FBS); a los tiempos indicados las células se tripsinizaron y se contaron en hemocitómetro, según se indicó en Mat. y Mét.

En la figura 5 se muestra la cinética de crecimiento de las células IIB-MEL-J en presencia de Flu (A) e OH-Flu (B). Puede observarse que en todas las dosis testeadas de Flu y de OH-Flu se obtuvo una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación celular respecto de la curva control de una manera dosis-dependiente. Dosis mayores a las indicadas (Flu 160 μM , OH-Flu 20 μM) resultaron tóxicas, provocando muerte celular (datos no mostrados). La viabilidad, en todos los casos, se evaluó por exclusión de azul tripán.

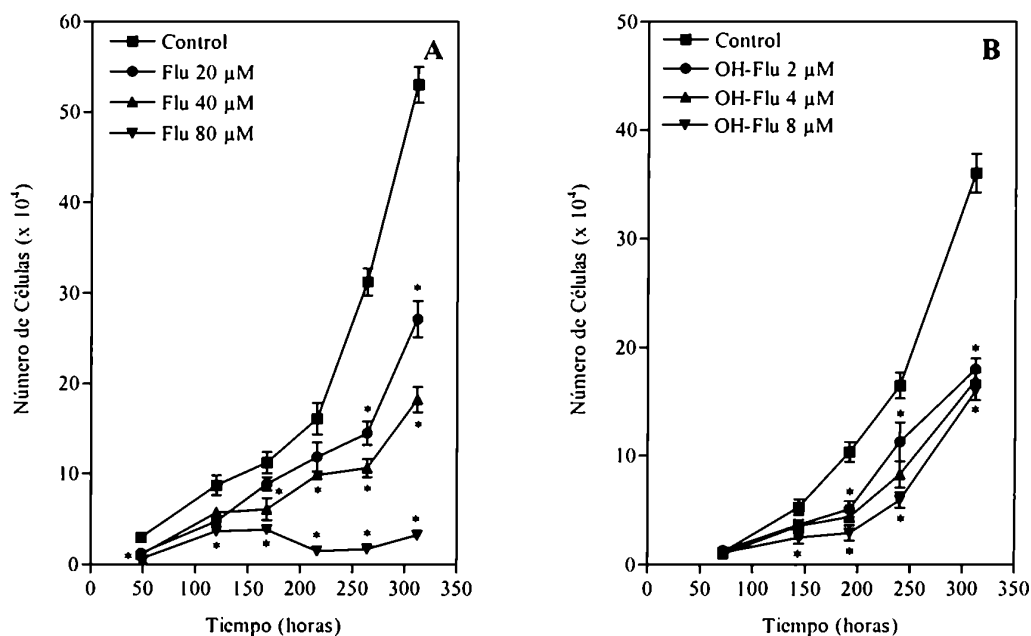


Figura 5: Efecto de Flu y de su metabolito OH-Flu sobre la proliferación celular de IIB-MEL-J. El efecto de diferentes concentraciones de Flu (A) y de OH-Flu (B) sobre la proliferación de IIB-MEL-J se ensayó en presencia de 10% de FBS, como se describe en Mat. y Mét. Cada punto representa la media de puntos realizados por triplicados; barras: SEM.; * $p < 0,05$; las diferencias significativas respecto de los valores control fueron evaluadas por ANOVA seguido por el test de Tukey. Los datos graficados son representativos de al menos tres experimentos.

Cuando el mismo tipo de experimento fue realizado utilizando células de cáncer de mama humano MCF-7 e IIB-BR-G [Bover L., 1991] no existieron diferencias significativas entre los ensayos en presencia y ausencia de antiandrógenos (figura 6). Para ambas líneas celulares, concentraciones de 160 μM de Flu y 20 μM de OH-Flu resultaron letales. La viabilidad celular se evaluó por exclusión de azul tripán (datos no mostrados).

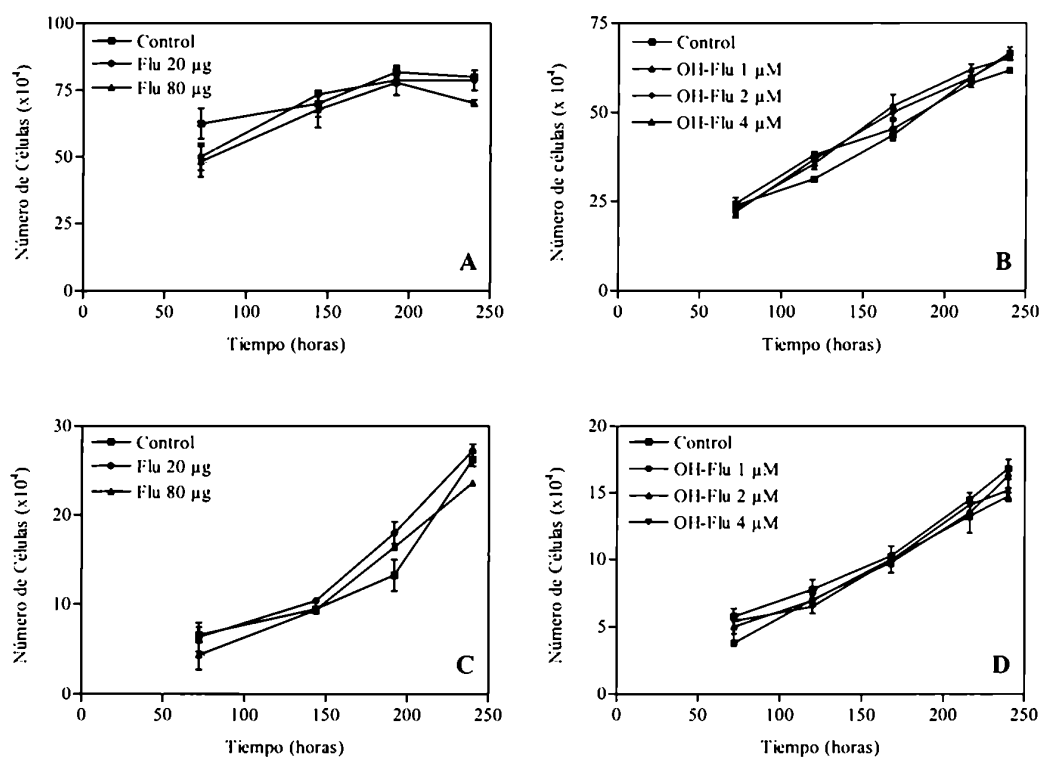


Figura 6: Efecto de Flu e OH-Flu sobre la proliferación de células MCF-7 e IIB-BR-G. El efecto de diferentes concentraciones de Flu e OH-Flu sobre la proliferación de células MCF-7 (A-B) o IIB-BR-G (C-D) se ensayó en presencia de 10% de FBS, como se describe en Mat. y Mét. Cada punto representa la media de puntos realizados por triplicados; barras: SEM.

Para estudiar la acción androgénica, células IIB-MEL-J e IIB-MEL-LES se crecieron en medio de cultivo con 1% de FBS adsorbido con carbón activado, con el objeto de eliminar los esteroides presentes en el suero, en presencia de 10^{-10} , 10^{-8} y 10^{-6} M de DHT, tal cual se indica en Mat. y Mét.

Los resultados graficados en la figura 7 muestran una acción bifásica de la DHT [Launoit I., 1991] obteniéndose una mayor estimulación del crecimiento celular con 10 nM de la droga en ambas líneas celulares. A mayores o menores concentraciones, la estimulación se revierte.

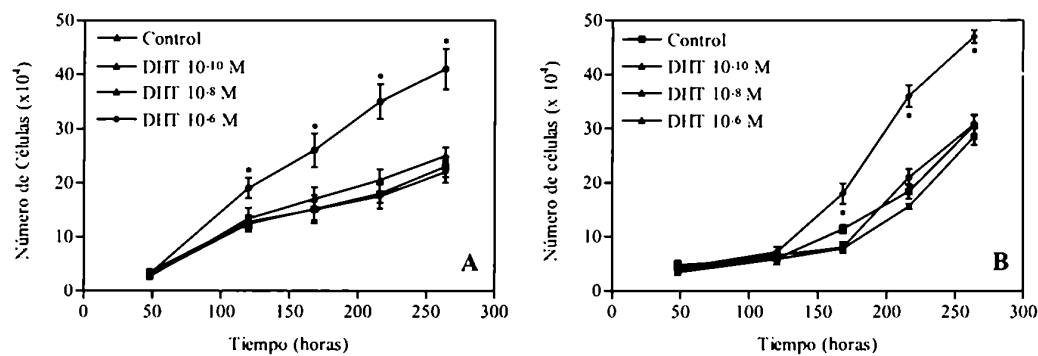


Figura 7: Efecto de DHT sobre la proliferación celular de IIB-MEL-J e IIB-MEL-LES. El efecto de diferentes concentraciones de DHT sobre la proliferación de células IIB-MEL-J (A) o IIB-MEL-LES (B) se ensayó en presencia de 1% de FBS adsorbido con carbón, como se describe en Mat. y Mét. Cada punto representa la media de triplicados; barras: SEM.; * $p < 0,05$; las diferencias significativas respecto de los valores control fueron evaluadas por ANOVA seguido por el test de Tukey. Cada gráfico es representativo de dos experimentos.

6.- ACCION ANDROGENICA Y ANTIANDROGENICA EN IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES E IIB-MEL-IAN

Con el propósito de investigar la acción de andrógenos y antiandrógenos sobre el crecimiento de células de melanoma humano se incubaron, en ensayos separados, células IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN en presencia de los andrógenos DHT 10 nM y Testosterona (T) 20 nM y de los antiandrógenos OH-Flu 4 μ M y Casodex (Cas) 20 nM, en medio de cultivo con 1% de suero fetal adsorbido con carbón activado, según se indicó en Mat. y Mét.

En la figura 8 se representan los resultados obtenidos para la línea IIB-MEL-J. Puede observarse que DHT y T inducen un crecimiento celular significativo respecto de la curva control (A y B) mientras que con OH-Flu o Cas se obtienen valores semejantes a los controles (A o B, C o D).

En la misma figura, se muestra también que cuando las células son incubadas simultáneamente con un andrógeno y un antiandrógeno se produce una inhibición significativa de la proliferación celular; así, la estimulación inducida por DHT es revertida por OH-Flu y por Cas (A y C) y el efecto estimulador obtenido con T es inhibido de igual modo por OH-Flu y Cas (C y D) resultando en un nivel de proliferación semejante al control.

Se realizaron ensayos similares para evaluar la acción de andrógenos y antiandrógenos en IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. Los resultados representados en las figuras 9 y 10 revelan el mismo patrón de acción que en el caso de IIB-MEL-J.

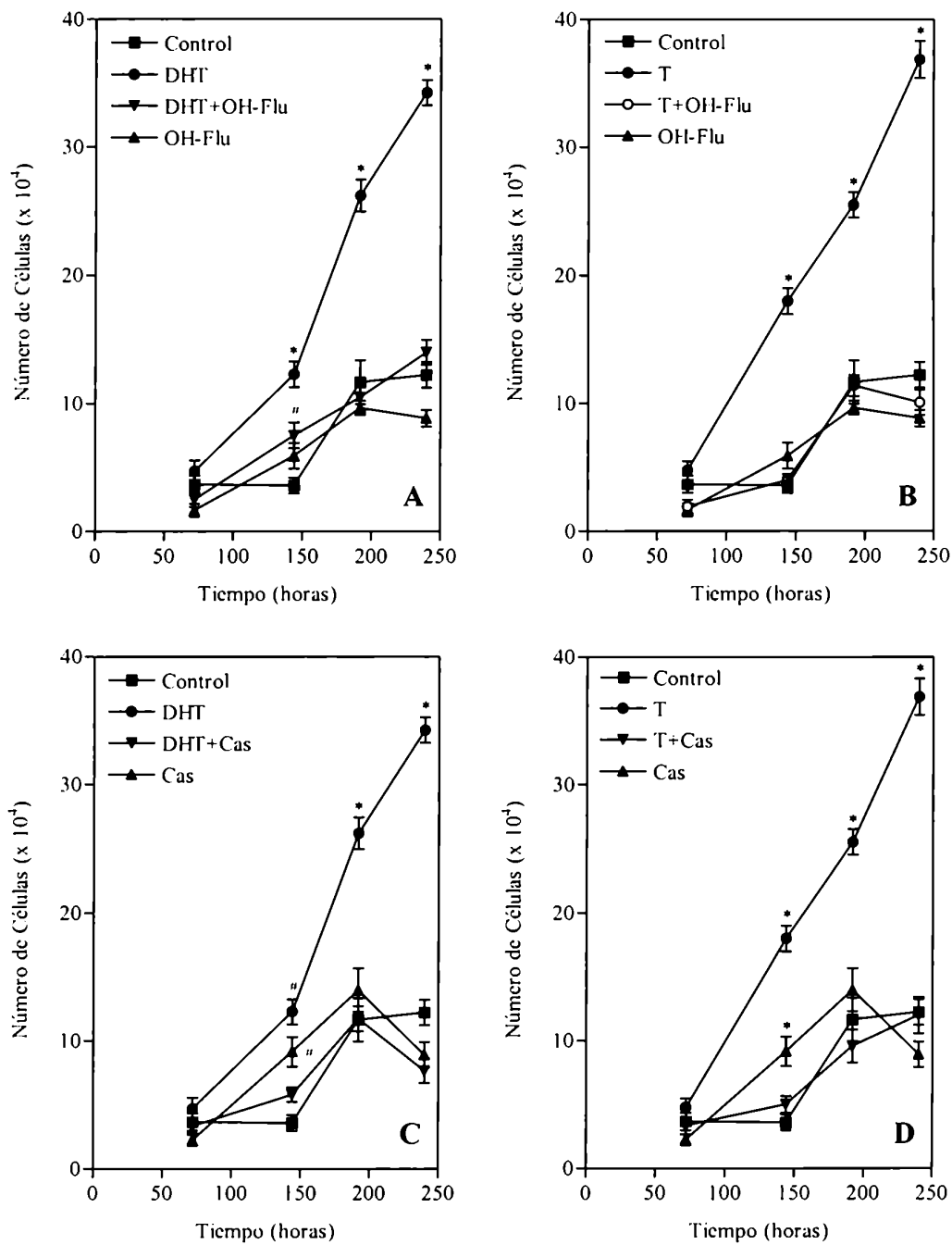


Figura 8. Efecto de andrógenos y antiandrógenos sobre el crecimiento celular de IIB-MEL-J. Se ensayó el efecto de DHT 10 nM, T 20 nM, OH-Flu 4 μ M y Cas 20 nM sobre la proliferación de IIB-MEL-J en 1% de FBS adsorbido con carbón, según se indica en Mat. Met. Cada punto es la media de triplicados; barras: S.E.M.; * $p < 0,001$ y # $p < 0,05$; las diferencias significativas de los valores control fueron evaluadas por ANOVA seguido por el test de Tukey. Cada gráfico es representativo de tres experimentos.

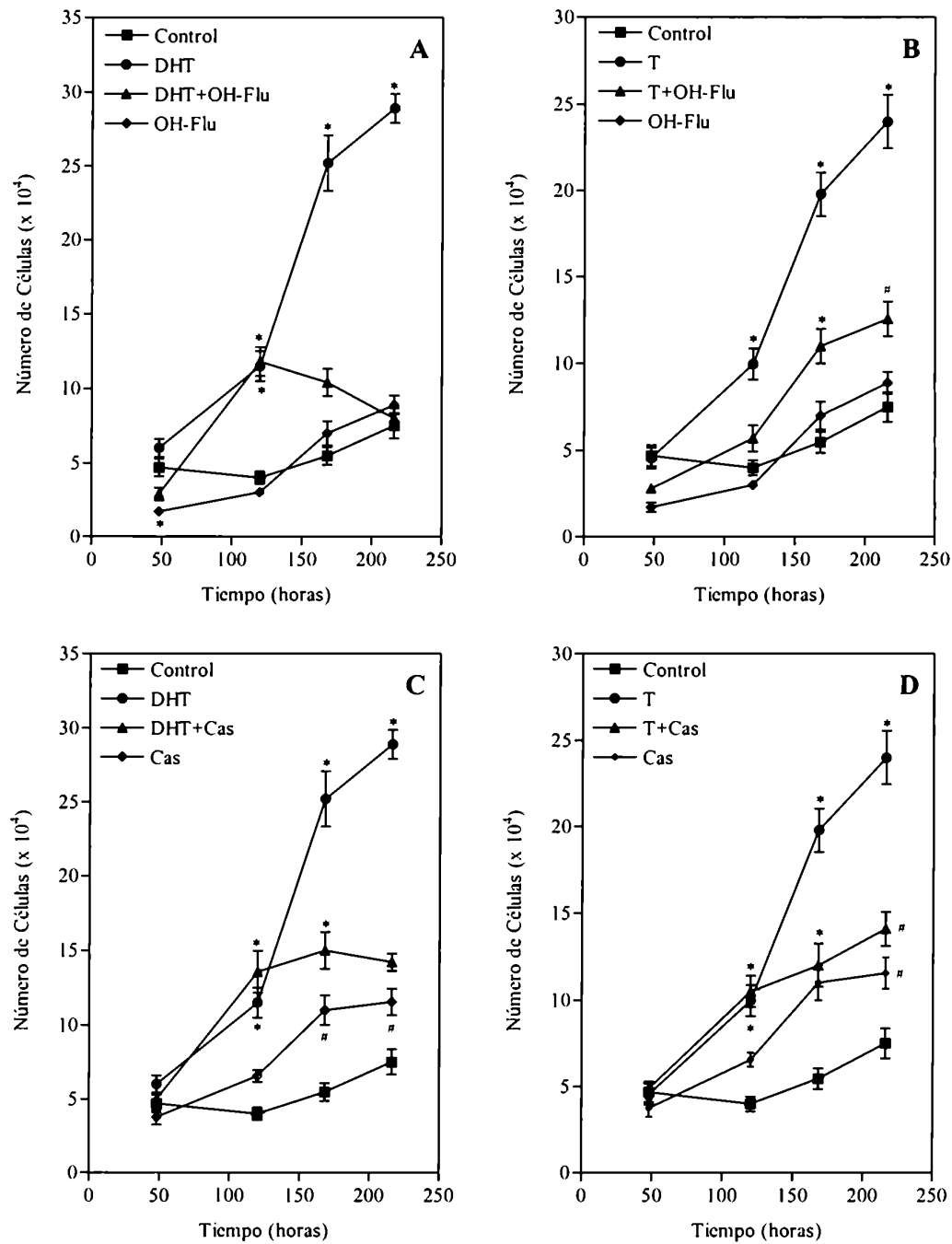


Figura 9. Efecto de andrógenos y antiandrógenos sobre el crecimiento celular de IIB-MEL-LES. Se ensayó el efecto de DHT 10 nM, T 20 nM, OH-Flu 4 μ M y Cas 20 nM sobre la proliferación de IIB-MEL-LES en presencia de 1% de FBS adsorbido con carbón, según se indica en Mat. Met. Cada punto es la media de triplicados; barras: S.E.M.; * $p < 0,001$ y #: $p < 0,01$; las diferencias significativas de los valores control fueron evaluadas por ANOVA seguido por el test de Tukey. Cada gráfico es representativo de dos experimentos.

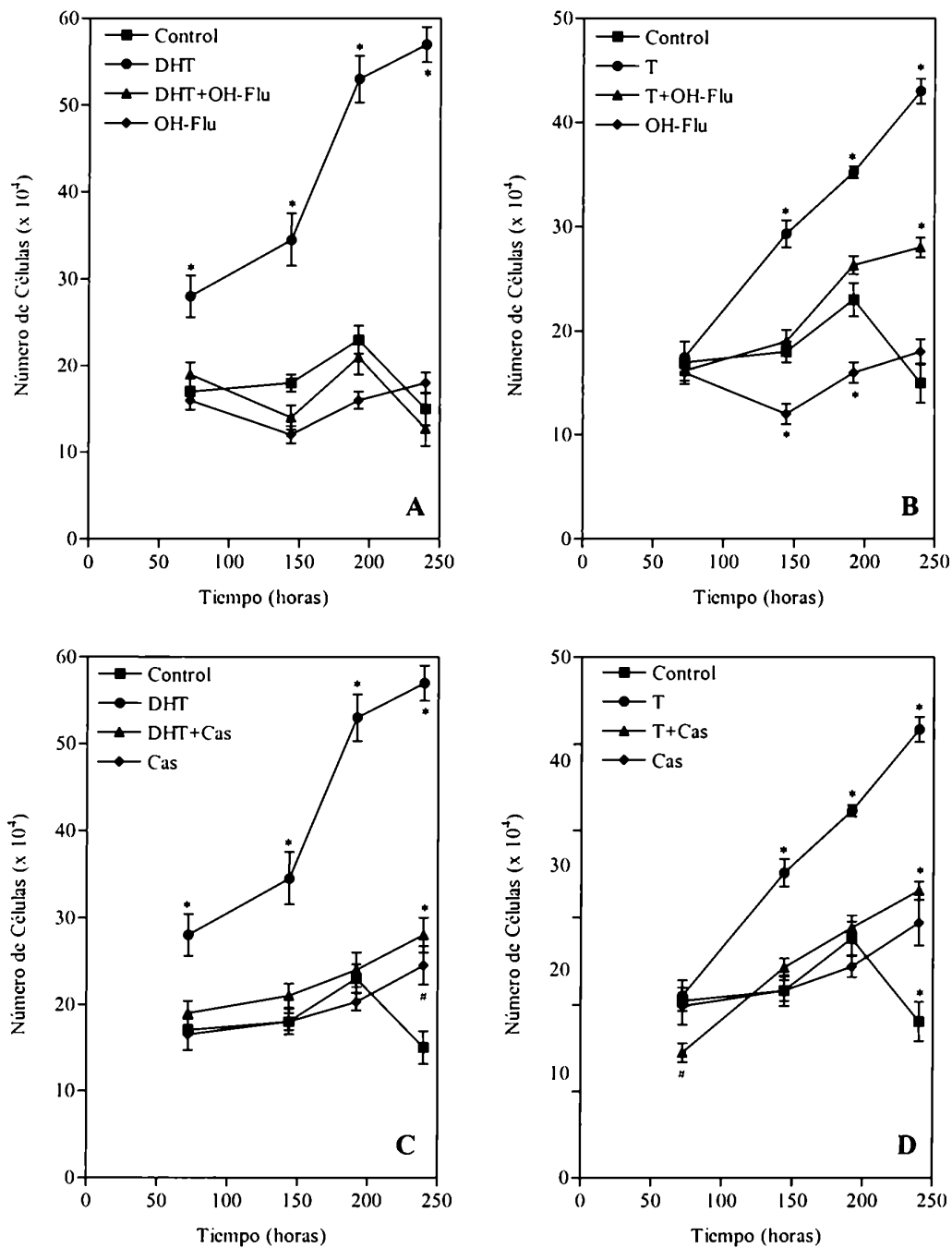


Figura 10. Efecto de andrógenos y antiandrógenos sobre el crecimiento celular de IIB-MEL-IAN. Se ensayó el efecto de DHT 10 nM, T 20 nM, OH-Flu 4 μ M y Cas 20 nM sobre la proliferación de IIB-MEL-IAN en presencia de 1% de FBS adsorbido con carbón, según se indica en Mat. Met. Cada punto es la media de triplicados; barras: S.E.M.; * $p < 0,001$ y # $p < 0,01$; las diferencias significativas de los valores control fueron evaluadas por ANOVA seguido por el test de Tukey. Cada gráfico es representativo de dos experimentos.

La figura 11 ilustra, a modo comparativo, la acción de los andrógenos y de los antiandrógenos en las tres líneas celulares.

En IIB-MEL-J, a los diez días de crecimiento en cultivo en presencia de DHT o T se obtiene una tasa de proliferación celular de: 345.200 ± 10.000 células con DHT y 368.800 ± 14.500 células con T. A igual tiempo de incubación con los antiandrógenos se obtienen: 88.300 ± 6.500 células con OH-Flu y 89.200 ± 10.000 con Cas (A).

En el caso de IIB-MEL-LES, a los 9 días de crecimiento en cultivo, se obtienen 289.000 ± 9.720 células en presencia de DHT, 240.000 ± 15.500 con T, 8.900 ± 640 con OH-Flu y 11.560 ± 890 con Cas. El crecimiento en presencia de DHT fue mayor en toda la curva que el obtenido con T. OH-Flu resultó muy efectivo en la inhibición del mismo y Cas produjo una leve estimulación respecto de los valores del control (B).

Para IIB-MEL-IAN, el número de células a los 10 días de incubación en presencia de DHT es de 570.000 ± 20.021 , 430.000 ± 12.000 con T, 18.000 ± 1.200 con OH-Flu y de 24.500 ± 2.200 con Cas. Al igual que en el caso anterior, el crecimiento en presencia de DHT fue mayor a casi todos los tiempos que el obtenido con T y los andrógenos resultaron igualmente efectivos para la inhibición de la proliferación celular (C).

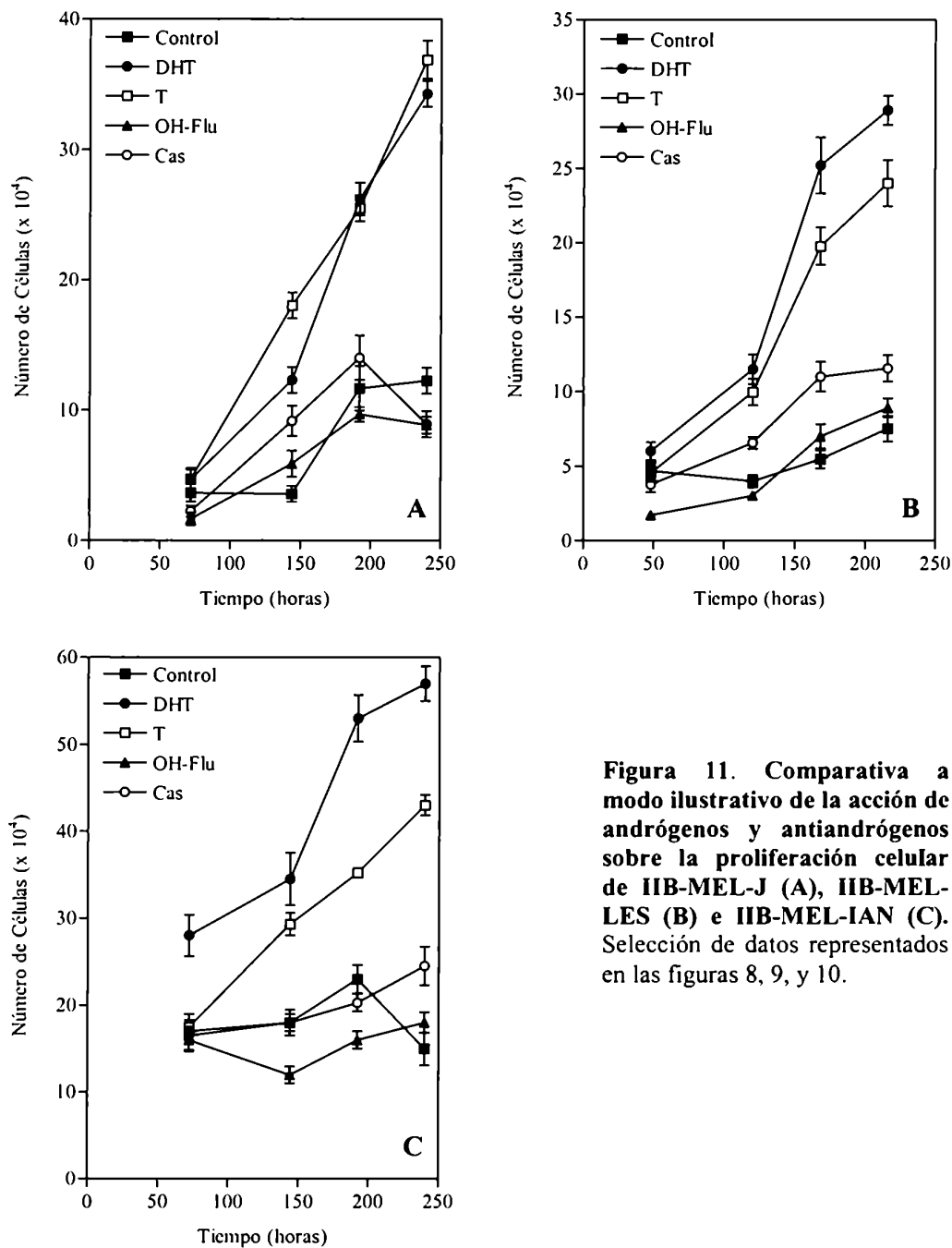


Figura 11. Comparativa a modo ilustrativo de la acción de andrógenos y antiandrógenos sobre la proliferación celular de IIB-MEL-J (A), IIB-MEL-LES (B) e IIB-MEL-IAN (C). Selección de datos representados en las figuras 8, 9, y 10.

En IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN se evidencia una acción estimuladora del crecimiento celular por parte de los andrógenos y una acción inhibitoria del mismo por parte de los antiandrógenos utilizados. A partir de los resultados obtenidos, en los estudios que siguen, se utilizarán DHT e OH-Flu como hormona y antihormona.

**7.- ACCIONES CRUZADAS DE ESTEROIDES Y ANTIESTEROIDES
CON EL RECEPTOR ANDROGENICO DE IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES E
IIB-MEL-IAN**

Estos estudios se realizaron con el propósito de investigar la acción biológica del RA en ensayos de cultivo de tejidos para ver si estos resultados corroboran los obtenidos previamente mediante los experimentos de competencia y desplazamiento de ligando radiactivo (*Resultados 1.- y 2.-*).

Para esto, se incubaron separadamente cada una de las líneas celulares de melanoma humano en medio de cultivo con 1% de FBS libre de esteroides en presencia y ausencia de E₂, Pg, DHT, OH-Flu, Tam y Des, tal cual se indicó en Mat. y Mét. Los resultados se muestran en las figuras 12, 13 y 14.

Anteriormente, se demostró que en incubaciones de IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN con DHT se induce una proliferación celular estadísticamente significativa respecto de células crecidas en ausencia de DHT (*Resultados 6.-*).

En la figura 12 A se muestra que cuando células IIB-MEL-J son co-incubadas con DHT y con el antiestrógeno Tam se produce una reversión significativa del crecimiento respecto de la curva obtenida con DHT ($p < 0,001$). Por otro lado, IIB-MEL-J en presencia de Tam no evidencia crecimiento. Estos resultados se asemejan a lo obtenido con OH-Flu y con DHT e OH-Flu simultáneamente.

La figura 12 B representa los resultados de ensayos realizados en presencia de OH-Flu y Tam simultáneamente. En este caso se observa que la proliferación celular fue significativamente menor que en el control ($p < 0,01$), mientras que con OH-Flu solo o Tam solo, los valores obtenidos no difieren significativamente del control (figura 12 A).

La acción de los esteroides se muestra en la figura 12 C. Incubaciones con E₂ y Pg produjeron una estimulación significativa del crecimiento celular ($p < 0,001$), mientras que co-incubaciones de dichos esteroides con OH-Flu lo revirtieron.

Estos datos, conjuntamente con las determinaciones inmunocitoquímicas que indicaron ausencia de RE y RPg en este tipo celular (*Resultados 3.-*), sugieren que E₂ y Pg ejercen su acción vía el RA.

En la figura 12 D se representan comparativamente los datos obtenidos en IIB-MEL-J con los distintos compuestos indicados.

Puede verse que el nivel de estimulación celular obtenido con E₂ o con Pg es semejante al obtenido con DHT, mientras que Tam induce una inhibición del crecimiento similar a OH-Flu.

Se realizaron ensayos similares utilizando células IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. Los resultados representados en las figuras 13 y 14 revelan un patrón de acción semejante a lo descrito para IIB-MEL-J.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos en IIB-MEL-LES. Puede observarse que Tam revirtió la estimulación celular inducida por DHT (A).

No existieron diferencias significativas en el crecimiento celular cuando las células fueron incubadas con OH-Flu, Tam o OH-Flu y Tam simultáneamente (B).

E₂ y Pg fueron capaces de estimular significativamente el crecimiento de IIB-MEL-LES mientras OH-Flu y Tam inhibieron significativamente ($p < 0,001$) dichas estimulaciones (C, D).

En la figura 13 E se resume, a modo comparativo, la cinética de IIB-MEL-LES en todos los casos analizados. Por un lado se evidencia que el nivel de estimulación celular obtenido con E₂ o con Pg es semejante al obtenido con DHT, mientras que Tam e OH-Flu producen valores cercanos al control.

El análisis de IIB-MEL-IAN arrojó resultados similares. La figura 14 indica que incubaciones con Tam o con DHT y Tam conjuntamente producen un crecimiento celular inferior a los valores del control (A), mientras incubaciones conjuntas de OH-Flu y Tam dan valores cercanos a las incubaciones con Tam solamente (B).

E₂ y Pg fueron capaces de estimular significativamente el crecimiento de IIB-MEL-IAN mientras OH-Flu, Tam y Des inhibieron dichas estimulaciones (C, D). La figura 14 E ilustra comparativamente la cinética de IIB-MEL-IAN en presencia de los distintos esteroides y antiesteroides.

La estimulación celular obtenida con DHT es mayor a las inducidas por E₂ o Pg, y la inhibición celular en presencia de OH-Flu, Tam o Des, fue en todos los casos, menor que el control.

El agregado de Des condujo a la muerte celular a las 144 horas de incubación. Los resultados obtenidos señalan una acción antiestrogénica muy importante en esta línea celular.

Todos los resultados son consistentes con la hipótesis de la existencia de receptores de andrógenos con características de unión atípicas en las líneas de melanoma humano analizadas.

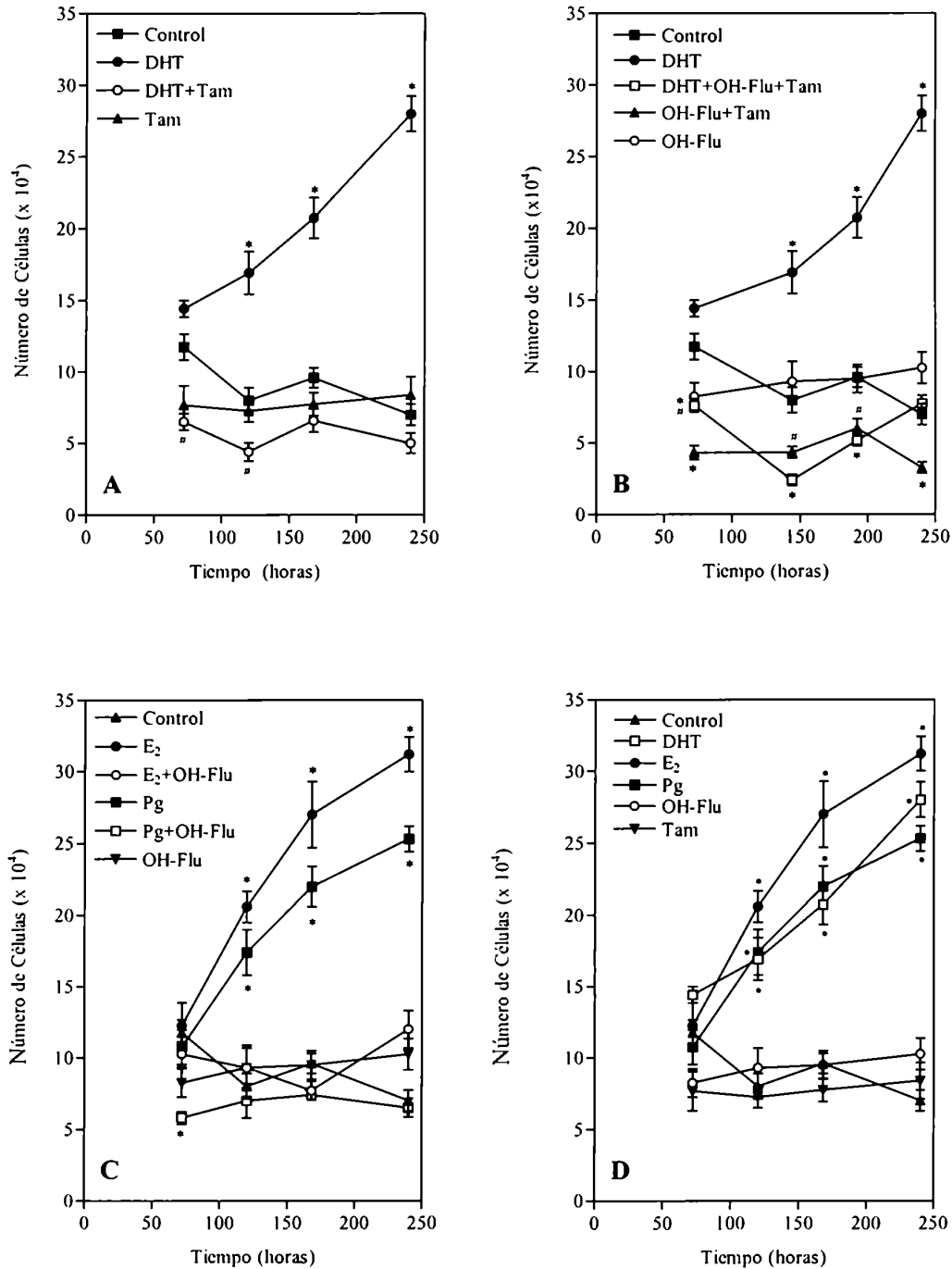


Figura 12: Efecto de hormonas y anti-hormonas sobre el crecimiento celular de IIB-MEL-J. Se ensayó el efecto de DHT 10 nM, E₂ 1 nM, Pg 1 nM, OH-Flu 4 μM y Tam 1 μM sobre la proliferación de IIB-MEL-J en presencia de 1% de FBS, según se indica en Mat. y Met. Cada punto corresponde a la media de puntos realizados por triplicados; barras: S.E.M.; * p < 0,001 y # p < 0,01; las diferencias significativas respecto de los valores controles fueron evaluadas por ANOVA seguido por el test de Tukey. Cada gráfico es representativo de tres experimentos.

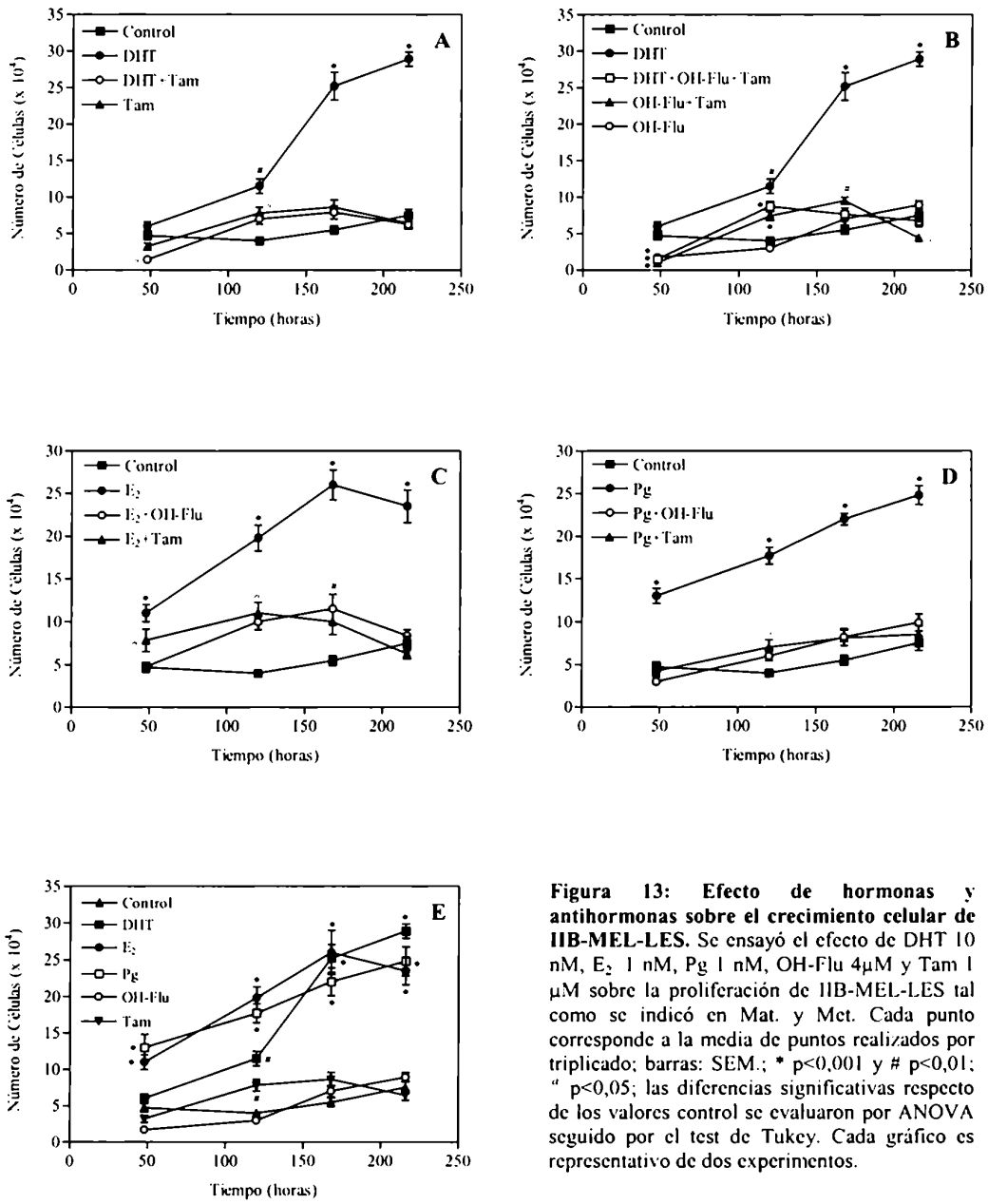


Figura 13: Efecto de hormonas y anti-hormonas sobre el crecimiento celular de IIB-MEL-LES. Se ensayó el efecto de DHT 10 nM, E₂ 1 nM, Pg 1 nM, OH-Flu 4µM y Tam 1 µM sobre la proliferación de IIB-MEL-LES tal como se indicó en Mat. y Met. Cada punto corresponde a la media de puntos realizados por triplicado; barras: SEM.; * p<0,001 y # p<0,01; " p<0,05; las diferencias significativas respecto de los valores control se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey. Cada gráfico es representativo de dos experimentos.

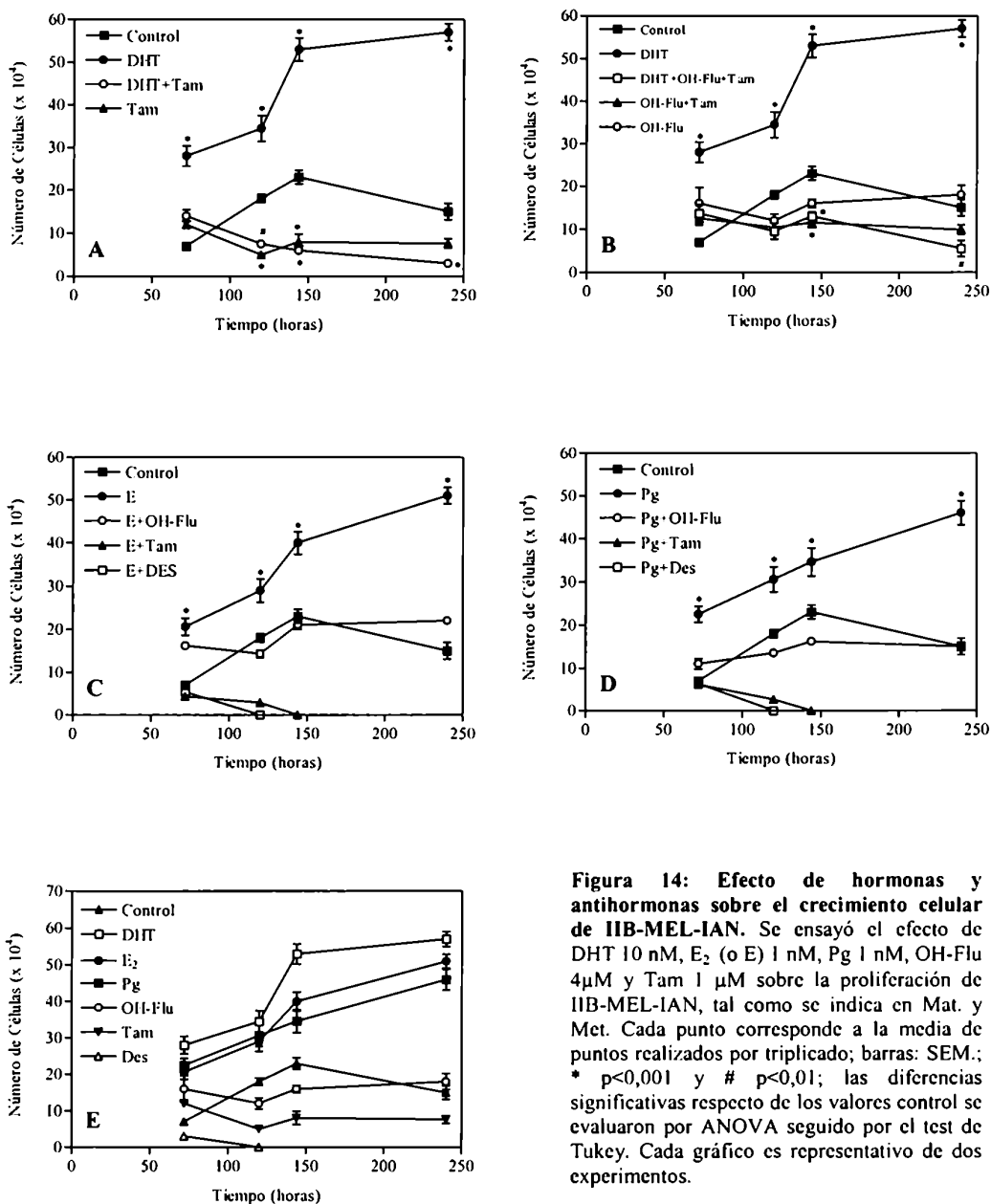


Figura 14: Efecto de hormonas y anti-hormonas sobre el crecimiento celular de IIB-MEL-IAN. Se ensayó el efecto de DHT 10 nM, E₂ (o E) 1 nM, Pg 1 nM, OH-Flu 4 μM y Tam 1 μM sobre la proliferación de IIB-MEL-IAN, tal como se indica en Mat. y Met. Cada punto corresponde a la media de puntos realizados por triplicado; barras: SEM.; * p<0,001 y # p<0,01; las diferencias significativas respecto de los valores control se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey. Cada gráfico es representativo de dos experimentos.

8.- EFECTO DE LA FLUTAMIDA SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DEL MELANOMA HUMANO *IN VIVO*

Con el propósito de investigar la acción del antiandrógeno Flu *in vivo*, utilizamos ratones atímicos portadores de melanoma humano. Estos animales, también denominados “desnudos” o “nude”, sufren de una falla congénita para desarrollar una glándula de timo normal; por esta razón, los ratones son completamente deficientes en las funciones inmunológicas timo-dependientes, y por lo tanto, incapaces de rechazar heteroinjertos [Shin S. 1979]. Este hallazgo condujo a la utilización de los ratones desnudos como modelo experimental de crecimiento de tumores humanos *in vivo*.

Para determinar si el efecto inhibitorio del crecimiento celular obtenido *in vitro* por la presencia de OH-Flu se repite *in vivo*, se inocularon ratones atímicos machos con 4×10^6 células IIB-MEL-J por animal, tal como se indica en Mat. y Mét. Cuando los tumores se hicieron visibles y palpables, los animales fueron divididos en dos grupos: Control y Flu.

El grupo Flu recibió diariamente, en forma subcutánea, 1 mg de Flu repartida en dos dosis de 500 μg cada una, y el grupo Control recibió vehículo.

La figura 15 A representa el tamaño tumoral (medido con calibre una vez por semana) de los dos grupos. Puede observarse que la curva de superficie tumoral del grupo Flu es más baja que la curva Control, con diferencias significativas a los 27 días de tratamiento. La probabilidad de sobrevida se evaluó, en ambos grupos, por el método de Kaplan-Meier [Kaplan E.L., 1958] (figura 15 B). Los datos analizados por el test de Mann-Whitney mostraron un incremento significativo en el tiempo de sobrevida del grupo Flu respecto del Control ($p= 0,0249$).

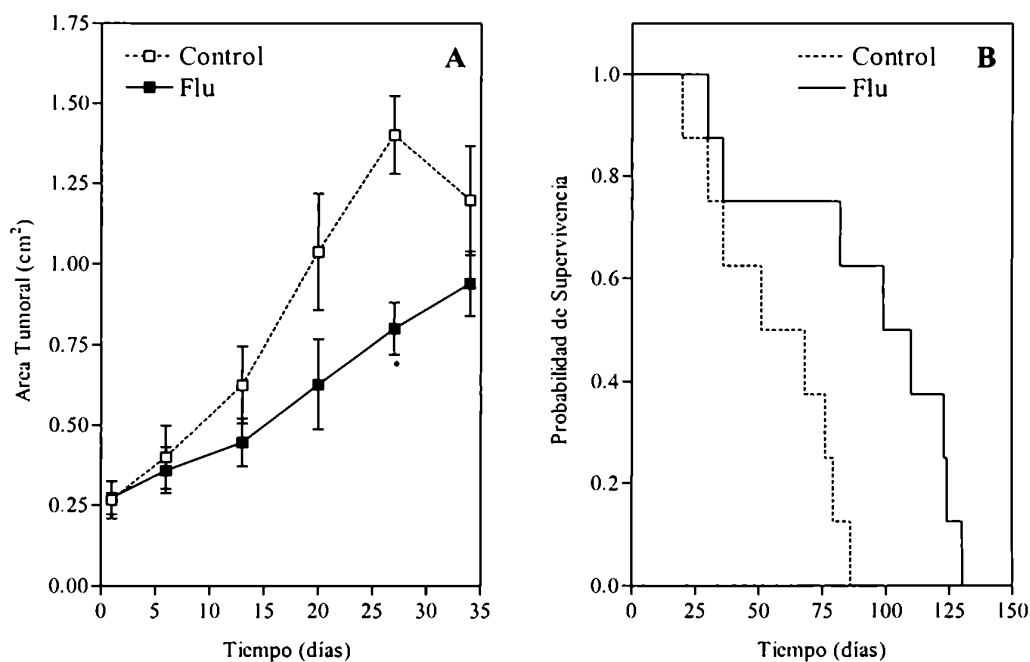


Figura 15: Acción de Flu sobre tumores IIB-MEL-J desarrollados en ratones atímicos mediante inoculación de pellet celular. Ratones machos atímicos inoculados en uno de los flancos con 4×10^6 células IIB-MEL-J se dividieron en dos grupos: Control y Flu, según se indica en Mat. y Mét. La administración de Flu se realizó por inyecciones diarias subcutáneas de 1 mg por animal, repartida en dos dosis de 500 μ g cada una. Los puntos representan las medias de las superficies tumorales de 7 animales por grupo. Barras: SEM; * $p < 0,05$, las diferencias significativas respecto de los valores controles fueron evaluadas por el test de Student (A). La probabilidad de sobrevida de los animales de ambos grupos se calculó por el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en el tiempo de supervivencia evaluadas por el test de Mann-Whitney fueron significativas ($p = 0,0249$) (B).

Con el objeto de obtener un rápido desarrollo tumoral y de extender el tiempo de evaluación de sobrevida de los animales, se desarrollaron tumores utilizando 1 mm³ de sección de tejido neoplásico IIB-MEL-J o IIB-MEL-LES. Esto permitió obtener tumores palpables y visibles a los 10 días del trasplante, aproximadamente, en ambos casos. En ese momento, los animales portadores de tumores IIB-MEL-J e IIB-MEL-LES se dividieron al igual que en el caso anterior en Flu y Control. El antiandrógeno Flu se administró en una sola dosis subcutánea de 1 mg/día/animal.

En la figura 16 A, se muestra que el crecimiento tumoral de IIB-MEL-J en el grupo Flu fue significativamente menor ($p < 0,05$) que en el grupo Control, y en la figura 16 B, que la sobrevida de los animales sometidos a la terapia antiandrogénica resultó significativamente mayor respecto de los controles ($p = 0,0034$).

En el caso de los ratones portadores de tumores IIB-MEL-LES, sometidos a terapia antiandrogénica, se obtuvo el mismo tipo de respuesta. El crecimiento tumoral de IIB-MEL-LES en el grupo Flu fue significativamente menor ($p < 0,05$) que en el grupo control (figura 16 C), y la probabilidad de sobrevida de los animales tratados con Flu resultó significativamente mayor respecto de los controles ($p = 0,005$) (figura 16 D).

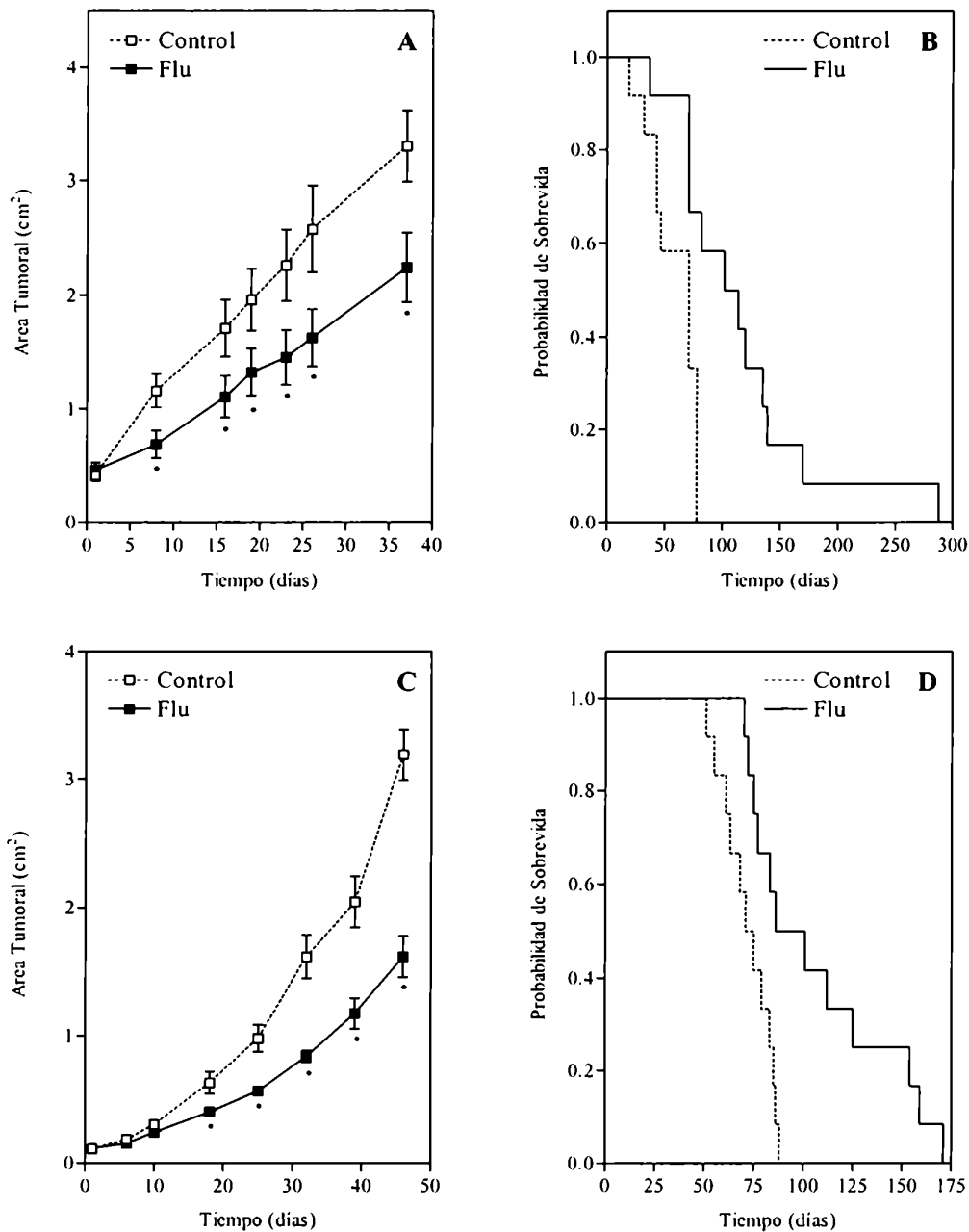


Figura 16: Acción de Flu sobre tumores IIB-MEL-J e IIB-MEL-LES desarrollados en ratones atímicos mediante transplante. Ratones machos atímicos transplantados con tumor IIB-MEL-J (A) o IIB-MEL-LES (C) se dividieron en grupos: Control y Flu, tal como se indica en Mat. y Mét. La Flu se administró en una sola dosis subcutánea de 1 mg/día/animal. Los puntos representan las medias de las superficies tumorales de 12 animales/grupo para cada caso. Barras: SEM; * $p < 0,05$, las diferencias significativas respecto de los valores controles fueron evaluadas por el test de Student (A y C). La probabilidad de supervivencia de los animales se calculó por el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en el tiempo de supervivencia evaluadas por el test de Mann-Whitney fueron altamente significativas $p = 0,0034$ (B) y $p = 0,005$ (D).

Se realizaron experimentos de acción similares a los descritos previamente, pero utilizando ratones atímicos hembras con la idea de evaluar la acción cruzada *in vivo* de Flu con los esteroides circulantes.

Los datos graficados en la figura 17 muestran que el crecimiento tumoral en el grupo Flu fue significativamente menor que en el grupo control (A), y que la probabilidad de sobrevida del grupo sometido a terapia antiandrogénica resultó significativamente mayor ($p=0,0415$) (B).

Estos resultados se corresponden con los obtenidos *in vitro*. En las hembras el crecimiento tumoral estimulado por estrógeno y progesterona circulantes vía el RA fue parcialmente revertido por el antiandrógeno.

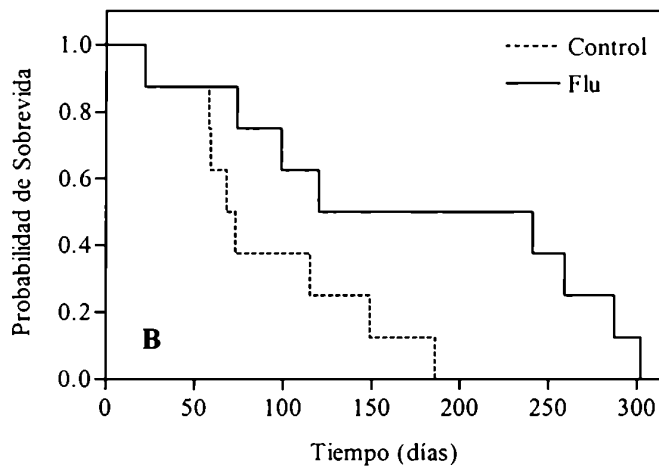
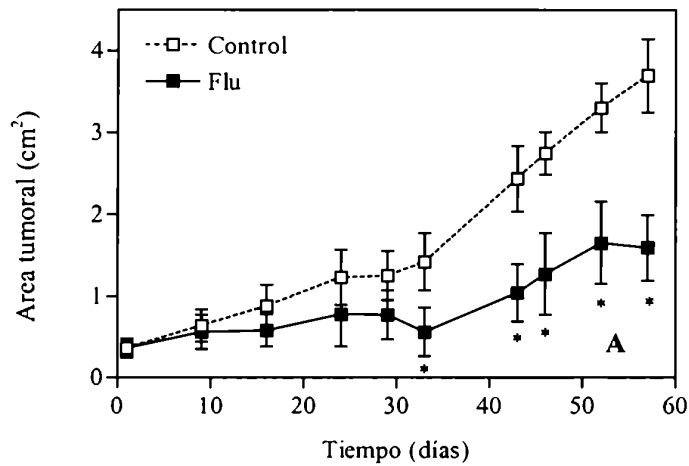


Figura 17: Acción de Flu sobre tumores IIB-MEL-J desarrollados en ratones atímicos. Ratones hembras atímicos transplantados con 1 mm³ de sección de tumor IIB-MEL-J se dividieron en dos grupos: Control (placebo) y Flu (1 mg/día/animal), según se indica en Mat. y Mét. Los puntos representan las medias de las superficies tumorales de 8 animales/grupo. Barras: SEM; * p < 0,05, las diferencias significativas respecto de los valores controles fueron evaluadas por el test de Student (A). La probabilidad de supervivencia se calculó por el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en el tiempo de supervivencia evaluadas por el test de Mann-Whitney fueron significativas (p = 0,0415). Los gráficos son representativos de dos experimentos.

9.- EFECTO DEL TAM Y ACCION COMBINADA DE FLU Y TAM SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DEL MELANOMA HUMANO *IN VIVO*

Ratones atímicos machos portadores de tumores IIB-MEL-J, se dividieron en cuatro grupos: Control, Flu, Tam y Flu y Tam simultáneamente (Flu+Tam).

Los resultados graficados en la figura 18 A, indican que el crecimiento tumoral del grupo Flu fue significativamente menor que el del grupo Control mientras que no se registraron diferencias significativas entre Control y Tam o entre Control y Flu+Tam. La probabilidad de sobrevida para los animales tratados con antiandrógeno resultó significativamente mayor respecto de los controles, mientras los tratados con antiestrógeno o con la combinación Flu+Tam no presentaron diferencias (18 B).

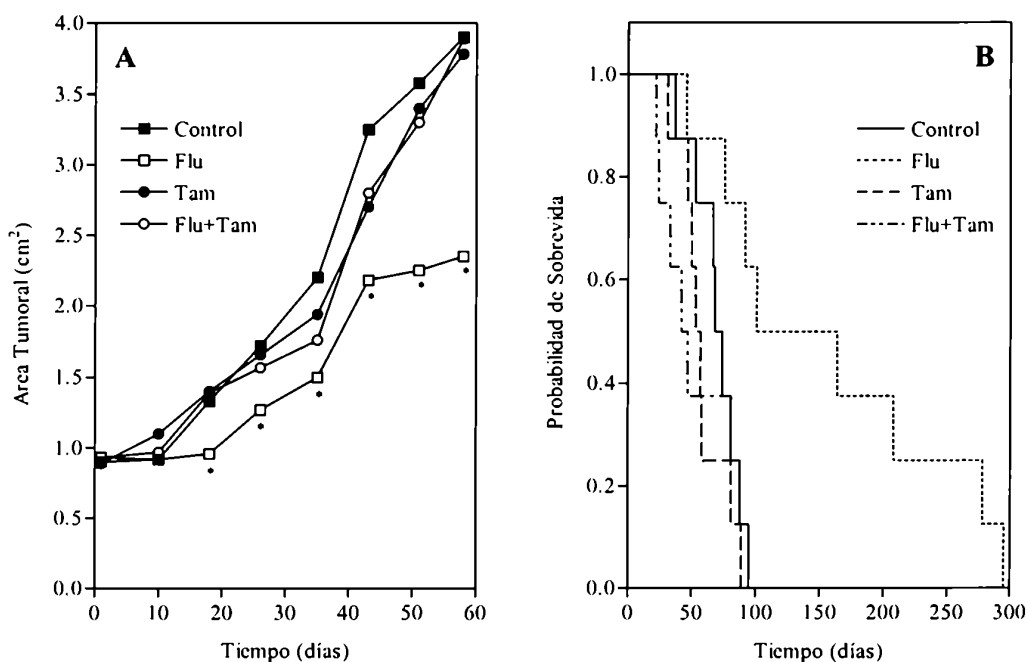


Figura 18: Acción de Flu, Tam y efectos combinados sobre tumores IIB-MEL-J desarrollados en ratones atímicos. Ratones machos atímicos transplantados con 1 mm³ de sección de tumor IIB-MEL-J se dividieron en cuatro grupos: Control (placebo), Flu (1 mg/día/animal), Tam (25 µg/día/animal) y Flu+Tam (1 mg y 25 µg/día/animal), según se indica en Mat. y Mét. Los puntos representan las medias de las superficies tumorales de 8 animales/grupo. Barras: SEM; * p < 0,05, las diferencias significativas respecto de los valores controles fueron evaluadas por el test de Student (A). La probabilidad de sobrevida de los animales se calculó por el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en el tiempo de supervivencia evaluadas por el test de Mann-Whitney fueron significativas para: Flu versus control p = 0,0141; Flu vs. Tam: p = 0,0148 y Flu vs. Flu+Tam p = 0,0104.

Por otra parte, se investigó la acción *in vivo* del Tam en ratones atímicos hembras. Los datos graficados en la figura 19 no muestran diferencias significativas entre los grupos en el crecimiento tumoral (A) ni en la sobrevida (B).

Estos datos difieren de los obtenidos *in vitro*, donde el antiestrógeno es capaz de inhibir la estimulación inducida por E₂ y Pg.

El hecho de que la terapia *in vivo* con Tam o con Tam+Flu no reveló una inhibición del crecimiento tumoral en ninguno de los casos estudiados, puede relacionarse con un efecto dependiente de especie del tamoxifeno. Se ha descrito que el Tam estimula el crecimiento tumoral en ratones atímicos, mientras que lo inhibe en ratas y en humanos [Gottardis M., 1988, Brunner N., 1989].

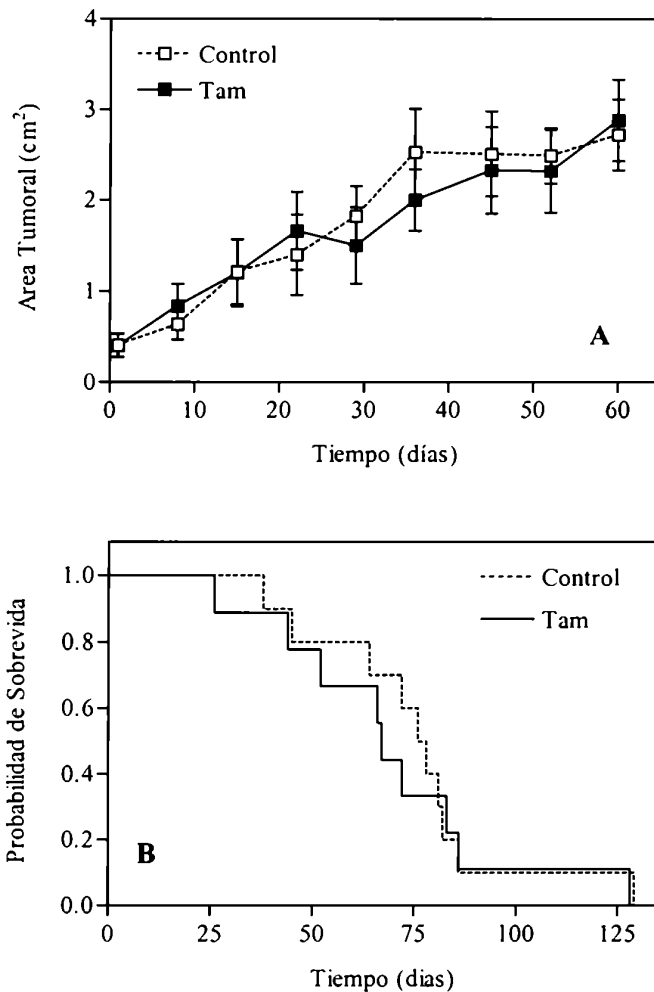


Figura 19: Acción de Tam sobre tumores IIB-MEL-J desarrollados en ratones atímicos. Ratones atímicos hembras transplantados con 1 mm³ de sección de tumor IIB-MEL-J se dividieron en dos grupos: Control (placebo) y Tam (25 µg/día/animal), tal como se indica en Mat. y Mét. Los puntos representan las medias de las superficies tumorales de 10 animales/grupo. Barras: SEM (A). La probabilidad de sobrevida se evaluó por el método de Kaplan-Meier (B). Cada gráfico es representativo de dos experimentos.

Los experimentos de acción permiten concluir que Flu tiene una acción inhibitoria del crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo* pero la acción inhibitoria ejercida por el Tam o por la asociación Flu+Tam en células creciendo en cultivo no ocurre *in vivo*. Por otra parte el aumento en la supervivencia de los animales tratados con Flu podría indicar que el antiandrógeno tiene algún tipo de efecto protector en ratones atímicos portadores de tumores IIB-MEL-J.

10.- ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS DE ACCIONES CITOTOXICAS DE DROGAS EN RATONES ATIMICOS.

Ratones atímicos de ambos sexos sometidos durante 3 u 8 meses a los distintos protocolos terapéuticos (*Resultados, secciones 9 y 10*) fueron sacrificados a distintos tiempos, con el fin de realizar autopsias para analizar la histología de los distintos órganos.

Los análisis histológicos de los órganos de animales inyectados diariamente con 1 mg de Flu, no revelaron diferencias respecto de animales controles. En ninguno de los órganos analizados (cerebro, pulmones, corazón, hígado, riñones, estómago, intestino, bazo y órganos de reproducción) se encontraron efectos tóxicos por la administración del antiandrógeno. En el caso de animales tratados con Tam 25 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{animal}$, se observó, a los 20 días de administración, una ligera disminución de la espermatogénesis y necrosis unicelular de hepatocitos. Por otra parte, el estudio de la administración de mayores dosis de Tam (100 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{animal}$) produjo una dramática disminución de la espermatogénesis, un aumento del desprendimiento del epitelio seminal, una disminución del intersticio compacto y un número muy bajo de células de Leydig. Se pudo determinar también: congestión vascular generalizada de venas centrolobulillares hepáticas, hemorragia de la cavidad pleural, congestión intracardiaca, fibrina intracardiaca y congestión renal esplénica. Con respecto al aspecto macroscópico, se observaron pulmones congestivos y dilataciones venosas hemorroidales; el análisis citológico mostró edema perivascular e infiltrado eosinófilo perihemorroidal.

Los animales que recibieron Flu 1 mg/día conjuntamente con Tam 25 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{animal}$ no presentaron particularidades, mientras los que recibieron Flu, a la concentración previamente indicada, pero en presencia de Tam 100 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{animal}$ mostraron un patrón similar al descrito en el caso de la administración de Tam 100 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{animal}$.

11.- EVALUACION DE LA ANGIOGENESIS DE TUMORES DE RATONES TRATADOS CON FLU, TAM O COMBINACION

Con el objeto de estudiar si existen diferencias en la angiogénesis de los tumores de animales sometidos a los distintos protocolos terapéuticos, se sacrificaron ratones atímicos de ambos sexos portadores de tumores IIB-MEL-J, según se indicó en Mat. y Mét.

El análisis inmunohistoquímico utilizando el ACM MEC1.13, marcador de células endoteliales murinas, no reveló diferencias significativas en la vascularización de los tumores provenientes de los animales sometidos a 7 días de tratamiento. En este protocolo se administró Flu, Tam, Flu y Tam conjuntamente y vehículo (ver Mat. y Mét.).

Cuando el mismo ACM se utilizó para evaluar la angiogénesis en tumores de animales sometidos durante 20 días consecutivos al mismo tratamiento se observó que los tumores de animales que recibieron vehículo, tamoxifeno o la combinación Flu/ Tam, presentaron gran cantidad de vasos de pequeño calibre, mientras que los tumores provenientes de los animales del grupo que sólo recibió Flu presentaron vasos de mayor calibre y en número más bajo.

La inhibición del crecimiento tumoral en presencia del antiandrógeno, tal vez podría relacionarse con que los vasos grandes de estos tumores no permiten una buena perfusión, provocando una mayor necrosis y, en consecuencia, un menor crecimiento celular.

DISCUSSION

DISCUSION

La necesidad de comprender la biología del melanoma maligno humano, y de descubrir terapias alternativas efectivas para el tratamiento del mismo, se relaciona con el aumento de la incidencia del melanoma cutáneo en todos los países que registran estadísticas y con que la mortalidad asociada a este tipo tumoral también ha incrementado durante los últimos años en la mayor parte del mundo [MacKie R.M., 1998]. En Estados Unidos, por ejemplo, la tasa de incidencia ha aumentado de 4% a 6% durante cada año desde 1973 [Chang A.E., 1998].

Una característica relevante del melanoma es la supervivencia ventajosa de mujeres portadoras de la enfermedad respecto de pacientes hombres [Pakkanen M., 1977; Griffel M., 1981; Weidner F., 1981; Shaw H.M., 1982; Reintgen D.S., 1984; O'Doerty C.J., 1986; Balzi D., 1998; Levi F., 1998]. Actualmente, se considera que el sexo del paciente es un indicador del pronóstico en melanoma maligno primario [Ostmeier H., 1991].

En realidad, la capacidad de los estrógenos y de los andrógenos para estimular el crecimiento de un número de cánceres está bien establecida, y de hecho algunas terapias endocrinas son ampliamente utilizadas para reducir la capacidad de las hormonas o bloquear su acción.

Inicialmente, el primer intento por explicar la diferencia encontrada en el pronóstico y en la supervivencia entre pacientes hombres y mujeres se centró fundamentalmente en los receptores de estrógeno y de progesterona [Creagan E.T., 1980; Walker M.J., 1991].

A través del tiempo, distintos estudios han demostrado la falta de correlación entre estos receptores y la sobrevida ventajosa de pacientes de sexo femenino [Shaw H.M., 1978; Driscoll M.S., 1993; Stidham K.R., 1994].

La alternativa de que otros factores endocrinos puedan ser reguladores del desarrollo y curso clínico del melanoma, abre la posibilidad de un nuevo enfoque terapéutico para esta enfermedad. Así, el mal pronóstico en pacientes hombres podría relacionarse, al menos en forma teórica, con una dependencia del tumor respecto de los andrógenos [Rampen F., 1980].

En esta tesis se determina la presencia de RA en melanoma humano y se caracteriza el RA, a nivel bioquímico e inmunohistoquímico, en las líneas celulares derivadas de melanomas humanos: IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN.

Los análisis de Scatchard de las tres líneas estudiadas, utilizando la unión del andrógeno sintético marcado R1881, revelaron la presencia de un solo tipo de receptor con una constante de disociación aparente (K_d) de 11 nM a 37 °C y una capacidad de binding de 326 fmol/mg de proteína, 58,4 fmol/ 10^6 células o de 35.000 sitios por célula para IIB-MEL-J, una K_d de 15 nM a 37 °C y una capacidad de binding de 280,6 fmol/mg de proteína, 30,8 fmol/ 10^6 células o de 18.500 sitios por célula en el caso de IIB-MEL-LES y K_d de 14 nM a 37 °C, capacidad de binding de 206,4 fmol/mg de proteína, 25,59 fmol/ 10^6 células o de 15.400 sitios por célula en el caso de IIB-MEL-IAN.

Los estudios sobre la especificidad de la unión del ligando radiactivo a estos receptores, revelaron un comportamiento atípico de los mismos en las tres líneas analizadas. No sólo los andrógenos (T, DHT, R1881) y el antiandrógeno (OH-Flu) compitieron con [3 H]-R1881, sino que E_2 , Pg y F también fueron capaces de desplazar la unión del esteroide sintético al RA.

Esta inespecificidad en la competencia de las hormonas y antihormonas por la unión del compuesto sintético al RA, revela un comportamiento atípico para los receptores descritos en estas líneas celulares.

Por otra parte, los ensayos bioquímicos de unión de estradiol tritiado [3 H]- E_2 y del progestágeno tritiado [3 H]-R5020 en presencia y ausencia del andrógeno DHT inerte en células IIB-MEL-J, corroboran que la unión de los compuestos tritiados es al RA y no a RE o RPg.

La unión específica de los compuestos radiactivos es completamente anulada por la presencia de DHT inerte, sugiriendo una acción cruzada por parte de E₂ y Pg con el RA.

A nivel inmunocitoquímico, no existieron evidencias de la presencia de RE o RPg en las tres líneas de melanoma, mientras la inmuno-reactividad para RA fue positiva en las tres líneas estudiadas. La tinción nuclear fue vigorosa, y la intensidad marcada, por encima del 70% de las células analizadas.

Los resultados obtenidos de los estudios de competencia y desplazamiento de ligandos radiactivos, y de las determinaciones inmunocitoquímicas ensayados en IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN, tienden a confirmar la expresión del RA y la acción cruzada de hormonas y antihormonas con dicho receptor.

La presencia del RA fue analizada, además, en biopsias correspondientes a metástasis de melanomas provenientes de distintos pacientes. En todos los casos la reactividad obtenida con el AMC AN1-15 fue positiva y la intensidad marcada. Otros autores, a través de técnicas de inmunohistoquímica, habían demostrado previamente la ausencia de receptores estrogénicos en *nevi* benignos, displásicos y en melanomas primarios y metastásicos, sugiriendo que la influencia de los estrógenos en la patofisiología del melanoma o del *nevi* melanocítico benigno no puede ser considerada significativa [Lccavalier M.A., 1990; Miller J.G., 1997].

Por otra parte, los ensayos bioquímicos y de unión realizados sobre receptores hormonales de melanomas, *nevi* pigmentados benignos y en líneas celulares de melanoma han indicado un 16% de unión para estrógeno y un 40% de actividad de RA mientras en biopsias de piel normal se encontró un 4% de actividad para RE y 41% para RA [Kokoschka E.M., 1982].

Una vez determinada la presencia de RA en melanoma humano (líneas celulares y biopsias tumorales), se realizó la caracterización biológica de estos receptores. Dada la capacidad de los estrógenos y de los andrógenos para estimular el crecimiento de algunos cánceres, y la utilización frecuente de antagonistas hormonales no esteroideos tales como tamoxifeno y flutamida, se encaró el estudio de la cinética de crecimiento de las distintas líneas celulares en presencia de distintas hormonas y antihormonas.

Los resultados obtenidos sobre células creciendo en cultivo, demuestran que los andrógenos DHT y T inducen el crecimiento celular de las tres líneas de melanoma humano, mientras que los antiandrógenos OH-Flu (metabolito activo de la flutamida) y Cas conducen a una inhibición significativa de la proliferación celular *in vitro*.

Por otra parte, cuando las líneas celulares son co-incubadas con DHT y con el antiestrógeno Tam se produce una reversión significativa del crecimiento respecto de la curva obtenida con DHT, mientras el Tam solo no produce crecimiento celular. Estos resultados se asemejan a lo obtenido con OH-Flu y con DHT e OH-Flu simultáneamente.

Incubaciones con E₂ y Pg produjeron una estimulación significativa del crecimiento celular, mientras que co-incubaciones de dichos esteroides con OH-Flu o con Tam lo revirtieron.

Estos datos, conjuntamente con las determinaciones inmunocitoquímicas que indicaron ausencia de RE y RPg en este tipo celular, sugieren que E₂ y Pg ejercen su acción vía el RA.

Tanto E₂ como Pg estimulan el crecimiento celular al igual que DHT, mientras que Tam induce una inhibición de la proliferación celular similar a OH-Flu.

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de RA con características de unión atípicas en las líneas de melanoma humano analizadas.

La acción cruzada de hormonas y antihormonas ha sido anteriormente descrita en otros tipos tumorales. Muchas líneas celulares de carcinomas mamarios humanos, sensibles a estrógenos, proliferan en presencia de DHT y se inhiben al ser incubadas con antiandrógenos tales como acetato de ciproterona (CPA) o hidroxiflutamida [Hackenberg R., 1988; Marugo M., 1992]. Por otra parte, una variedad de andrógenos son capaces de inhibir la proliferación de líneas de cáncer de mama humanas estimuladas con estrógenos vía el RA [Poulin R., 1988]. La regulación de la expresión de los receptores hormonales está claramente determinada en algunos tipos celulares. Se ha reportado que el tratamiento con estradiol causa la reducción de los RA, mientras que la privación del esteroide conduce a un incremento de los mismos.

Esto supone un mecanismo por el cual el estradiol actúa antagonizando directamente la acción de los andrógenos [Stover EP., 1987].

Dentro de las terapias endocrinas, la utilización de antiandrógenos para controlar la proliferación de células tumorales ha sido previamente propuesta y ensayada en distintos tipos tumorales. En el carcinoma prostático, la Flu y el Cas son los antiandrógenos no esteroideos más ampliamente utilizados [Delaere KPJ., 1991]. En otros tipos tumorales, como ser carcinomas hepatocelulares, se ha demostrado que DHT induce la proliferación celular vía el RA, mientras el CPA produce la inhibición del mismo [Yu L., 1995].

Para analizar el efecto inhibitorio del antiandrógeno *in vivo*, se utilizó directamente Flu en lugar de su metabolito activo OH-Flu.

In vivo la administración de flutamida produce una reducción del transporte, de la retención nuclear y de la formación del complejo andrógeno- proteína. Aunque los efectos de la Flu *in vitro* son similares a los producidos *in vivo*, en general se utiliza OH-Flu, debido a que sus efectos son más agudos [Peets E.A., 1974].

El efecto del antiandrógeno Flu *in vivo*, utilizando ratones atómicos portadores de melanoma humano, repite la acción inhibitoria del crecimiento celular obtenido *in vitro* por la presencia de OH-Flu.

El crecimiento tumoral de IIB-MEL-J o de IIB-MEL-LES en los grupos de ratones machos tratados con Flu, fue significativamente menor que en los grupos control y la sobrevida de los primeros resultó significativamente mayor que en estos últimos.

De igual modo a lo descrito en el caso anterior, en las hembras el crecimiento tumoral en los grupos sometidos a la terapia antiandrogénica con Flu fue significativamente menor que en los grupos control y la probabilidad de sobrevida, en estos grupos, resultó también significativamente mayor que en los controles.

Estos resultados sugieren que en las hembras el crecimiento tumoral, estimulado por estrógeno y progesterona circulantes vía el RA, fue parcialmente revertido por el antiandrógeno, de igual modo a lo reportado *in vitro*.

Por otra parte, cuando ratones atímicos de ambos sexos, portadores de tumores IIB-MEL-J, fueron sometidos a una terapia combinada de Flu y Tam, no se registraron diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre Control y Tam o entre Control y Flu+Tam. La probabilidad de sobrevida de los animales que recibieron la terapia antiestrogénica con Tam o la combinación Flu+Tam no mostraron diferencias con los controles.

Estos resultados difieren de los obtenidos *in vitro* donde el antiestrógeno fue capaz de inhibir la estimulación inducida por E₂ y Pg.

El hecho de que la terapia *in vivo* con Tam o con Tam+Flu no revele una inhibición del crecimiento tumoral en ninguno de los casos estudiados puede relacionarse con un efecto dependiente de especie del tamoxifeno. El Tam es un antiestrógeno con una actividad de agonista parcial, pero la actividad estrogénica parece ser especie y tejido específica [Jiang S.Y., 1992]. Así, los estudios realizados en ratones atímicos portadores de tumores MCF-7 que han sido tratados con Tam, han revelado un aumento del crecimiento tumoral, posiblemente debido a actividades estrogénicas del Tam, mientras que en ratas y en humanos se produce una inhibición del mismo [Gottardis M., 1988].

Los resultados obtenidos revelan una acción inhibitoria del crecimiento celular *in vitro* e *in vivo* para Flu, mientras que para Tam o para Flu+Tam la inhibición sólo se manifestó *in vitro*.

Por otra parte, el aumento en la supervivencia de los animales tratados con Flu podría indicar que el antiandrógeno tiene algún tipo de efecto protector en ratones atímicos portadores de tumores IIB-MEL-J o IIB-MEL-LES.

Los resultados obtenidos a partir de la descripción y caracterización de los RA presentes en IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN sugieren la existencia de una mutación en el dominio de unión a la hormona de este receptor.

La estructura del receptor de hormonas esteroideas en el dominio de unión al ligando tiene un efecto sustancial sobre la interacción entre el receptor y el ligando, y por lo tanto en la expresión génica activada por ligando.

Una mutación sin sentido o una pequeña delección en el dominio de unión al ligando pueden alterar la estructura del receptor y conducir a eliminar, decrecer o ampliar la afinidad de dicho receptor por la hormona o antihormona [Tora L., 1989; Graham I.I.M., 1990; Veldscholte J., 1990; García T., 1992].

En células LNCaP de cáncer de próstata se ha descrito la presencia de un receptor androgénico con una especificidad anormal. Esta interacción atípica se debe a una mutación puntual en el dominio de unión a la hormona, codón 868, produciendo una sustitución de treonina por alanina. Como consecuencia de esto, se obtiene una afinidad incrementada del receptor por progestágenos y estrógenos [Veldscholte J., 1990; Ris-Stalpers C., 1993].

A través del análisis de otras sustituciones, queda claro que la posición 868 del RA humano limita la especificidad del receptor a los andrógenos. Cuando las sustituciones involucran aminoácidos tales como ácido aspártico, lisina o tirosina, se elimina completamente la unión de los andrógenos al receptor mutado. Por otra parte, sustituciones con serina o alanina amplían la especificidad esteroide mientras que con cisteína la disminuye [Veldscholte J., 1990; Ris-Stalpers C., 1993].

Otras mutaciones similares, involucrando otros codones, han sido descritas para el RA de distintas líneas celulares derivadas de cáncer de próstata, así como de tejidos de cáncer de próstata. En estos casos, también se produjo una pérdida de especificidad del receptor, resultando por lo tanto estimulado por diversas hormonas y antihormonas [Veldscholte J., 1992; Middleman M.N., 1996].

En algunos tipos celulares de cáncer de próstata, algunos antiandrógenos pueden actuar como andrógenos estimulando la proliferación de las células cancerosas, dado que estos compuestos se pueden unir al RA mutado y llevar a cabo la transactivación de los genes target.

Los cánceres de próstata usualmente son dependientes de andrógenos y luego pueden perder esa dependencia y sensibilidad.

Este cambio en la sensibilidad a los andrógenos es acompañado por un cambio en la expresión del RA y en su actividad transcripcional, así como también en la expresión de algunos oncogenes [Liao S., 1994].

Antiandrógenos como CPA, OH-Flu y nilutamida, producen una estimulación del crecimiento de LNCaP vía el RA, mientras otros antiandrógenos presentan efectos agonistas. Este mecanismo de acción se relaciona con que, en esta línea celular, los antiandrógenos OH-Flu y R1881 producen una disociación del complejo RA- proteína *heat shock* con la consecuente transformación a una forma de alta afinidad al DNA en tanto que ICI 176334, otro antiandrógeno, no induce la liberación de las proteínas del *heat shock* y no aumenta la unión nuclear pero sí inhibe el proceso de transformación inducido por R1881 [Veldscholte J., 1992].

En realidad, la frecuencia de mutación del RA en tumores primarios de próstata es relativamente baja, mientras que una alta frecuencia de mutaciones ha sido reportada para metástasis óseas de pacientes que no responden a terapia endocrina. Esto podría reflejar una inestabilidad genética en los últimos estadios tumorales [Culig Z., 1997].

El descubrimiento de RA mutados ha permitido investigar el comportamiento de los cánceres independientes de andrógenos, facilitando así el desarrollo de terapias más eficientes.

En otros receptores hormonales como el RE, se han descrito mutaciones puntuales en el dominio de unión al esteroide. En este caso, una alteración en la interacción del complejo RE-antiestrógeno con la maquinaria de transcripción condujo al aumento de la actividad estrogénica del antiestrógeno 4-OH-Tam [Jiang S.Y., 1992].

La posibilidad de que existan 3 mutaciones independientes en las as+das de melanoma utilizadas no parece lo más probable. En cánceres de próstata avanzados, el mismo codón mutado del RA descrito en células LNCaP se encontró en 6 de 24 especímenes [Gaddipati J.P, 1994]. Otras hipótesis sugieren que la aparición de un comportamiento similar podría vincularse a la influencia de factores de crecimiento y de segundos mensajeros sobre el RA.

De hecho, ha sido descrito que factores de crecimiento tales como EGF o IGF-1 pueden aumentar la probabilidad de transactivación dependiente de ligando del RA y aún activarlo de una manera independiente de ligando [Cato A.C.B., 1998]. Con respecto a los segundos mensajeros, ha sido reportado [Aarnisalo P., 1998] que la proteína de unión CREB es capaz de aumentar la transcripción del RA y que este coactivador podría servir como un integrador entre las vías de señalización mediadas y no mediadas por andrógenos. Se especula que la falta de especificidad del RA descrita en las líneas celulares de melanoma humano podría relacionarse con acciones no genómicas de las hormonas, como ser el incremento del calcio intracelular o con que moduladores de la protein quinasa A podrían estar activando al RA solo o potenciando, como se ha descrito recientemente, las funciones de transactivación del RA dependientes de ligando [Cato A.C.B., 1998].

A partir de los estudios histopatológicos realizados sobre las autopsias de los ratones atímicos que recibieron Flu y/o Tam, se ha determinado que no existen efectos tóxicos sobre los distintos órganos analizados para el antiandrógeno, mientras que los animales tratados con el antiestrógeno presentan muchos de los efectos secundarios característicos de la acción del Tam. Estos estudios se correlacionan con lo previamente descrito por otros autores para estos mismos compuestos.

Justamente, la elección de Flu como antiandrógeno de preferencia para el tratamiento de carcinoma prostático se vincula con los pocos efectos secundarios que presenta la droga.

El hecho de que, normalmente, este antiandrógeno no produzca impotencia en pacientes sexualmente activos y tenga pocos efectos colaterales [Delaere K.P.J., 1991], se debe a que el déficit de andrógenos que ocurre en la próstata bloquea la retroalimentación negativa ejercida por los andrógenos sobre hipotálamo e hipófisis, produciendo en consecuencia un incremento en la liberación de gonadotrofinas y en la producción de testosterona.

Por otra parte, como se ha mencionado previamente, el Tam es un agente tumoristático utilizado como terapia adyuvante para el cáncer de mama en mujeres desde hace 15 años. Más allá de esto, muchos trabajos reportan que ratas tratadas con tamoxifeno han desarrollado cánceres hepáticos por formación de aductos de DNA [Carthew P., 1995].

La descripción de receptores androgénicos en las líneas de melanoma humano IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN, con capacidad de mediar estimulación del crecimiento por DHT e inhibición por antiandrógenos puros, así como el significativo aumento de la supervivencia observado en ratones atímicos portadores de tumores tratados con flutamida, abren interesantes posibilidades para la terapéutica. Este dato se vuelve aún más relevante cuando el 100% de los melanomas metastásicos humanos analizados resultan positivos para el receptor androgénico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Este trabajo de Tesis se ha centrado en investigar la presencia de RA en el melanoma maligno humano, en su caracterización y, particularmente, en el desarrollo de protocolos terapéuticos distintos a los utilizados actualmente con el objeto de abrir el espectro de posibilidades en el tratamiento de este tipo tumoral.

De los resultados presentados y discutidos en los capítulos precedentes pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Las tres líneas de melanoma metastásico humano, IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN, expresan RA.
- Todos los cortes histológicos de melanomas analizados, pertenecientes a biopsias de distintos pacientes, presentaron inmuno-reactividad positiva e intensidad marcada para RA.
- La unión del andrógeno sintético [^3H]-R1881 al RA fue desplazada por los andrógenos DHT, T y R1881; por el antiandrógeno OH-Flu y por E_2 , Pg y F.
- Las tres líneas celulares mostraron inmunotinción negativa para RE y RPg.
- La unión del estrógeno marcado [^3H]- E_2 y del progestágeno [^3H]-R5020, en células de melanoma IIB-MEL-J, fue inhibida en presencia de DHT inerte.
- Los andrógenos DHT y T inducen el crecimiento de IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN, mientras los antiandrógenos OH-Flu y Cas lo inhiben.
- El E_2 y la Pg inducen también la proliferación celular de las líneas de melanoma mencionadas precedentemente. Esta estimulación del crecimiento, al igual que en el caso anterior, es inhibida por OH-Flu.

- El crecimiento celular *in vitro*, en las tres líneas de melanoma analizadas, inducido por andrógenos, E₂ y Pg es suprimido por el antiestrógeno Tam.
- Los estudios de acción *in vivo*, utilizando ratones atímicos portadores de tumores, revelaron una acción de inhibición del crecimiento por parte del antiandrógeno Flu y un aumento significativo de la sobrevida de los animales que recibieron la droga. La administración de Tam o la terapia combinada de Flu y Tam no resultaron efectivas para disminuir el desarrollo tumoral ni para modificar la sobrevida de los animales.

Los resultados aquí presentados sugieren la presencia de RA en melanoma humano. Para el caso particular de las líneas celulares de melanoma humano analizadas, la caracterización del RA indicó una naturaleza atípica en cuanto a la especificidad del mismo.

*Por otra parte, el estudio de la acción de la flutamida *in vitro* e *in vivo* reveló un claro efecto protector por parte del antiandrógeno dada la capacidad del mismo para inhibir el crecimiento tumoral.*

La posibilidad de implementar algún tipo de terapia hormonal resulta particularmente interesante, puesto que hasta el momento no se han desarrollado terapias que resulten demasiado efectivas en el tratamiento del melanoma maligno humano.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1.- LINEAS CELULARES Y CULTIVO DEL STOCK

1.1.- Líneas de melanomas humanos

Para la realización de los distintos ensayos se utilizaron tres líneas de melanoma humano desarrolladas en nuestro laboratorio: IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. IIB-MEL-J se estableció a partir de una lesión de melanoma metastásico de pulmón proveniente de un paciente Caucásico de sexo masculino de 64 años de edad [Guerra L., 1989]. IIB-MEL-LES se desarrolló a partir de metástasis ganglionares axilares de un paciente Caucásico de sexo masculino de 42 años de edad e IIB-MEL-IAN a partir de un ganglio metastásico amelanótico de otro paciente Caucásico de 41 años de sexo masculino.

Los estudios histopatológicos de estas dos últimas líneas revelaron que las metástasis utilizadas provenían de melanomas de tipo epitelioides amelanóticos malignos [Kairiyama C., 1995].

Las células IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN se mantuvieron en cultivo continuo en medio melanoma (medio melanoma control y factores estimulantes suplementarios). Este medio se compone de: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, 1/1; Gibco) en presencia de 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) [**medio melanoma control**] suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS: fetal bovine serum, Gibco), 20 nM selenito de sodio (Sigma), 100 µM ácido ascórbico (Sigma), 0,3 mg/ml galactosa (Sigma), 0,15 mg/ml piruvato de sodio (Sigma), 5 µg/ml insulina (Sigma), 5 µg/ml transferrina (Sigma) y 5 ng/ml factor de crecimiento epidérmico (EGF, Collaborative Res.) [Guerra L., 1989].

Las células se plaquearon en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning) en medio melanoma, suplementado con 10% de FBS y con factores estimulantes según se indicó más arriba, y se incubaron en estufa a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% dióxido de carbono.

El cambio de medio de cultivo se realizaba dos veces en la semana. Para todos los experimentos, las células se subcultivaron a confluencia por gentil dispersión con 0,25% de tripsina (Sigma) y 0,065% de EDTA (Sigma).

1.2.- Líneas de carcinomas mamarios humanos

Se utilizaron dos líneas de carcinomas mamarios humanos: MCF-7 [Soule H.D., 1973] e IIB-BR-G, desarrollada en nuestro laboratorio [Bover L., 1991].

Las células MCF-7 se mantuvieron en cultivo continuo en medio DMEM/F12, 1/1, suplementado con 10% de FBS, 2 mM glutamina, 10 µg/ml insulina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina.

La línea celular IIB-BR-G fue crecida en el mismo medio de cultivo, suplementado con 20 nM selenito de sodio, 100 µM ácido ascórbico, 5 ng/ml EGF, 5 µg/ml prolactina, 1,4 µM hidrocortisona y 0,1 nM 17 β-estradiol. Todos los factores de estimulación utilizados fueron provistos por Sigma.

Para los distintos experimentos las células se cosecharon con 0,25% de tripsina y 0,065% de EDTA.

2.- CAPTACION DE [³H]-R1881 EN CELULAS ENTERAS Y ESTUDIOS DE COMPETENCIA

Para determinar la presencia de RA en melanoma humano se utilizaron células enteras IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN en presencia del ligando marcado 17 α-metil [³H] Metiltrienolona [³H-R1881] (86,5 Ci/mmol) (Du Pont NEN Research Products, Boston, MA) [Bonne C., 1975; Luthy I.A. 1988].

Brevemente, las células crecieron en medio melanoma, suplementado según se indicó en 1.1 de esta sección, hasta casi confluencia en placas de cultivo de 60 mm² de diámetro, en el caso de IIB-MEL-J, y de 35 mm², en el de IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. A continuación el medio fue removido, se efectuaron tres lavados con buffer fosfato salino Dulbecco (PBS) y se agregó medio melanoma control fresco libre de suero.

Luego de 24 horas, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por 2 hs a 37°C en atmósfera gaseada con medio fresco en presencia de incrementadas concentraciones de [³H]-R1881 (2,5 a 25 nM). Para determinar la captación inespecífica, se realizaron incubaciones control en presencia de R1881 frío (Du Pont NEN Research Products) en un exceso de 100 veces. El número de células varió desde 0,3 a 2,5 x 10⁶ según los distintos ensayos. A las 2 horas de incubación se removió el medio radiactivo, se efectuaron tres lavados con PBS, se tripsinizaron las células, y se cuantificó la radiactividad incorporada mediante tolueno-omnifluor en un contador de centelleo líquido.

Se utilizó el análisis de Scatchard [Scatchard G., 1949] para determinar la constante de disociación aparente de los receptores androgénicos (Kd) y el número de sitios promedio por célula.

Para los estudios de competencia, las células se incubaron separadamente con 10 nM de [³H]-R1881 durante 2 horas en presencia de los siguientes competidores: T, DHT, R1881 en un exceso de 100 veces; T, DHT y R1881, E₂, Pg y F a 500 x e OH-Flu a 1000 x (Sigma).

3.- CAPTACION DE [³H]-E₂ Y [³H]-R5020 EN CELULAS IIB-MEL-J

Células IIB-MEL-J creciendo en cultivo, tal como se indicó anteriormente, se incubaron en medio melanoma control con 10 nM de [2,4,6,7 ³H]-Estradiol ([³H-E₂]) (99 Ci/mmol) competido con 3 μM DES en presencia y ausencia de 3 μM DHT o con 10 nM 17-metil-[³H]-Promegestona [³H-R5020] (87 Ci/mmol). En este último caso, la competencia se realizó con 3 μM R5020 en presencia y ausencia de 3 μM DHT, y para evitar la eventual unión del progestágeno al receptor de glucocorticoides se agregaron 3 μM F.

Se midió la radiactividad incorporada al igual que en el punto anterior.

Todos los productos fueron provistos por Du Pont NEN Research Products, Boston, MA.

4.- DETERMINACION DE RECEPTORES HORMONALES

4.1.- Inmunocitoquímica

Para la determinación de receptores hormonales se utilizaron entre 5 y 10×10^6 células IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN e IIB-BR-G.

Las células, en crecimiento exponencial, se tripsinizaron y se centrifugaron 10 minutos a 1.300 rpm en tubos Corning de 15 ml. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS y:

a) Se embebieron en medio de inclusión (OCT) a -20°C para la posterior realización de cortes citológicos en crióstato. Las secciones de 3 a $5 \mu\text{M}$ obtenidas se montaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina, para una mayor adhesión celular.

b) Se sembraron en cubreobjetos de 1,2 cm de diámetro (Fischer Scientific) en medio melanoma en presencia de 10% de FBS y factores de crecimiento según se indicó en 1.1 de esta sección. Cuando las células alcanzaron el estado de semiconfluencia, se lavaron 2 veces con PBS.

Las muestras, así preparadas (ver a y b), fueron fijadas para la posterior determinación de receptores hormonales.

Las muestras utilizadas para determinar RE y RPg se fijaron con 3,7% de formaldehído en PBS (15 minutos a 4°C), luego de lavarse con PBS (6 minutos) se transfirieron a metanol (4 minutos a -20°C), acetona (2 minutos a -20°C) y PBS (5 minutos). Finalmente se guardaron a -20°C en solución para conservación de tejidos (42,8 g sacarosa- 0,7 g Mg_2Cl / 250 ml PBS: 250 ml glicerol).

En el caso de las determinaciones de RA, los cortes se fijaron con 2% de paraformaldehído, 10% de sacarosa y 0,1 M de fosfato de sodio a pH 7,2 (4 min. a Ta). Posteriormente se lavaron con PBS (2 veces durante 5 min. a Ta) y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena por tratamiento con 3% de peróxido de hidrógeno (2 a 3 min. a Ta). Por último se efectuaron 2 lavados con PBS (5 min. cada uno a Ta).

Este tipo de fijación se empleó cuando el anticuerpo anti-RA utilizado fue el policlonal AR-52 (provisto amablemente por la Dra. E. Wilson) [Tan J., 1988; Quarmby V.E., 1990; Saadi M.V., 1991].

Para el anticuerpo monoclonal (AMC) AN1-15 [Chang C., 1989; Brodin J., 1992] la fijación se realizó con formaldehído 2% (10 minutos a Ta), seguida de un lavado con PBS (10 minutos a Ta).

En todos los casos, luego de las fijaciones, las muestras se guardaron a -20°C en solución de conservación de tejidos o en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

La expresión de RE y RPg se evaluó por inmunocitoquímica (ICQ) con los anticuerpos anti-RE y anti-RPg y se reveló con el sistema peroxidasa-anti-peroxidasa (Abbott ER-ICA Monoclonal kit y Abbott PgR-ICA Monoclonal kit) [Ballaré C., 1991].

Básicamente, después de 2 lavados con PBS (10 minutos cada uno), los cortes histológicos fueron incubados con suero normal de cabra (10% en buffer fosfato). Se realizaron las incubaciones con anti-RE o anti-RPg, luego las muestras se incubaron con antisuero anti-IgG de rata hecho en cabra (1 µg/ml en buffer fosfato) durante 30 minutos y, por último, con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa hecho en rata (0,1 µg/ml en buffer Tris) por 30 minutos. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda a Ta seguidas por dos lavados con PBS (10 minutos cada lavado).

La reacción fue detectada usando como sustrato cromogénico diaminobencidina (DAB 20 mg/ 100 ml PBS y 2% H₂O₂ 30 vol.) por 9 minutos. Finalmente, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Harris (1/100), se deshidrataron en series ascendentes de alcoholes y se clarearon con xileno. El montaje se realizó utilizando Permount (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ). Se observaron al microscopio y se determinó el porcentaje de células que expresaron RE y RPg.

Fueron consideradas positivas aquellas células con núcleos teñidos de marrón, independientemente de la intensidad de color, mientras fueran claramente distinguibles del control negativo. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

La expresión de RA se evaluó, en principio, utilizando el anticuerpo policlonal anti-AR52.

Las células, fijadas según se indicó, se incubaron secuencialmente con: 1,5% de suero normal de cabra en PBS (30 min.), anticuerpo primario AR52 (5 µg/ml en PBS) y 1,5% de suero de cabra (18 hs. a 4 °C), PBS (3 lavados de 5 min. cada uno a Ta), anticuerpo biotinilado (IgG de conejo anti-cabra de Vector Laboratories, Burlingame, CA) en una dilución de 1: 200 con PBS (60 min.).

Posteriormente a los lavados con PBS (3 veces de 5 min. cada uno), se agregó el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector labs) (30 min.) y se transfirió nuevamente a PBS (3 lavados cada 5 min.).

El anticuerpo unido se visualizó luego de la incubación con DAB (0,5 mg/ml de PBS) y 0,03% de peróxido de hidrógeno durante 5 min. en oscuridad.

Luego de un lavado con agua destilada (3 min.), las secciones fueron teñidas con hematoxilina de Harris durante 15 seg., embebidas en alcohol ácido (95% etanol más 0,5% ácido acético durante 10 seg.) y lavadas con PBS.

Para la evaluación de los estándares histológicos, secciones seriadas no tratadas fueron teñidas con hematoxilina eosina y lavadas. Las secciones, lavadas durante 5 min. con agua corriente, fueron deshidratadas en una serie creciente de alcoholes y clareadas con xileno. El montaje se realizó utilizando Permount Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ.

Los núcleos RA positivos (marrones) y los RA negativos (azules) fueron cuantificados con 400X de aumento en un microscopio Zeiss (Baltimore Instrument Co., Baltimore, MD) utilizando una grilla ocular como guía. Para asegurar la reproducibilidad del test, se procedió a cuantificar cada muestra en dos ocasiones distintas.

Debido a la alta reactividad citoplasmática del policlonal AR-52 en las determinaciones de RA, se utilizó el AMC anti-RA AN1-15 [Chang C., 1989] de Affinity BioReagents.

Las muestras se incubaron secuencialmente con el suero bloqueante (Kit Vectastain) agitando gentilmente a Ta en cámara húmeda durante 15 min., PBS (3 lavados de 5 min.), anticuerpo primario anti-RA AN1-15 (5 µg/ml en Tris/BSA) durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

Luego de lavar con PBS (3 veces de 5 min. cada uno) se adicionó el reactivo biotinilado de Vectastain (según instrucciones) con el segundo anticuerpo durante 30 min. agitando suavemente a Ta en cámara húmeda.

Seguidamente a lavar con PBS (3 lavados de 5 min. cada uno) se incubó con el reactivo ABC de Vectastain por 60 min. a Ta agitando suavemente en cámara húmeda, PBS (3 lavados de 5 min. cada uno) y se incubó con gotas del sustrato DAB fresco a Ta en cámara húmeda (2 min. en oscuridad).

Por último, se lavaron las muestras con agua corriente durante 5 min., se deshidrataron en series ascendentes de etanol, se limpiaron con xileno y se montaron en Permunt según se indicó para AR-52.

La cuantificación de las células positivas también se indicó más arriba.

En todas las ICQ realizadas, la intensidad de la coloración fue evaluada como: intensidad leve; intensidad moderada e intensidad marcada.

4.2.- Inmunohistoquímica

Para evaluar la expresión de RA en tejidos tumorales y normales se utilizaron biopsias de metástasis de melanomas provenientes de distintos pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas como así diferentes tejidos humanos normales tales como timo, tiroides, glándula mamaria, pulmón, piel, próstata, epidídimo y testículo.

Los tumores fueron obtenidos y procesados en condiciones de esterilidad. Se limpiaron inmediatamente de grasa, de tejido necrótico y de tejido normal adyacente. El tejido tumoral se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 mm³. Los trozos se congelaron en nitrógeno líquido para posterior análisis de la expresión de RA. Con los tejidos normales se procedió de la misma manera.

Posteriormente, las muestras tumorales y normales conservadas en nitrógeno líquido desde el momento de la intervención quirúrgica, fueron embebidas en OCT para la realización de cortes histológicos en crióstato, cortadas, fijadas y conservadas según se describió más arriba en esta misma sección para las determinaciones de ICQ con anti-RA AN1-15.

Se evaluó la intensidad de la coloración como intensidad leve; intensidad moderada e intensidad marcada.

5.- EXPERIMENTOS DE CRECIMIENTO CELULAR

Con el fin de ensayar el efecto antiandrogénico, células IIB-MEL-J, IIB-BR-G y MCF-7 fueron tripsinizadas y plaqueadas en placas multi-well de 24 a una densidad de 10.000 células por pocillo en medio de cultivo, según se indica en los ítems 1.1. y 1.2. de esta sección, suplementado con 10% de FBS.

Luego de 16 hs., se agregó el antiandrógeno (flutamida o hidroxiflutamida) disuelto en etanol absoluto (0,1% de concentración final de etanol) a diferentes concentraciones. El cambio de medio con droga fresca se realizó día por medio.

Las células se tripsinizaron a distintos tiempos y se contaron con un hemocitómetro. Cada punto representa el promedio de triplicados.

En el caso de los experimentos de estimulación con DHT, células IIB-MEL-J e IIB-MEL-LES se tripsinizaron y se plaquearon a una densidad de 10.000 células por pocillo en medio melanoma. Luego de 16 hs, se realizaron tres lavados con PBS y se cambió el medio de cultivo por medio melanoma con 1% de FBS adsorbido con carbón en presencia de DHT a una concentración final de 10^{-10} , 10^{-8} y 10^{-6} M. El cambio de medio con droga fresca se realizó día por medio. Las células se tripsinizaron a distintos tiempos y se contaron con un hemocitómetro. Cada punto representa el promedio de triplicados.

Para evaluar la acción de hormonas y antihormonas, células IIB-MEL-J, IIB-MEL-IAN e IIB-MEL-LES se tripsinizaron y se plaquearon a una densidad de 10.000 células por pocillo en medio melanoma. Luego de tres lavados con PBS, se cambió el medio de cultivo por medio melanoma con 1% de FBS adsorbido con carbón en presencia de distintas hormonas y antihormonas disueltas en etanol absoluto. Como andrógenos se utilizaron DHT y Testosterona (T); flutamida (Flu), hidroxiflutamida (OH-Flu) y casodex (Cas), como antiandrógenos, y estradiol (E_2), progesterona (Pg) y tamoxifeno (Tam), como otras hormonas y antihormonas.

En todos los casos, el cambio de medio con droga fresca se realizó día por medio. Las células se tripsinizaron a distintos tiempos y se contaron con un hemocitómetro. Cada punto representa el promedio de triplicados.

6.- ESTUDIO DE LA ACCION DE DROGAS ANTINEOPLASICAS Y DE LA ANGIOGENESIS *IN VIVO*

6.1.- Tumores desarrollados a partir de IIB-MEL-J expandidas en cultivo de tejidos

Ratones atímicos machos variedad *nu/nu* NIH [Shin S., 1979] de ocho semanas fueron inoculados con células IIB-MEL-J. Cuando las células en cultivo alcanzaron un estado de confluencia se tripsinizaron y se lavaron dos veces con PBS. A continuación, se inyectaron subcutáneamente 4×10^6 células en 0,1 ml de PBS en cualquiera de los flancos del ratón. Una vez que los tumores comenzaron a visualizarse, los animales fueron divididos en dos grupos.

En estos ensayos se administraron diariamente 1 mg de Flu subcutáneamente en una sola dosis por animal (grupo tratado) mientras que el otro grupo fue inoculado con vehículo (1% de gelatina, 0,9% ClNa en H₂O bi-destilada).

Se midió el tamaño tumoral de todos los animales con calibre, y en todos los grupos se registró la muerte de cada animal con el objeto de evaluar la probabilidad de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier [Kaplan E.L., 1958].

6.2.- Tumores desarrollados por trasplantes

Ratones atímicos machos y hembras variedad *nu/nu* NIH [Shin S., 1979] de ocho semanas fueron transplantados, utilizando trocar, con tejido tumoral IIB-MEL-J o IIB-MEL-LES de 1 mm³ de sección en un flanco.

Cuando el tumor se hizo visible, los animales se dividieron en grupos. Cada animal recibió diariamente, según los distintos tratamientos: 1 mg Flu; 25 µg Tam; 1 mg Flu conjuntamente con 25 µg Tam o vehículo.

Se midió el tamaño tumoral de todos los animales con calibre, y en todos los grupos se registró la muerte de cada animal con el objeto de evaluar la probabilidad de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier [Kaplan E.L., 1958]. Algunos fragmentos del tejido tumoral fueron fijados en formol 4% en PBS para ulteriores estudios histopatológicos.

Por otra parte, un grupo de animales de iguales características pero libres de tumor fueron sometidos al esquema de tratamiento descrito previamente.

A diferentes períodos de tiempo, los animales de los distintos grupos fueron sacrificados y conservados en formol al 4% en PBS para su posterior autopsia.

6.3.- Evaluación de la angiogénesis

Dos grupos de ratones atímicos variedad *nu/nu* NIH [Shin S., 1979] de ocho semanas portadores de tumores IIB-MEL-J, recibieron el tratamiento indicado en 7.2.- de esta sección durante 7 y 20 días consecutivos. A los tiempos indicados, los animales fueron sacrificados. Una vez extirpados los tumores, se cortaron en trozos y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

Para la determinación de la angiogénesis se realizaron inmunohistoquímicas, utilizando el anticuerpo monoclonal MEC1.13, de los trozos tumorales fijados y cortados en crióstato. El anticuerpo MEC1.13 reconoce específicamente células endoteliales murinas [Vecchi A., 1994].

ABREVIATURAS

- [³H]-E₂: estradiol tritiado
[³H]-R1881: metiltrienolona tritiada
[³H]-R5020: progestágeno tritiado
ALM: melanoma acral lentiginoso
AMC: anticuerpo monoclonal
APC: anticuerpo policlonal
Cas: casodex
Cis-plt: cisplatino
CPA: acetato de ciproterona
DHT: dihidrotestosterona
DOCA: desoxicorticosterona
E₂: estradiol
ECM: matriz extracelular
EGF: factor de crecimiento epidérmico
F: cortisol
FBS: suero fetal bovino
Flu: flutamida
ICQ: inmunocitoquímica
IFN: interferón
IHQ: inmunohistoquímica
IL-2: interleuquina-2
K_d: constante de disociación aparente
LMM: melanoma lentigo maligno
M0: ausencia de metástasis sistémicas

Materiales y Métodos: Mat. y Mét.

N: nódulos linfáticos

N0: ausencia de metástasis en ganglios

NM: melanoma nodular

NX: N° de ganglios comprometidos

OCT: medio de inclusión de tejidos

OH-Flu: hidroxiflutamida

PBS: buffer fosfato salino

Pg: progesterona

PT: tumor primario

RA: receptor androgénico

RE: receptor estrogénico

RGP: fase de crecimiento radial

RPg: receptor de progesterona

SHBG: globulina de unión a hormonas sexuales

SSM: melanoma extensivo superficial

T: testosterona

TA: acetona de triamcinolona

Ta: temperatura ambiente

Tam: tamoxifeno

VGP: fase de crecimiento vertical

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Aarnisalo P.**, Palvimo J.J y Janne O.A. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2122-2127; 1998.
- Adams J.M.** y Cory S. Transgenic models of tumor development. *Science* 254: 1161; 1991.
- Anderson C.M.**, Buziad A.C., Legha S.S. y col. Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology* 9 (11): 1149-1158; 1995.
- Asslin J.**, Melancon R., Gordeau I., y col. Specific Binding of [³H]-methyltrienolone to both progestin and androgen binding components in human benign prostatic hypertrophy (BPH). *J. Ster. Biochem.*, 10: 483-486; 1979.
- Balch C.M.**, Houghton A.N., Milton G.W. y col. Lippincott Company. Philadelphia. Capitulo II, pag 16 y 101; 1992.
- Balch C.M.**, Soong S-J., Murad T.M., y col. A multifactorial analysis of melanoma III. Prognostic factors in melanoma patient with lymph node metastases (Stage II). *Ann. Surg.* 193: 377; 1981.
- Balzi D.**, Carli P., Giannotti B., and y col. Skin melanoma in Italy: a population- based study on survival and prognostic factors. *Eur. J. Cancer* 34 (5): 699-704; 1998.
- Ballaré C.**, Bravo A.I., Sorín I. y col. The expression of progesterone receptors coincides with an arrest of DNA synthesis in human breast cancer. *Cancer* 67: 1352-1358; 1991.
- Barnhill R.L.** y Mihm M.C. Jr. Pigmented spindle cell nevus and its variants: Distinction from melanoma. *Br. J. Dermatol.* 21: 717; 1989.
- Battmann T.** Bonfils A., Branche J. y col. RU 58841, A new specific topical antiandrogen: A candidate of choice for the treatment of acne, androgenic alopecia and hirsutism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 48 (1): 55-60; 1994.
- Berrevoets C.A.**, Veldscholte J. y Mulder E. Effects of antiandrogens on transformation and transcription activation of wild-type and mutated (LNCaP) androgen receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46 (6): 731-736; 1993.
- Bishop J.M.** Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235; 1991.
- Bonne C.** y Raynaud J.P. Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R1881). *Steroids* 27: 297-301; 1976.
- Bonne C.** y Raynaud J.P. Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors. *Steroids* 26: 227-232, 1975.
- Bover L.**, Barrio M., Slavutsky I. y col. Description of a new human breast cancer cell line, IIB-BR-G, established from a primary undifferentiated tumor. *Breast Cancer Res. and Treatm.* 19: 47-56; 1991.
- Boyd A.L.** y Samid D. Molecular biology of transgenic animals. *J. Anim. Sci.* 71 (S3): 1; 1993.
- Brann D.W.**, Hendry L.B. y Malesh V.B. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52: 2, 113-133, 1995.

- Brolin J.**, Skoog L. y Ekman P. Immunohistochemistry and biochemistry in detection of androgen, progesterone and estrogen receptors in benign and malignant human prostatic tissue. *The Prostate* **20** (4): 218- 295; 1992.
- Carthew P.**, Martin E.A., White I.N.H. y col. Tamoxifen induces short-term cumulative DNA damage and liver tumors in rats: promotion by phenobarbital. *Cancer Research* **55**: 544-547; 1995.
- Cato A.C.B.** y Peterziel H. The androgen receptor as mediator of gene expression and signal transduction pathways. *Trends in Endocrinol. Metab.* **9**: 150-154; 1998.
- Clark W.H. Jr.**, Elder D.E. y Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum. Pathol.* **17**: 443, 1987.
- Clark W.H. Jr.** A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biological behavior. En: *Advances in biology of the skin.* Montagna W, Hu F eds. Pergamon Press, Oxford. **Vol VIII**, pag 621; 1967.
- Clark W.H. Jr.** y Mihm M.C. Jr. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *Am J. Pathol.* **55**: 39; 1969.
- Clark W.H. Jr.**, Elder D.E., Guerry D. y col. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* **15**: 1147;
- Clitt D.G.** Hyperthermic isolation limb perfusion for malignant melanoma: a review. *Cancer Investigation* **10** (4): 277-284; 1992.
- Creagan E.T.**, Ingle J.M., Woods J.E. y col. Estrogen receptors in-patients with malignant melanoma. *Cancer* **46**:1785-1786; 1980.
- Crombie I.K.** Racial differences in melanoma incidence. *Br. J. Cancer* **40**: 185-193, 1979.
- Culig Z.**, Hobisch A. Hittmair A. y col. Androgen receptor gene mutations in prostate cancer. Implications for disease progression and therapy. *Drugs Aging* **10** (1): 50-8; 1997.
- Chang A.E.**, Karnell L.H. y Menck H.R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma. *Cancer* **83**: 1664-1678, 1998.
- Chang C.**, Whelan C., Popovich T. y col. Fusion proteins containing androgen receptor sequences and their use in production of Poly- and Monoclonal anti-androgen receptor antibodies. *Endocrinology*, **125**: 1097-1099; 1989.
- Choudhry R.**, Hodgins M.B., Van der Kwast T.H. y col. Localization of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry; implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. *J. Endocrinology* **133**: 467-475; 1992.
- Delaere K.P.J.** y Van Thillo E.L. Flutamide monotherapy as primary treatment in advanced prostatic carcinoma. *Seminars in Oncology* **18**: 5 (Suppl 6), 13-18; 1991.
- Devlin T.M.** Biochemistry with clinical correlations: *Steroid Hormones* **21**: 901-925; 1992.
- Driscoll M.S.**, Grin - Jorgensen C.M. y Grant- Kels J.M. Does pregnancy influence the prognosis of malignant melanoma? *J. Am. Acad. Dermatol.* **29** (4): 619-630; 1993.

- Duncan L.M.**, Travers R.L., Koerner F.C. y col. Estrogen and progesterone receptor analysis in pregnancy-associated melanoma: absence of immunohistochemically detectable hormone receptors. *Hum. Pathol.* **25** (1): 36-41; 1994.
- Ehring F.** Ilustración científica en dermatología. Cinco siglos de historia. EDIKA MED: 152-153, 1995.
- Elder D.E.** Acquired melanocytic nevi and melanoma: The dysplastic nevus syndrome. En: *Pathology of malignant melanoma*. Ackerman B ed. Karger, New York. Pag 185; 1987.
- Elder D.E.**, Ainsworth A.M. y Clark W.H. Jr. The surgical pathology of primary cutaneous malignant melanoma. En: *Human malignant melanoma*. Clark WH Jr, Goldman LI, Mastrangelo MJ eds. Grune & Stratton, New York. Pag 108; 1979.
- Evans R.M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**: 889-895; 1988.
- Fanidi A.**, Harrington E.A. y Evan G.I. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* **359**: 554; 1992.
- Fearon E.R.** y Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759; 1990.
- Fearon E.R.**, Hamilton S.R. y Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* **238**: 193; 1987.
- Fidler I.J.** y Hart I.R. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* **217**: 998; 1982.
- Fishel R.** Genomic instability, mutators, and the development of cancer: is there a role for p53. *J.Natl.Cancer Inst.* **88**: 1608; 1996.
- Folkman J.** y Sing Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**: 10931-10934; 1992.
- Fortunati N.**, Fissore F., Fazzari A. y col. Biological relevance of the interaction between sex steroid binding protein and its specific receptor of MCF-7 cells: effect on the estradiol-induced cell proliferation. *J. Ster. Biochem. Molec. Biol.*, **45**: 435-444; 1993.
- Frixen U.H.**, Behrens J., Sachs M. y col. E-Cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **113**: 173; 1991.
- Fujii H.**, Szumel R., Marsh C. y col. Genetic progression, histological grade, and allelic loss in ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Cancer Res.* **56**: 5260; 1996.
- Furnival C.M.**, Gough I.R. y Thynne G.S.J. Malignant melanoma: Tamoxifen and oestrogen receptors. *Lancet* **ii**: 374; 1981.
- Gaddipati J.P.**, McLeod D.G., Heidenberg H.B. y col. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer. *Cancer Res.* **54**: 2861-2864, 1994.
- García T.** Benhamou B. Gofflo D. y col. Switching agonistic, antagonistic and mixed transcriptional responses to 11 β -substituted progestins by mutation of the progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*, **6** (12): 2071-2078; 1992.
- Giovanella B.**, Tilley W.D., de Young NJ. y col. The nude mouse in cancer research. *Adv. Cancer Res.* **44**: 69-120; 1985.

- Gottardis M.M.** y Craig Jordan V. Development of tamoxifen- stimulates growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long- term antiestrogen administration. *Cancer Res.* **48**: 5183-5187; 1988.
- Graham M.L.**, Krett N.L., Miller L.A. y col. T47Dco cells, genetically unstable and containing estrogen receptor mutations, are a model for the progression of breast cancers to hormone resistance. *Cancer Res.*, **50**: 6208-6217; 1990.
- Greene M.H.** y Fraumeni J.F. The hereditary variant of malignant melanoma. En: Clark W.H., Goldman L., Mastrangelo M.J. eds. *Human malignant melanoma*. New York: grune and Stratton: 139-166, 1979.
- Greene M.H.**, Clark W.H. Jr, Tucker M.A. y col. Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. The familial dysplastic nevus syndrome. *N. Engl. J. Med.* **312**: 91; 1985.
- Griffel M.** Survival of cutaneous malignant melanoma patients al universitylyyyowa hospitals. *cancer* **47 (1)**: 1950-1974; 1981.
- Griffin T.W.**, Bodgen A.E., Reich S.D. y col. Initial clinical trials of the subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. *Cancer* **52**: 2185; 1983.
- Gruber S.B.**, Barnhill R.L., Stenn K.S. y col. Nevomelanocytic proliferations in association with cutaneous melanoma : A multivariate analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**: 773; 1989.
- Gudas J.M.**, Nguyen H., Li T., y col. Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **55**: 4561-4565; 1992.
- Guerra L.**, Mordoh J., Slavutsky I.E. y col. Characterization of IIB-MEL-J: A new highly heterogeneous human melanoma cell line. *Pigment Cell Research* **2**: 504-509; 1989.
- Hackenberg R.** Hofmann J. Holzel F. y col. Stimulatory effects of androgen and antiandrogen on the in vitro proliferation of human mammary carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* **114 (6)**: 593-601; 1988.
- Hartwell L.** Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* **71**: 543; 1992.
- Herlyn M.** y Houghton A.N. Biology of melanocytes and melanoma. Cap.8, En: *Cutaneous Melanoma*. Balch C.M., Houghton A.N., Milton G.W., Sober a.J. y Soong S.J.B. (eds). Lippincott Company. Philadelphia. Pags. 82-92, 1992.
- Hinds P.W.** y Weinberg R.A. Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 135; 1994.
- Holmstrom H.** Surgical management of primary melanoma. *Seminars in Surgical Oncology* **8 (6)**: 366-369; 1992.
- Hunter T.** Cooperation between oncogenes. *Cell* **64**: 249; 1991.
- Hunter T.** Oncogenes and cell cycle. *Cur. Opin. Genet. Devel.* **3**: 1; 1993.
- Janne O.A.**, Jorma J.P., Kallio P. y col. Androgen receptor and mechanism of androgen action. *Annals of Medicine* **25**: 83-89; 1993.
- Jiang S.Y.**, Langan-Fahey S.M., Stella A.L. y col. Point mutation of estrogen receptor (ER) in the ligand-binding domain changes the pharmacology of antiestrogens in ER-negative breast cancer cells stably expressing complementary DNAs for ER. *Molecular Endocrinology* **6**: 2167-2174; 1992.

- Kahlenberg M.S.**, Stoler D.L., Basik M. y col. p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 1665; 1996.
- Kairiyama C.**, Slavutsky I., Larripa I., y col. Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. *Pigment Cell Research* **8**: 121-131; 1995.
- Kaplan E.L.** y Meier P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*; **53**: 457-481; 1958.
- Karakousis C.P.**, Goumas W., Rao U. y col. Axillary node dissection in malignant melanoma. *American Journal of Surgery* **162 (3)**: 202-207; 1991.
- Karjalainen S.** y Hakulinen T. Survival and prognosis factors of patients with skin melanoma. *Cancer*, **62**: 2274-2280; 1988.
- Keller E.T.**, Ershler W.B y Chang C. The androgen receptor: A mediator of diverse responses. *Front. Biosci.* **1**: d59-71; 1996.
- Ketcham A.S.** y Balch C.M. Classification and staging system. En: Balch CM, Milton GW, eds. *Cutaneous melanoma: Clinical management and treatment results worldwide*. Philadelphia: JB Lippincott, pg. 55; 1985.
- Kirkwood J.M.**, Strawderman M.H., Ernstoff M.S. y col. Interferon α -2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group trial EST 1684. *Journal of Clinical Oncology* **14 (1)**: 7-17; 1996.
- Klagsbrun M** y D Amore P. Regulators of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 217-39; 1991.
- Klein G.** y Klein E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature* **315**: 190; 1985.
- Kokoschka E.M.**, Spona J. y Knobler R. Sex steroid hormone receptor analysis in malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* **107 Suppl 23**: 54-59; 1982.
- Lamb P.H.Y.** Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**: 27-32; 1984.
- Launoit I.**, Veilleux R., Dufour M. y col. Characteristics of the biphasic action of androgens and the potent anti-proliferative effects of the new pure antiestrogen EM-139 on the cell cycle kinetic parameters in LNCaP human prostatic cancer cells. *Cancer research* **51**: 5165-5170, 1991.
- Lecavalier M.A.**, From L. y Gaid N. Absence of estrogen receptors in dysplastic nevi and malignant melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **23 (2 Pt 1)**: 242-246, 1990.
- Legha S.S.** Current therapy for malignant melanoma. *Seminars in Oncology* **16 (1 Suppl. 1)**: 34-44; 1989.
- Leon P.**, Daly J.M., Synnestvedt M. y col. The prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. *Archives of Surgery*, **126 (2)**: 1461-1468; 1991.
- Levi F.**, Randimbison L., La Vecchia C. y col. Prognostic factors for cutaneous malignant melanoma in Vaud, Switzerland. *Int. J. Cancer* **78 (3)**: 315-319; 1998.

- Liang T.**, Hoyer S., Yu R. y col. Immunocytochemical localization of androgen receptor in human skin using monoclonal antibodies against the androgen receptor. *J. Invest Dermatol* **100**: 663-666; 1993.
- Liao S.** Androgen action: molecular mechanism and medical application. *Source J. Formos Med. Assoc.* **93**: 9, 741-751; 1994.
- Livingstone L.R., Whi., Sp, Sprouse J. y col. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* **70**: 923; 1992.
- Luisi B.F., Xu X.W., Otwinowski Z. Freedman L.P. y col. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**: 497-505; 1991.
- Luthy I.A.** Caron S. Belanger A. y col. Effect of flutamide, a pure antiandrogen, on endocrine parameters, in the adult female rat. *Gynecol. Endocrinol.* **1**: 151-168; 1987.
- Luthy I.A.**, Begin D. y Labrie F. Mediation by the androgen receptor of the stimulatory and antiandrogenic actions of 17 β -estradiol on the growth of androgen sensitive Shinogi mammary carcinoma cells in culture. *Endocrinology*, **123**: 1418-1424; 1988.
- Mackie R.M.** Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur. J. Cancer* **34**: Supp. 3, s3-S6; 1998.
- Marugo M.**, Bernasconi Glietta L. y col. Effects of dihydrosterone and hydroxyflutamide on androgen receptors in culture human breast cancer cells (EVSA-T). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42** (5): 547-54; 1992.
- Masiel A.**, Buttrick P. y Bitran J. Tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. *Cancer Treatment reports.* **65** (5-6): 531-532; 1981.
- Mc Clay E.F.**, Albright KD., Jones J.A. y col. Tamoxifen modulation of cisplatin sensitivity in human malignant melanoma cells. *Cancer Res.* **53**: 1571-1576; 1993.
- Middleman M.N.**, Lush R.M y Figg W.D. The mutated androgen receptor and its implications for the treatment of metastatic carcinoma of the prostate. *Pharmacotherapy* **16** (3): 376-81; 1996.
- Miller J.G.**, Gee J., Price A. y col. Investigation of oestrogen receptors, sex steroids and soluble adhesion molecules in the progression of malignant melanoma. *Melanoma Res.* **7**(3): 197-208; 1997.
- Morvillo V.**, Luthy I.A., Bravo A.I., y col. Atypical androgen receptor in the human melanoma cell line IIB-MEL-J. *Pigment Cell Research* **8**: 135-141; 1995.
- Neri R.O.**, Florence K., Koziol P. y col. A biological profile of a non-steroidal antiandrogen, Sch.13521. *Endocrinology* **91**: 427-437; 1972.
- Nordlund J.J.** The lives of pigment cells. *Dermatol. Clin.* **4**: 407; 1986.
- O' Brian C.A.**, Liskamp RM., Solomon DH. y col. Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. *Cancer Res.* **45**: 2464-2465; 1985.
- O' Doherty C.J.**, Prescott R.J., White H. y col. Sex differences in presentation of cutaneous malignant melanoma and survival from stage I disease. *Cancer* **58** (3): 788-792; 1986.
- Ojasoo T.** y Raynaud J.P. Unique steroid congeners for receptor studies. *Cancer Res* **38**: 4186; 1978.

- Ostmeier H.** Schumann J. Otto F. y col. The relation between characteristics of the tumor cells and sex of patients in primary malignant melanomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **117 (4):** 364-366; 1991.
- Pakkanen M.** Survival rates of patients with malignant melanoma of the skin. *Ann. Chir Gynaecol* **66 (1):** 31-35; 1977.
- Palmiter R.D.** Germ line transformation of mice. *Annu. Rev. Genet.* **20:** 465; 1986.
- Paris F.,** Weinbauer GF., Blum V. y col. The effect of androgens and antiandrogens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of male rats. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.,* **48 (1):** 129-137; 1994.
- Pawelek J.** Melanoma cells. *Methods in Enzymology LVII:* 564; 1979.
- Peets E.A.,** Henson M.F. y Neri R. On the mechanism of anti-androgenic action of flutamide ($\alpha\alpha\alpha$ -Trifluoro-2 methyl-4"-nitro-m-propionotoluidide) in the rat. *Endocrinology,* **94 (2):** 532-540; 1974.
- Piantelli M.,** Ricci R., Larocca L.M. y col. Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells. *Invest. Dermatol.* **105:** 248-253, 1995.
- Poste G.** y Fidler I.J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283:** 139; 1980.
- Poulin R.** Baker D y Labrie F. Androgens inhibit basal and estrogen induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Res Treat.* **12 (2):**213-25; 1988.
- Quarmby V.E.,** Kemppainen J.A, Sar M., y col. Expression of recombinant androgen receptor in cultured mammalian cells. *Mol. Endocrinol.* **4:** 1399- 1407; 1990.
- Rampen F.** Malignant melanoma: sex differences in survival after evidence of distant metastasis. *Br. J. Cancer* **42 (1):** 52-57; 1980.
- Rampen F.J.H** y Mulder J.H. Malignant melanoma: an androgen dependent tumor? *Lancet* **1:** 562-565; 1980.
- Rawles M.** Origin of pigment cell from the neural crest in the mouse embryo. *Physil. Zool.* **20:** 248; 1947.
- Reed R.J.** The histologic variance of malignant melanoma: The interrelationship of histological subtype, neoplastic progression, and biological behavior. *Pathology* **17:** 301; 1985.
- Reimer R.R.,** Clark W.H., Green M.H. y col. Precursor lesions in familial melanoma. A new genetic preneoplastic syndrome. *JAMA* **239:** 774; 1978.
- Reintgen D.S.,** Paull D.E., Seigler H.F. y col. Sex related survival differences in instances of melanoma. *Surg. Gynecol. Obstet* **159 (4):** 367-372; 1984.
- Rigel D.S.** Epidemiology and prognostic factors in malignant melanoma. *Ann. Plast. Surg.* **28:** 7-8, 1992.
- Ris-Stalpers C.,** Verleun-Mooijman M.C. y col. Threonine on amino acid position 868 in the human androgen receptor is essential for androgen binding specificity and functional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196 (1):** 173-80; 1993.

- Ruizeveld de Winter J.A.**, Trapman J., Vermeij M. y col. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 927-936; 1991.
- Saadi M.V.**, Patrick C., Walsh M.D y col. Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. *Cancer* **67**: 3057- 3064; 1991.
- Saparano J.A.**, Fisher R.I., Sunderlando M. y col. Randomized phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon α -2a in patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology* **11 (10)**: 1969-1977; 1993.
- Sar M.** Application of avidin-biotin complex technique to the localization of estradiol receptor in target tissues using monoclonal antibodies. Bullock GR, Petrusz P (eds). *Techniques in Immunocytochemistry*. Academic press, New York, Vol 3: 43-54; 1985.
- Scatchard G.** The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* **51**: 660-672; 1949.
- Shaw H.M.**, McGovern, Milton G.W y col. Histologic features of tumors and the female superiority in survival from malignant melanoma. *Cancer* **45**: 1604-1608; 1980.
- Shaw H.M.**, McGovern, Milton G.W y col. The female superiority in survival in clinical stage II cutaneous malignant melanoma. *Cancer* **49 (9)**: 1941-1944; 1982.
- Shaw H.M.**, Milton G.W., Farago G. y col. Endocrine influences on survival from malignant melanoma. *Cancer* **42**: 669-677; 1978.
- Shin S.** Use of nude mice for tumorigenicity testing and mass propagation. *Meth. Enzymol*, **LVIII**: 371-379; 1979.
- Shiu M.H.**, Schottenfeld D., Maclean M.B. y col. Adverse effect of pregnancy on melanoma. *Cancer* **37**: 181-187; 1976.
- Slingluff C.L. Jr.** y Seigler H.F. Malignant melanoma and pregnancy. *Ann. Plast Surg.* **28 (1)**: 95-99; 1992.
- Solomon E.**, Borrow J. y Goddard A.D. Chromosome aberrations and cancer. *Science* **254**: 1153; 1991.
- Soule H.D.**, Vazquez J., Long A. y col. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 1409; 1973.
- Stidham K.R.**, Johnson J.L. y Seigler H.F. Survival superiority of females with melanoma. A multivariate analysis of 6383 patients exploring the significance of gender in prognostic outcome. *Arch Surg* **129 (3)**: 316-324; 1994.
- Stover EP.** Krishnan A.V y Feldman D. Estrogen down-regulation of androgen receptors in cultured human mammary cancer cells (MCF-7). *Endocrinology* **120 (6)**: 2597-603; 1987.
- Sufirin G.** y Coffey D. Flutamide. Mechanism of action of a new nonsteroidal antiandrogen. *Investigative Urology* **13 (6)**: 429-434; 1975.
- Takeda H.**, Chodak G., Mutchnik S. y col. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J. Endocrinology* **126**: 17-25; 1990.

- Tan J.,** Joseph D.R., Quarmby V.E. y col. The rat androgen receptor: Primary structure, autoregulation of its messenger ribonucleic acid, and immunocytochemical localization of the receptor protein. *Mol. Endocrinol.*, **2**: 1276-1285; 1988.
- Tan J.,** Joseph D.R., Quarmby V.E. y col. The rat androgen receptor: primary structure, autoregulation of its messenger ribonucleic acid, and immunocytochemical localization of the receptor protein. *Molec. Endocr.* **2**: 1276-1285; 1988.
- Thorn M.,** Adami H.O., Bergstrom R y col. Trends in survival from malignant melanoma: remarkable improvement in 23 years. *J. Nat. Cancer Inst.*, **81**: 611-617; 1989.
- Tlsty T.D.,** Margolin B.H. y Lum K. Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9441; 1989.
- Tora L.,** Mullick A., Metzger D. y col. The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *EMBO J.* **8**: 1982-1986; 1989.
- Vecchi A.,** Garlanda C., Lampugnani M. y col. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. By application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur. J. Cell Biol.* **63**: 247-251, 1994.
- Veldscholte J.,** Beerrevoets C.A., Ris-Stalpers C. y col. The androgen receptor LNCaP contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *J. Steroid Biochem. Mol Biol.* **41 (3-8)**: 665-9; 1992.
- Veldscholte J.,** Ris-Stalpers C., Kuiper G.G. y col. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173 (2)**: 534-40; 1990.
- Vogelstein B.** y Kinzler K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**: 138; 1993.
- Walker M.J.,** Ronan S.G., Han M.C. y col. Interrelationship between histopathologic characteristics of melanoma and estrogen receptor status. *Cancer* **68**: 184-188; 1991.
- Watts C.K.,** Sweeney K.J., Warlters A. y col. Antiestrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **31**: 95-105; 1994.
- Weidner F.** 8-year-survival in malignant melanoma related to sex and tumor location. *Dermatologica* **162 (1)**: 51-60; 1981.
- Weinberg R.A.** Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer J. Clin.* **44**: 160; 1994.
- Weston J.A.** The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv. Morphol.* **8**: 41; 1970.
- Worth A.J.,** Gallagher R.P., Elwood J.M y col. Pathologic prognostic factors for cutaneous malignant melanoma: The western Canada melanoma study. *Int. J. Cancer*, **43**: 370-375; 1989.
- Wright J.A.,** Smith E.S., Watt F.M. y col. DNA amplification is rare in normal human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1791; 1990.

Yin Y., Tainsky M.A., Bischoff F.Z. y col. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70**: 737; 1992.

Yu L. Nagasue N., y Makino Y. Effect of androgens and their manipulation on cell growth and androgen receptor (AR) levels in AR-positive and negative human hepatocellular carcinomas. *J. Hepatol* **22(3)**: 295-302; 1995.

Zhong-Xun Z., Choi-Iok W., Madhabananda S. y col. The androgen receptor: An overview. *Recent Progress in Hormone Research* **49**: 249-274; 1994.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Mordoh, por brindarme la posibilidad de integrar su grupo de trabajo, de realizar esta Tesis y, fundamentalmente, por el apoyo que me brindó cada vez que necesité de él.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", por permitirme desarrollar esta Tesis en el Instituto.

Al personal de la Secretaría del Dpto. de Ciencias Biológicas y a Mabel y Silvana del Dpto. de Graduados de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por su amabilidad y permanente buena disposición para informar y solucionar problemas.

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las becas que posibilitaron la realización de la carrera del Doctorado.

A la Fundación Sales, por el valioso aporte económico brindado al laboratorio durante todos estos años.

A la Fundación Roemmers, porque el Subsidio otorgado posibilitó la compra de materiales indispensables para la culminación de muchos de los experimentos realizados en esta Tesis.

A Laura Bover, a quien le debo muchos de mis conocimientos adquiridos durante todos estos años, por su ayuda sincera y desinteresada, por su constante apoyo, estímulo y cariño.

A Isabel Luthy, quien colaboró en muchos de los experimentos reportados en este trabajo, por sus enseñanzas, su equilibrado manejo del tiempo, su permanente buen humor y afecto.

A Inés Bravo, por haber colaborado en varios de los experimentos de esta Tesis, por sus enseñanzas en Patología y su constante entusiasmo.

A Mariana Capurro, quien participó en algunos de los experimentos reportados en este trabajo, por tantos momentos compartidos, por su cariño y por la gran amistad que nos une.

A todos mis compañeros del laboratorio 101: Cecilia Ballaré, Paula Portela, Marcela Barrio, Fernanda Ledda, Osvaldo Podahcer y Claudia Kairiyama, por haber compartido y convivido cariñosa y solidariamente durante tantos años, y por el empeño que ha puesto cada uno para lograr un buen funcionamiento grupal.

A tanta gente de otros laboratorios del Instituto, muchos de ellos amigos entrañables, por las charlas de pasillo, los consejos y préstamos recibidos, y por la ayuda y el afecto brindados. Especialmente a Susana Giambiagi, Charly Semino, Alejandra Raimondi, Marcelo Rodríguez, Cristina Bertineti, Angeles Zorreguieta, Marta Bravo, Marcelo Guthmann, Mirta Brignone, Olga Castro y Alejandro Petroni.

Al Dr. Ricardo Calandra y a todo el equipo del IBIME, por la buena disposición y ayuda brindadas.

A Georgina y al personal de Biblioteca, a Hilda, Rita, Aída, a la gente de Administración y Secretaría, a Francisco y al personal de Mantenimiento, por su cotidiana contribución y ayuda.

A toda la gente de A. Morvillo & Q. Graphics, muy especialmente a Marta Prieto, Claudia Gómez, Antonio Draksler y Adolfo Morvillo, por la valiosa ayuda brindada durante la impresión de esta Tesis.

A mis padres, porque siempre me dieron el espacio y la confianza para que tomara mis propias decisiones, porque siempre las respetaron y avalaron, por su profundo amor y compromiso y, fundamentalmente, porque en ellos están mis raíces.

A Nadia, aunque aún no comprenda qué representa todo esto, por su intenso y sincero amor, por su expresividad, y por ser un motor permanente de alegría.

A Miguel, por su estímulo, energía y compromiso permanentes; sus críticas agudas y precisas; sus aportes siempre constructivos e infinita paciencia y, sobre todo, por diez años de crecimiento y de amor profundo.

June

Alouilles