

Tesis de Posgrado

Expresión y funcionalidad del receptor de progesterona (RP) en la modulación del crecimiento hormono-dependiente y en la adquisición de resistencia al tratamiento hormonal de un modelo murino de carcinogénesis mamaria

Helguero, Luisa Alejandra

2002

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:

Helguero, Luisa Alejandra. (2002). Expresión y funcionalidad del receptor de progesterona (RP) en la modulación del crecimiento hormono-dependiente y en la adquisición de resistencia al tratamiento hormonal de un modelo murino de carcinogénesis mamaria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3495_Helguero.pdf

Cita tipo Chicago:

Helguero, Luisa Alejandra. "Expresión y funcionalidad del receptor de progesterona (RP) en la modulación del crecimiento hormono-dependiente y en la adquisición de resistencia al tratamiento hormonal de un modelo murino de carcinogénesis mamaria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3495_Helguero.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (RP)
EN LA MODULACIÓN DEL CRECIMIENTO HORMONO-DEPENDIENTE Y EN LA
ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO HORMONAL DE UN
MODELO MURINO DE CARCINOGENESIS MAMARIA**

Lic. Luisa Alejandra Helguero

Director: Dr. Alfredo A. Molinolo

**Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal
Instituto de Biología y Medicina Experimental
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Buenos Aires, Argentina**

Nº 3495

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**PROGESTERONE RECEPTOR (PR) EXPRESSION AND FUNCTIONALITY IN THE
MODULATION OF HORMONE-DEPENDENT GROWTH AND IN THE ACQUISITION
OF RESISTANCE TO HORMONAL TREATMENT IN A MODEL OF MURINE
MAMMARY CARCINOGENESIS**

Lic. Luisa Alejandra Helguero

Director: Dr. Alfredo A. Molinolo



A Paul

AGRADECIMIENTOS

Esta es una oportunidad que deseo aprovechar mencionando a todas las personas que siempre estuvieron a mi lado...

A mi esposo y amigo, Paul.

A mi familia, Mami, Pato, Hugo y Papi. Después de tantos sacrificios lo conseguí!

A mis amigas del alma Vero y Sole

A mis amigos del laboratorio, hemos pasado tanto tiempo juntos que los siento casi como una familia. Alejo, Caro, Giselle, Julieta, María, Marina, Vicky, Alfredo y Claudia. Gracias de verdad por su apoyo incondicional.

Gracias a Caro y Vicky otra vez por haber leído y corregido este manuscrito.

A la Dra. Shyamala

A Thomby

Claudia y Alfredo - Alfredo y Claudia. Me gustaría decirles cuanto disfruté trabajar bajo su dirección. Ustedes le dan a la palabra Mentor un verdadero significado. Constantemente y con infinita paciencia me ofrecieron sus conocimientos. Espero, algún día cuando dirija a mis propios becarios poder ser como ustedes.

Me gustaría también agradecer a todas las personas que trabajan en el Instituto de Biología y Medicina Experimental por su buena disposición para responder a mis inquietudes. Pero me gustaría mencionar a aquellos con los que he tenido el gusto de relacionarme más estrechamente:

Drs. Damasia Becú

Juan Carlos Calvo

Graciela Díaz

Mercedes Goin

Alejandro Mladovan

Isabel Lüthy

Marcelo Viegas

Al laboratorio del Dr. J.C. Calvo por prestar gentilmente las células NMuMg utilizadas como control negativo en este trabajo.

Tampoco quisiera olvidarme las dulces ratoncitas Balb/c, ya que sin su desinteresado aporte este trabajo no hubiera sido posible.

En este trabajo se utilizaron las siguiente hormonas que fueron gentilmente donadas:

MPA depósito

Laboratorios Gador

Onapristona

Schering, Alemania.

Por último, este trabajo pudo realizarse gracias al apoyo con becas y subsidios de:

Conicet

Agencia

Fundación Sales

Fundación Roemmers

Parte de la presente Tesis fue distinguida con el Premio Bernardino Rivadavia sobre investigación de la etiología o el tratamiento del cáncer. Otorgado por La Academia Nacional de Medicina en diciembre de 2000.

“Respuesta a la terapia hormonal y expresión diferencial de isoformas de receptor de progesterona en carcinomas mamarios experimentales”.

Luisa A. Helguero, Caroline Lamb, Victoria Fabris, Silvia Vanzulli, Claudia Lanari y Alfredo Molinolo

RESUMEN

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en las mujeres, luego del cáncer de pulmón. En el desarrollo de esta enfermedad se postulan distintas etapas biológicas que van progresando desde un crecimiento hormono-dependiente a uno hormono-independiente, lo que está asociado a un aumento de la agresividad. En la clínica, si el tumor expresa receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), una parte importante de los enfoques terapéuticos de elección, es la hormonoterapia con el antiestrógeno tamoxifeno. Sin bien en un principio la gran mayoría de los pacientes responden, con frecuencia el tumor evoluciona hacia la resistencia al tratamiento hormonal, lo que se asocia a diseminación generalizada. Esta resistencia, cuyos mecanismos aun se desconocen, no implica en general una pérdida de expresión de receptores hormonales y todo parece indicar que, o bien existe un cambio intrínseco en éstos, o en los mecanismos que regulan su expresión y activación.

En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo de adenocarcinomas mamarios murinos por la administración prolongada de MPA en ratones hembras vírgenes de la cepa BALB/c. Estos tumores son en su mayoría de origen ductal con capacidad invasora. En un principio poseen un comportamiento progestágeno-dependiente (PD), requiriendo de la hormona trófica para su crecimiento y expresan RE y RP, pero con el tiempo pueden adquirir un fenotipo progestágeno-independiente, en el cual se conserva aún la expresión de receptores. Previamente hemos demostrado que el RP estaría involucrado en la adquisición de hormono-dependencia.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel del RP en la transición de hormono-dependencia a independencia y en la adquisición de resistencia hormonal. Para este estudio utilizamos seis tumores PD y nueve progestágeno-independientes.

Caracterizamos la respuesta *in vivo* de los tumores independientes al tratamiento con los antiprogestágenos onapristona y mifepristona y al 17- β -estradiol. Seis tumores respondieron regresionando, y los llamamos progestágeno-independientes respondedores (PI-R) y tres no respondieron; a éstos los denominamos progestágeno-independientes no respondedores (PI-NR). En nuestro laboratorio ya se había evaluado la respuesta *in vivo* de los tumores PD, y respondieron a estrógenos y antiprogestágenos con regresión.

Cuando, en cultivos primarios de un tumor PD, estudiamos la respuesta proliferativa a MPA *in vitro* observamos que la misma fue bifásica, con dos pendientes estimuladoras, una a concentraciones muy bajas ($EC_{50} = 1.5 \pm 0.7 \text{ fM}$) y la otra a concentraciones más altas ($EC_{50} = 0.33 \pm 0.3 \text{ nM}$). Con estos resultados, evaluamos por unión del ligando la expresión de receptores en todos los tumores y en tejidos normales. En útero normal, y en tumores PD y PI-R, descubrimos dos sitios receptores de progesterona, uno de alta afinidad no descrito previamente en el RP ($K_d = 43 \pm 9 \text{ pM}$, $Q = 9 \pm 2 \text{ fmoles/mg de proteína}$) y el otro sitio clásico que habíamos hallado previamente ($K_d = 9.2 \pm 4 \text{ nM}$). En los tumores PI-NR no se pudieron determinar estos parámetros. El estudio de la distribución subcelular de RP mostró que en los tumores PD y PI-R se localizan principalmente en el citosol, y son regulados por MPA, mientras que en los tumores PI-NR están principalmente en el núcleo y no son regulados. Sin embargo, durante el ciclo estral, los sitios receptores son regulados en todos los tipos de tumor estudiados.

Para caracterizar la expresión de las isoformas del RP utilizamos *Western blot*. En los tumores PD y PI-R se encontraron ambas isoformas, RP_A y RP_B , con patrón de expresión similar al de los controles normales, útero y mama de ratón. Encontramos además, una proteína de 78 kDa que se expresa exclusivamente en los tumores, pero no en los tejidos normales. Desconocemos su naturaleza, pero se ha descrito una proteína similar en un 25 % de tumores humanos. Su ausencia de tejidos normales sugiere una posible aplicación como marcador tumoral. Con MPA, ambas isoformas RP_A y RP_B se regulan negativamente en forma similar. En los tumores PI-R se regula preferencialmente RP_B , esto sugeriría un papel del RP en este tipo de crecimiento en particular por RP_B .

En los tumores PI-NR se detectaron menores niveles de RP, principalmente de RP_B . Por estudios de *Western Blot* se podría predecir la capacidad de los tumores de responder al tratamiento hormonal.

Por inmunohistoquímica, no se observaron diferencias en el patrón de marcación entre los tres tipos de tumores. Todos fueron positivos, con un porcentaje de células marcadas del 50 % o más. Los resultados de SSCP indican que la reactividad diferencial de los anticuerpos con *Western blot* e inmunohistoquímica no se debe a mutaciones en el gen de RP. Hemos teorizado la posibilidad de cambios de expresión de epitopes secundarios al distinto procesado de los tejidos en las técnicas.

La caracterización de ARN por protección a RNasa indica que los niveles de RP en tumores PI-R y PI-NR son similares. Es probable que, en los tumores PI-NR, las diferencias de expresión observadas con *Western blot* se deban a cambios post-traduccionales.

Con oligonucleótidos antisentido del RP (asRP) en cultivos primarios de tumores PI-NR demostramos que los RP están involucrados en la proliferación celular aún cuando han perdido la capacidad de unir al antiprogéstágeno. Estos resultados, de ser extrapolables al humano indicarían que, en el tratamiento del cáncer de mama resistente a la terapia hormonal aún se podrían utilizar estrategias diseñadas a bloquear la funcionalidad de los receptores hormonales.

ABSTRACT

Breast cancer is, after lung cancer, the second cause of death in women. The development of this disease occurs through different stages from a hormone-dependent to a hormone-independent growth, which is associated to increased aggressiveness. One of the treatments of choice for ER and PR positive breast cancer is hormone therapy with the antiestrogen tamoxifen. Most of the patients respond, although eventually the tumor becomes refractory and the disease progresses. The mechanisms of resistance remain unknown, but most tumors still express hormone receptors, indicating that there is either an intrinsic modification on these molecules, or in the regulation of their expression and activation.

In our laboratory, we have developed a murine mammary adenocarcinoma model by prolonged administration of MPA on female virgin BALB/c mice. Most of these tumors are invasive ductal carcinomas, disclosing a progestin-dependent pattern of growth (PD) and they express ER and PR. Either spontaneously or by successive transplantations in animals not treated with hormones, progestin-independent tumors may arise that maintain the expression of hormone receptors.

Our goal was to study the role of PR in the transition from hormone-dependence to independence and in the acquisition of resistance to hormonal therapy.

We characterized the *in vivo* response of progestin-independent tumors to the antiprogestins onapristone and mifepristone and to 17- β -estradiol. Six tumors regressed, and we named them responsive progestin-independent (R-PI); three did not respond and were named unresponsive progestin-independent tumors (UR-PI).

We studied the proliferative response to MPA *in vitro* on primary cultures of a PD tumor, and observed that it was biphasic, with two stimulatory slopes, one at very low concentrations ($EC_{50} = 1.5 \pm 0.7$ fM), and the other at higher concentrations ($EC_{50} = 0.33 \pm 0.3$ nM). Based on these results we evaluated the receptor expression by radioligand binding in all the tumors and normal tissues. In uterus, PD and R-PI tumors, we discovered two sites for the progesterone receptor, one of high affinity not previously reported ($K_d = 43 \pm 9$ pM, $Q = 9 \pm 2$ fmoles/mg de protein) and the other site which corresponds to the classical PR described by others ($K_d = 9.2 \pm 4$ nM, $Q = 376 \pm 74$ fmoles/mg de

protein). PR, in PD and R-PI tumors, are mainly localized in the cytosol, and are regulated by MPA, while in UR-PI tumors they are mainly in the nucleus and are not regulated by this hormone. Nevertheless, the receptor sites were regulated through the estral cycle in all the tumor types studied.

To characterize PR isoform expression we used Western blot. We found both PR_A and PR_B isoforms in PD and R-PI tumors, with a similar expression pattern compared to the control tissue uterus and normal mammary gland. We also found a 78 kDa protein which is exclusively expressed in tumors but not in normal tissue. Its nature remains unknown but a similar protein has been described in 25 % of human cancers. Its absence in normal tissues suggests a possible use as a tumor marker. With MPA treatment, both PR_A and PR_B are down regulated. PR_B is preferentially down regulated in R-PI tumors and this may be indicating its role in this type of growth. Lower levels of PR were detected in UR-PI tumors, particularly PR_B. Based on the Western blot studies the ability of the tumors to respond to hormonal treatment could be predicted.

PR expression was also studied by immunohistochemistry. No differences were observed between the staining patterns of the three tumor types. The signal was positive in 50 % or more nuclei. We conclude based on the SSCP studies that the differential reactivity between the antibodies used in Western blot and immunohistochemistry is not due to mutations in the PR gene. We theorize the possibility that these changes are product of modifications in the epitope expression due to the processing of the sample for each technique, or to post-translational changes.

The studies at RNA level by RNase protection assay indicate that PR expression levels in R-PI and UR-PI tumors are similar. Probably, in UR-PI tumors the lower expression levels observed with Western blot are due to post-translational modifications.

In primary cultures of UR-PI tumors, using antisense oligonucleotides to PR (asPR) we demonstrated that PR are involved in cell proliferation even when they have lost their ability to bind to the antiprogestagens. The importance of these observations relies in that, if these results to humans are possible to extrapolate to human, in the treatment of hormone resistant breast cancer strategies designed to block the functionality of these receptors could still be used.

protein). PR, in PD and R-PI tumors, are mainly localized in the cytosol, and are regulated by MPA, while in UR-PI tumors they are mainly in the nucleus and are not regulated by this hormone. Nevertheless, the receptor sites were regulated through the estral cycle in all the tumor types studied.

To characterize PR isoform expression we used Western blot. We found both PR_A and PR_B isoforms in PD and R-PI tumors, with a similar expression pattern compared to the control tissue uterus and normal mammary gland. We also found a 78 kDa protein which is exclusively expressed in tumors but not in normal tissue. Its nature remains unknown but a similar protein has been described in 25 % of human cancers. Its absence in normal tissues suggests a possible use as a tumor marker. With MPA treatment, both PR_A and PR_B are down regulated. PR_B is preferentially down regulated in R-PI tumors and this may be indicating its role in this type of growth. Lower levels of PR were detected in UR-PI tumors, particularly PR_B. Based on the Western blot studies the ability of the tumors to respond to hormonal treatment could be predicted.

PR expression was also studied by immunohistochemistry. No differences were observed between the staining patterns of the three tumor types. The signal was positive in 50 % or more nuclei. We conclude based on the SSCP studies that the differential reactivity between the antibodies used in Western blot and immunohistochemistry is not due to mutations in the PR gene. We theorize the possibility that these changes are product of modifications in the epitope expression due to the processing of the sample for each technique, or to post-translational changes.

The studies at RNA level by RNase protection assay indicate that PR expression levels in R-PI and UR-PI tumors are similar. Probably, in UR-PI tumors the lower expression levels observed with Western blot are due to post-translational modifications.

In primary cultures of UR-PI tumors, using antisense oligonucleotides to PR (asPR) we demonstrated that PR are involved in cell proliferation even when they have lost their ability to bind to the antiprogestagens. The importance of these observations relies in that, if these results to humans are possible to extrapolate to human, in the treatment of hormone resistant breast cancer strategies designed to block the functionality of these receptors could still be used.

ABREVIATURAS

AB	brote alveolar
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	AND copia
AEs	antiestrógenos puros
AF	funcion de transactivación
alfaERKO	gen del receptor de estrógeno alfa anulado
AP	antiprogestágeno
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
asRP	oligonucleótido antisentido del receptor de progesterona
asRPAB	oligonucleótido antisentido de isoformas RP _A y PR _B
asRPB	oligonucleótido antisentido de la isoforma RP _B
BET	brote terminal
BSA	albúmina sérica bovina
BUS	secuencia propia del RP _B
CT	conducto terminal
DBD	dominio de unión al ADN
DEXA	dexametasona
DHT	5- α -dihidrotestosterona
DMBA	dimetilbenzaantraceno
E	estrógeno
E ₂	17- β -estradiol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ERE	elemento respondedor a estrógeno
FLU	flutamida

HER	herregulina
HRE	elemento respondedor a hormonas
hsp 70	proteína de shock térmico de 70 kDa
hsp 90	proteína de shock térmico de 90 kDa
IF	función inhibitoria
IGF II	factor de crecimiento similar a la insulina
Kd	kilodalton
LBD	dominio de unión al ligando
MAPK	quinasa activada por mitógenos
MEK1	quinasa activada por mitógenos (45 kDa)
MPA	acetato de medroxiprogesterona
Ncor/SMRT	corepresor nuclear/silenciador de los receptores de ácido retinoico y hormona tiroidea
NLS	secuencia de localización nuclear
NMU	N-nitrosometilurea
PAs	antiprogestágenos puros
PD	progestágeno-dependiente
Pg	progesterona
PI-NR	progestágeno-independiente no respondedor
PI-R	progestágeno-dependiente respondedor
PRE	elemento respondedor a progesterona
PRKO	gen del receptor de progesterona anulado
PRL	prolactina
PRMs	moduladores de receptor de progesterona
Q	número de sitios receptores
RA	receptor de andrógeno
RE	receptor de estrógeno
RE α	receptor de estrógeno alfa

RE β	receptor de estrógeno beta
RG	receptor de glucocorticoides
R-IGF I	receptor de IGF I
RM	receptor de mineralocorticoides
RP	receptor de progesterona
RP _A	isoforma A del receptor de progesterona
RP _B	isoforma B del receptor de progesterona
RP _C	isoforma C del receptor de progesterona
RXR	receptor de hormona retinoide
sc	subcutáneo (a)
SDS	laurilsulfato de sodio
SERMs	moduladores selectivos del receptor de estrógeno
SRC-1/p300	modulador de receptores esteroides-1
SSCP	single-stranded conformational polymorphism
SU	secuencia susceptible de sumoilización
TDLU	unidad del lóbulo terminal
TGF β 1	factor de crecimiento transformante β 1
wt	ratón salvaje (normal)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
I. GENERALIDADES	2
II. CÁNCER DE MAMA	4
1. Incidencia	4
2. Etiología y Epidemiología del cáncer de mama	4
3. Estructura normal de la glándula mamaria	10
4. Histología y clasificación	10
5. Graduación de los tumores	11
III. RECEPTORES HORMONALES	14
Receptor de progesterona	17
Acciones no genómicas de la progesterona - Receptores de progesterona de membrana	19
Receptores de estrógenos	20
IV. PROGESTERONA EN LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL	24
El Receptor de progesterona y sus isoformas en la glándula mamaria normal	24
V. PROGESTERONA EN EL CÁNCER DE MAMA	28
Receptores de progesterona en el cáncer de mama	29
VI. TRATAMIENTO ENDOCRINO DEL CÁNCER DE MAMA	30
Pruebas clínicas	31
Efectos en modelos experimentales	33
Mecanismos de acción de los antiprogestágenos	33
VII. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSICIÓN DE HORMONO-DEPENDENCIA A HORMONO-INDEPENDENCIA Y EN LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO HORMONAL	37
VIII. MODELOS EXPERIMENTALES	40
Modelo experimental de inducción de carcinomas mamarios murinos por acetato de medroxiprogesterona	42

OBJETIVOS	44
MATERIALES Y SOLUCIONES	46
METODOLOGÍA	52
EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	54
DETERMINACIÓN DE RECEPTORES HORMONALES	55
• Unión del radioligando al receptor	57
• Western blot	59
• Inmunohistoquímica	60
• Cultivos primarios	60
• Protección a RNasa	63
RESULTADOS	
CAPITULO 1	68
• I. CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS TUMORALES <i>IN VIVO</i> , EVALUACIÓN DE PROGESTÁGENO-DEPENDENCIA E INDEPENDENCIA	68
• II. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRADIOL Y ANTIPROGESTÁGENOS <i>IN VIVO</i> DE LOS TUMORES PROGESTÁGENO-INDEPENDIENTES	70
• III. RESPUESTA A MPA <i>IN VITRO</i> DE LAS LÍNEAS PROGESTÁGENO-INDEPENDIENTES	72
• IV. EFECTO DEL ESTRADIOL Y ANTIPROGESTÁGENOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES PROGESTÁGENO-INDEPENDIENTES	74
• V. UNIÓN DEL RADIOLIGANDO AL RECEPTOR	74
• VI. RESUMEN	81
CAPITULO 2	83
• I. EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DEL RP	83
• II. EVALUACIÓN DE RP POR INMUNOHISTOQUÍMICA Y PROTECCIÓN A RNasa	98
• III. RESUMEN	103

CAPITULO 3	105
• I. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL RP EN TUMORES PROGESTÁGENO- INDEPENDIENTES NO RESPONDEDORES	105
• II. RESUMEN	111
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	126
BIBLIOGRAFÍA	129

FE DE ERRATAS

1. Página 21, renglón 20 y 25: donde dice citado en Tilley et al; 2001, debería leerse el número de la cita. **Tilley WD, Clarke CL, Birrell SN, Bruchoovsky N.** Hormones and cancer: new insights, new challenges. Trends Endocrinol Metab. 2001 Jul;12(5):186-8.
2. Página 28, último renglón: donde dice Aldaz 1996, debería leerse el número de la cita. **Aldaz CM, Liao QY, Paladugu A, Rehm S, Wang H.** Allelotypic and cytogenetic characterization of chemically induced mouse mammary tumors: high frequency of chromosome 4 loss of heterozygosity at advanced stages of progression. Mol Carcinog. 1996 Nov;17(3):126-33.
3. Página 75, renglón 2: donde dice (Maggi 1984), debería leerse el número de la cita. **Maggi A, Schrader WT, O'Malley BW.** Progesterone-binding sites of the chick oviduct receptor. Presence of a weaker ligand site which is destroyed by phosphatase treatment. J Biol Chem. 1984 Sep 10;259(17):10956-66.

PARTE I



INTRODUCCIÓN
OBJETIVOS

I. GENERALIDADES

Los mecanismos del control de crecimiento constituyen unos de los más importantes y menos comprendidos de la biología. En el desarrollo y crecimiento normal hay mecanismos muy precisos que le permiten a los órganos alcanzar un tamaño fijo que nunca es excedido. Normalmente, existe un balance entre factores estimulatorios e inhibitorios del control del crecimiento. Este equilibrio se rompe cuando existe un exceso o defecto de factores tróficos, como en el daño tisular o en síndromes de hiper o hiposecreción hormonal. Eventualmente, los mecanismos de homeostasis reestablecerán un equilibrio, y el sistema puede retornar al estado inicial o alcanzar un nuevo estado. No todas las células adultas conservan la característica de proliferar; en la mayoría de los órganos hay células de reserva o pluripotenciales que son capaces de crecer en respuesta a distintos estímulos y de diferenciarse a células específicas de cada tejido. En la mayoría de los casos estas células son las responsables del reemplazo que requiere el mantenimiento tisular y de regenerar los tejidos dañados. Generalmente se acepta que cuanto más altamente diferenciada es una célula es más probable que haya perdido su capacidad de proliferar (1).

En algunos casos y sin una ventaja concebible para el huésped, las células dejan de responder normalmente a los mecanismos de control de crecimiento y comienzan a proliferar. Este crecimiento relativamente autónomo, que estructural y funcionalmente puede presentar distintos grados de atipia es lo que en esencia se llama tumor o neoplasia. Las neoplasias se pueden clasificar en dos grupos: benignas y malignas, a estos últimos también se los llama cánceres (2).

Hiperplasias: son proliferaciones benignas de crecimiento local que pueden surgir en cualquier tejido y que suelen regresar cesado el estímulo que las indujo.

Tumores benignos: proliferaciones benignas, relativamente autónomas de crecimiento autolimitado, que no se diseminan, pero pueden dañar por presión local u obstrucción. En general si son tratados no resultan fatales.

Displasias: lesiones epiteliales caracterizadas por una alteración de los patrones de diferenciación, asociados a distintos grados de cambios morfológicos de la célula, con un incremento del número de mitosis, sin las

características histológicas completas de un carcinoma. Según su gravedad pueden ser leves, moderadas o intensas. Actualmente se las considera neoplasias intraepiteliales y se las suele designar como I, II y III.

Carcinoma *in situ*: lesión intraepitelial con las características citológicas de un cáncer. Al estar limitado al epitelio no puede dar metástasis. Pueden originarse en displasias. Las displasias y el carcinoma *in situ* se consideran lesiones preneoplásicas o precancerosas.

Tumores malignos o cánceres: lesiones proliferativas invasoras; son de crecimiento más rápido, infiltran el tejido y hacen metástasis en órganos distantes. Se pueden originar en un carcinoma *in situ*. Si no son tratados y en muchos casos aún con tratamiento son fatales. Como regla, existe una correlación entre grado tumoral y velocidad de crecimiento. Los tumores más diferenciados (bajo grado, Grado I) crecen más lentamente y los más anaplásicos (alto grado, Grado III o IV) crecen más rápido. Esta regla no es universal pero da una guía útil del comportamiento tumoral.

Los tumores malignos de tejidos epiteliales se denominan carcinomas (adenocarcinomas si se originan en glándulas).

II. CÁNCER DE MAMA

1. INCIDENCIA

El cáncer de mama es la segunda causa más común de muerte en las mujeres luego del cáncer de pulmón (3). En los Estados Unidos, se informan aproximadamente 192.000 nuevos casos y 40.000 muertes cada año (4). La incidencia de esta enfermedad ha aumentado durante los últimos años. Este aumento es real, y no se debe a la cantidad de nuevos casos que pueden ahora ser detectados gracias a estudios de detección masiva y diagnóstico temprano.

El riesgo de desarrollar cáncer de mama se incrementa rápidamente con la edad durante el período fértil; luego de la menopausia sigue aumentando, pero más lentamente. El 20 % de las mujeres que padecen esta enfermedad no sobreviven (3). Basado en datos de los años 1995-1997, el riesgo de ser diagnosticada con cáncer de mama durante la vida, para una mujer en EE.UU. es de 12.8 %, o 1 de cada 8 mujeres, mientras que el riesgo de morir de cáncer de mama es de 3.3 %, o 1 de cada 30 mujeres (5). Este "1 de cada 8" representa el riesgo acumulado durante la vida en una mujer que alcanza los 85 años. En promedio, de una cohorte de 1000 mujeres controladas desde el nacimiento hasta la muerte, 128 desarrollarán cáncer de mama. A edades tempranas el riesgo es, en realidad, menor que 1/8; a los 30 años la probabilidad de una mujer de desarrollar cáncer de mama antes de los 40 es de 1/250, mientras que una mujer a los 60 tiene una probabilidad de 1/36 de desarrollar cáncer antes de alcanzar los 70 años (6). En la Argentina los estudios epidemiológicos indicarían que la incidencia de esta enfermedad es similar a la comunicada en los Estados Unidos (7).

2. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

La etiopatogenia del cáncer de mama, al igual que la de otros cánceres, ha sido y es objeto de numerosas investigaciones, pero aún permanecen sin aclararse muchos de los mecanismos involucrados. La identificación de los factores de riesgo resulta fundamental para entender la variación de incidencia dentro y entre los distintos países, identificar a las mujeres que podrían beneficiarse con estrategias de promoción de la salud y prevención de la enfermedad, y modificación de factores que podrían reducir el riesgo (8). Los factores de riesgo identificados hasta el momento se clasifican en:

- **Genéticos**
- **Ambientales**
- **Hormonales**

Factores genéticos:

En una pequeña proporción de casos (alrededor de 5 % y en mujeres más jóvenes) el carcinoma de mama se asocia a la presencia de mutaciones en ciertos genes. Sin embargo, no está claro qué cambios genéticos son los importantes, si ocurren con un orden particular y no se conocen las causas de los mismos. Algunos cambios genéticos frecuentes se describen a continuación:

(a). Cáncer de mama familiar:

Alrededor del 5-10 % de las mujeres tienen un pariente en primer grado (madre, hermana) con cáncer de mama, lo que confiere un riesgo relativo mayor que se incrementa si el cáncer se desarrolló a edad temprana, si hay una historia de cáncer bilateral o si varios miembros de la misma familia han sido afectados.

BRCA1 es un gen supresor de tumores fuertemente ligado al cáncer de mama y ovario familiar (9). Este gen estaría involucrado en el mantenimiento de la integridad genómica incluyendo reparación de daños inducidos por radiación en el ADN y regulación de la transcripción. Los ratones *knock out* de BRCA1 no sobreviven a la etapa embrionaria (10). Los que expresan formas truncadas llegan a término, sin embargo las alteraciones del gen se asocian a inestabilidad genética, provocando la inactivación de otras proteínas (Ej. p53) que podrían llevar a la formación de un tumor (11).

Si bien las mutaciones de BRCA1 están involucradas en una minoría de los cánceres de mama (3-5 %), las mujeres portadoras tienen una alta probabilidad de desarrollar la enfermedad y aproximadamente en el 40 % de todos los tumores de mama hereditarios BRCA1 está mutado (Science editorial; 1993). Más recientemente se han descrito mutaciones en el gen de BRCA2, que también sería responsable del cáncer de mama familiar y estaría involucrado en el cáncer de mama masculino hereditario (12).

En los pacientes con historia familiar de cáncer de mama, las mutaciones de genes de la familia BRCA son comunes y el hecho de que estos genes estén involucrados en la reparación de daño inducido por radiación advierte sobre posibles riesgos en el uso de la mamografía como método de diagnóstico (13). El gen de p53 se ha asociado a cáncer de mama familiar en el síndrome de Li-Fraumeni (14).

(b). Oncogenes y genes supresores de tumores:

El gen HER2/neu o c-erbB2 es un miembro de la familia de receptores para factores de crecimiento Tipo 1, similar al receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) (15). Este gen puede estar sobreexpresado en un amplio número de cánceres, en particular los de alto grado, y se asocia a mal pronóstico, menor intervalo libre de la enfermedad, mayor riesgo de metástasis y resistencia a la terapia (15). Como es abundante en tejidos neoplásicos es un blanco elegido para inmunoterapias (16) y terapia génica (17). Actualmente, el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab (Herceptina) se encuentra en fase III de ensayos clínicos. Se une al dominio extracelular de HER2/neu y ha demostrado ejercer potentes efectos antiproliferativos (16).

Las alteraciones del gen supresor de tumor p53 también se han investigado extensamente en el cáncer de mama (18). Es una proteína que regula el ciclo celular. En condiciones de estrés celular o daño del ADN, los niveles de p53 aumentan (*síntesis de novo*), y se detiene el ciclo celular en la fase G1/S, permitiéndose la reparación del ADN o favoreciéndose la eliminación de la célula por apoptosis (19). De esta forma, p53 protege a la célula de la propagación de daños en el genoma potencialmente oncogénicos. Su vida media es corta debido a que se autorregula en un *feed-back* negativo en el cual induce el gen mdm2, cuyo producto inducirá inactivación rápida por unión a la p53, exportación al citoplasma y ubiquitinación (19). Cuando el gen está mutado, la proteína falla en inducir su propia degradación y se acumula en el núcleo, facilitándose su detección inmunohistoquímica. En los tumores, las mutaciones de p53 ocurren en puntos calientes del gen y la inactivan, debilitando su actividad protectora. Ciertas mutaciones parecen conferir un efecto oncogénico. No se encontraron correlaciones directas entre mutaciones de p53 y de los cánceres de mama hereditarios (20). En el cáncer esporádico, la proporción de tumores que expresan p53 mutado aumenta con la progresión y el grado, este aumento se asocia con disminución del tiempo de supervivencia total o libre de la enfermedad (21), pero los datos de estudios de pronóstico son confusos.

Se han descrito mutaciones oncogénicas en otros genes pero se detectaron en una pequeña fracción de los cánceres esporádicos sin asociaciones claras. Algunos ejemplos incluyen la proteína del ciclo celular c-myc (22), las mutaciones de ras (23) y sobreexpresión de ciclina D1 (24).

Factores ambientales:

Dentro de los factores de riesgo ambientales se encuentran la dieta, determinantes socio-culturales y la exposición a radiaciones ionizantes, que está directamente relacionada a mutaciones en genes supresores. Respecto a la dieta, la mayoría de los estudios muestran que la obesidad está asociada con el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (25). Las xenohormonas, productos con actividad hormonal no presentes en el reino animal, han sido foco de atención el los últimos años. Se han encontrado productos con actividad estrogénica en, selladores dentales plásticos de mamaderas, plásticos de material para cultivo de tejidos, etc., que podrían tener un efecto negativo sobre la glándula mamaria (26). Por otro lado, se ha sugerido que el consumo de vegetales como la soja, rica en fitoestrógenos, podría contribuir a la baja incidencia de cáncer de mama, colon y próstata observada en países como China y Japón. Estos compuestos son un grupo químicamente diverso, sintetizado por las plantas y que pueden tener un efecto estrogénico en animales, y de los cuales se han reportado efectos tumorigénicos y protectores. Existe una correlación negativa entre incidencia de cáncer de mama y dietas ricas en fitoestrógenos de algunas poblaciones asiáticas (27). En estudios de carcinogénesis, los isoflavonoides de la soja demostraron tener un efecto protector en el 65 % de los estudios y en ningún caso se observaron aumentos de la incidencia tumoral (28). Uno de los fitoestrógenos más abundantes en los granos de soja es la genisteína, que posee débil actividad estrogénica demostrada en algunos modelos animales (28). La genisteína también es un inhibidor específico de tirosina quinasa, topoisomerasa II y otras enzimas críticas para la transducción de señales (28). Se ha informado que los fitoestrógenos tienen efecto estrogénico a concentraciones bajas (27) y en concentraciones mayores, similares a las alcanzadas en una dieta rica en soja, se comportan como fuertes agentes citotóxicos, aún en células que no expresan receptores de estrógeno como las HeLa. Estas evidencias indicarían que, en el mecanismo de acción de los fitoestrógenos, el balance riesgo/protección dependería de la cantidad consumida (27).

Los factores socio-culturales explicarían las importantes diferencias en la incidencia de cáncer de mama en los distintos países (29). Las tasas de incidencia son seis veces más altas en los EE.UU., Canadá o el Norte de Europa que en Asia o África negra. Estas diferencias no parecen estar determinadas por distinta susceptibilidad genética ya que la incidencia de cáncer de mama de las norteamericanas negras y blancas es muy similar (60.1 y 62.3 casos por 100000 respectivamente), y a su vez diferente de las mujeres negras africanas nativas (3 casos por 100000) (8). Por último, la exposición a radiaciones ionizantes puede aumentar significativamente el riesgo de cáncer de mama especialmente si ocurre entre la pubertad y los 30 años (8).

Factores hormonales:

Se ha demostrado que las hormonas ováricas cumplen un papel fundamental en el cáncer de mama humano. Estudios realizados en la población femenina mundial, han implicado a los estrógenos como los responsables en distintas etapas de la transformación (30;31). A continuación se enumeran los factores de riesgo que se asocian a incrementos de, o a mayor exposición a hormonas ováricas, y a su vez a mayor incidencia de cáncer de mama:

- a. Menarca temprana.
- b. Menopausia tardía.
- c. Primer embarazo tardío.
- d. Dar a luz sin amamantamiento posterior o períodos de amamantamiento cortos.
- e. Nuliparidad y/o alteraciones en la ovulación.
- f. Obesidad en mujeres post-menopáusicas.
- g. Dietas ricas en grasas y proteínas.
- h. Tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos.

El efecto protector de una menopausia temprana así como también una menarca tardía demuestra que la exposición durante los ciclos menstruales normales a estradiol y/o progesterona aumenta el riesgo de incidencia de cáncer de mama, probablemente debido a que las hormonas ováricas estimularían directa o indirectamente la proliferación celular de las células mamarias. La glándula mamaria posee desde el nacimiento una enorme cantidad de células pluripotenciales. La lactancias completas inducen sucesivos ciclos de diferenciación, y con ellos, una disminución de la población de las posibles células blanco de carcinógenos.

El efecto protector de la lactancia está ausente en las nulíparas, y parcialmente en las pacientes con embarazos tardíos, en las cuales el teórico carcinógeno ha tenido más tiempo para actuar. Los tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos se relacionan también con el aumento de incidencia de la enfermedad. Todos estos factores inducen un aumento de la proliferación celular e inducirían también un aumento de células madre no diferenciadas (32). La obesidad durante la post-menopausia y el consumo de dietas ricas en grasas y proteínas aumentan el riesgo de contraer la enfermedad. Esto estaría asociado a los altos niveles de estrógenos circulantes formados a partir de la aromatización de la androstenediona en el tejido adiposo (33;34).

Durante años se postuló que los efectos proliferativos de los estrógenos y diferenciadores de la progesterona (Pg) en el útero eran extrapolables a la glándula mamaria. En los últimos 10 años han surgido, sin embargo, numerosas evidencias epidemiológicas (35-39) que se han sumado a las experimentales (40-53) (54) que apuntan a un papel protagonista de los progestágenos en el cáncer de mama.

Especialmente dramática fue la comunicación de la Woman's Health Initiative Group (WHI) (55) en mayo de este año (2002) en la que se decide suspender un ensayo clínico en el cual se trató a un grupo de mujeres post-menopáusicas con útero intacto con 2.5 mg acetato de medroxiprogesterona (MPA) y 0.625 mg de estrógenos conjugados durante una media de 5.2 años. Un grupo similar, de mujeres histerectomizadas se trató exclusivamente con estrógenos. Si bien se encontraron incrementos en la incidencia de enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares y trombosis, la razón por la cual se suspende el ensayo es el aumento de incidencia de cáncer de mama invasor en el grupo tratado con estrógenos + MPA, pero no en el grupo tratado con estrógenos solamente. El aumento se observó a lo largo de todos los grupos étnicos y estratos de edad. Por lo tanto, el ensayo de WHI es el primero de este tipo randomizado y controlado que confirma que la terapia de reemplazo con estrógenos + MPA aumenta el riesgo de incidencia de cáncer de mama invasor (55). Estos datos exceden los epidemiológicos reportados previamente, donde se había informado un aumento del 15 % para el mismo tipo de tratamiento durante los primeros 5 años y de 53 % luego de más de cinco años. Cabe destacar que otros estudios, si bien no de esta magnitud habían informado que la terapia de estrógenos + Pg estaría asociada a un aumento de la incidencia del cáncer de mama mayor que con estrógenos solamente (36;38;56).

3. ESTRUCTURA NORMAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA

La glándula mamaria es un sistema de 15-20 conductos que convergen en el pezón, se arborizan dentro de la masa adiposa de la mama y terminan en miles de pequeñas unidades secretoras llamadas unidades terminales túbulo-alveolares (*terminal duct lobular units*: TDLU). En la Figura 1-1 se muestra un esquema de la glándula mamaria normal. El estroma está compuesto de células mesenquimáticas de aspecto fibroblástico altamente especializadas que sintetizan y mantienen la matriz extracelular, además de una heterogénea población de elementos celulares como polimorfonucleares, linfocitos, plasmocitos y mastocitos, entre otras. Las células estromales de la mama secretan y/o activan citoquinas y factores de crecimiento componentes de la matriz, todos los cuales influyen el crecimiento y diferenciación del compartimiento epitelial. Cada conducto está formado por una capa interna de células cuboides epiteliales rodeada de una capa basal de células mioepiteliales (células especializadas con características epiteliales y mesenquimáticas) que secretan parte de la membrana basal de las unidades secretoras, y tienen influencias importantes en la funcionalidad y desarrollo de la glándula (57). Ambos tipos celulares parecen derivar de una célula progenitora común. Las unidades acinares pueden agrandarse y multiplicarse bajo estimulación hormonal (Ej. lactancia) o en la neoplasia, dando origen a espacios de mayor diámetro, de calibre similar al de los conductos. Se acepta actualmente que los carcinomas ductales y lobulillares se originan en la unidad terminal túbulo-alveolar TDLU (58).

Las células epiteliales y algunas de las estromales de la mama responden a las hormonas femeninas, particularmente estrógenos, Pg y prolactina (PRL), y expresan los correspondientes receptores. Los andrógenos causan la atrofia de estas células. Las células neoplásicas también pueden expresar receptores hormonales y con la terapia hormonal se intenta modificar el crecimiento de estos tumores. El nivel de exposición a los estrógenos puede afectar el desarrollo del tumor.

4. HISTOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN

El carcinoma de mama, como otros carcinomas, es inicialmente una enfermedad local que se extiende luego por vía linfática a los ganglios vecinos, para diseminarse a partir de allí, por vía hemática a otros órganos (8). Se pueden distinguir dos tipos fundamentales:

A. No invasores: El carcinoma *in situ* de la glándula mamaria se caracteriza por la proliferación de células malignas dentro de los conductos (carcinoma ductal *in situ*) y lobulillos (carcinoma lobulillar *in situ*) sin invasión del estroma adyacente.

B. Invasores: Constituyen un grupo de lesiones histológicamente heterogéneas. Los de tipo ductal son los más frecuentes (75 % de los carcinomas de mama) y en general metastatizan en los ganglios linfáticos axilares, hueso, pulmón, hígado y cerebro. Los carcinomas invasores lobulillares son menos frecuentes (5-10 % de los carcinomas de mama) y, por lo general, están compuestos por pequeñas células que se organizan en fila alrededor de conductos y lobulillos. Los sitios más frecuentes de metástasis son los ganglios linfáticos axilares y las superficies serosas y meníngeas. Además, existen otros tipos especiales de carcinomas de mama invasores mucho menos frecuentes como el tubular, el medular y el mucinoso (8).

5. GRADUACIÓN DE LOS TUMORES

En un intento por proveer una elección del tratamiento y predicción del comportamiento, se han utilizado los sistemas de graduación. Usualmente se utiliza es sistema de gradación de Bloom y Richardson (59) que emplea dos o tres parámetros, de los cuales el principal es el grado nuclear. Este tiene en cuenta el tamaño y forma del núcleo, apariencia nucleolar y distribución y densidad de la cromatina. El otro criterio es la presencia o ausencia de necrosis central y su tamaño, y el grado de organización de las células y su núcleo, en particular si están alineadas entre ellas y con la membrana basal (polarización). Sin embargo estos criterios siguen teniendo cierto grado de subjetividad y cuando el grado es intermedio se superpone tanto con lesiones de alto o bajo grado. Si bien se acepta que la mayoría de los patólogos entrenados y con consenso previo pueden alcanzar un buen nivel de acuerdo, no se ha adoptado aún un sistema universal, en parte porque hay resultados diferentes en los análisis basados en pequeños subgrupos, o donde parámetros tales como la extensión de la lesión no han sido tomados en cuenta. Durante años se ha tratado de buscar marcadores moleculares que puedan ser cuantificados “objetivamente” y que se relacionen directamente con pronóstico, respuesta al tratamiento, recurrencias, etc., pero muy pocos hasta el momento, con excepción de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), tienen utilidad en la práctica diaria. Uno de ellos

es el c-erbB-2, cuya determinación se utiliza para poder elegir pacientes con posibilidades de responder al Trastuzumab (60).

6. BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

En el cáncer de mama se postulan distintos momentos evolutivos o etapas biológicas. La expresión clínica de estas etapas se caracteriza por un incremento progresivo de la agresividad que se asocia a características histológicas y patrones biológicos específicos: lesiones preneoplásicas y lesiones invasoras hormono-dependientes y hormono-independientes, estas últimas son en general expresión de progresión y diseminación. Los mecanismos que disparan la progresión a través de las distintas etapas y que culminan con la adquisición de un crecimiento autónomo (hormono-independiente) se desconocen, pero su estudio es de fundamental importancia. Según el estadio en que se encuentra el tumor en el momento del diagnóstico será el tratamiento elegido. En la clínica se predice el grado de dependencia hormonal evaluando la presencia de receptores hormonales.

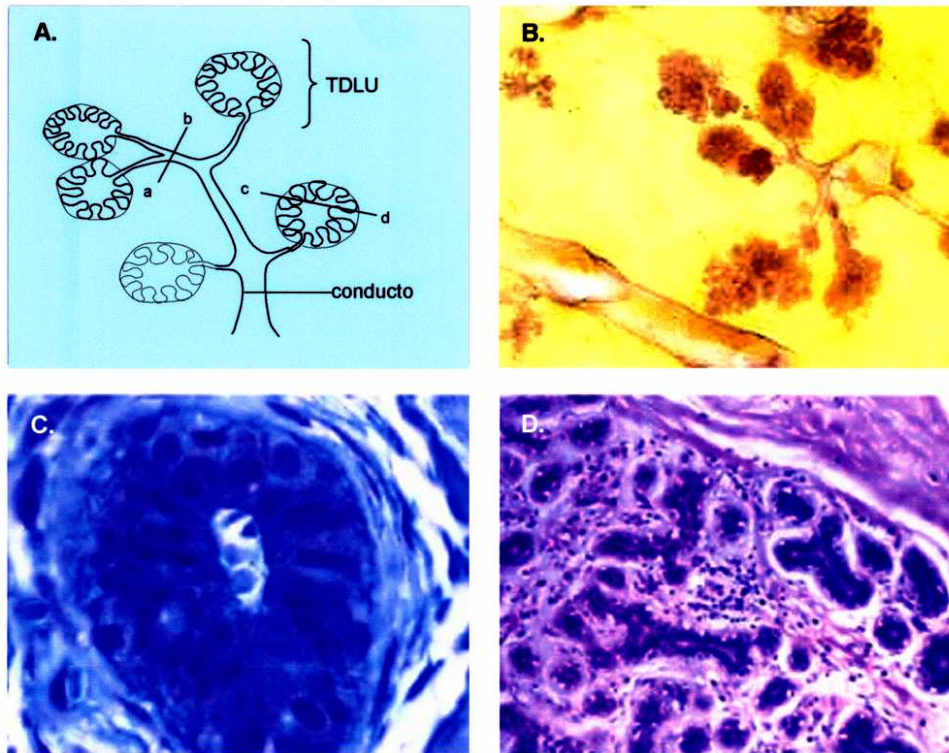
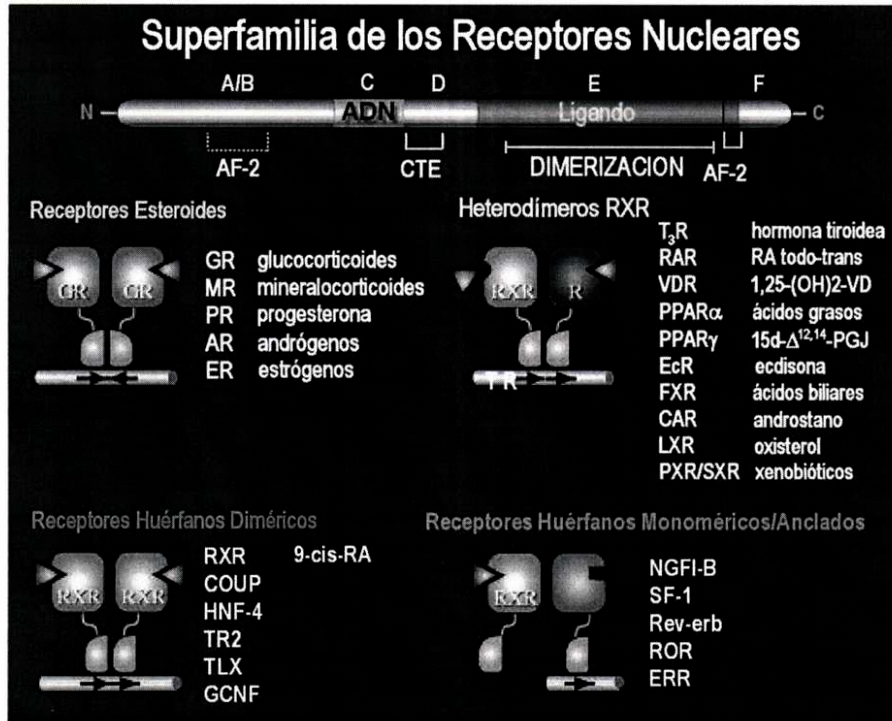


Figura 1-1: Glándula mamaria humana. A. Esquema de los conductos terminales que se ramifican formando en su extremo terminal las unidades secretorias o TDLU. B. Corte longitudinal de un a ramificación terminal con TDLUs. C. Corte transversal (a-b) de un conducto formado de una capa de células epiteliales luminales alineadas, rodeadas de una capa basal de células mioepiteliales. D. Corte transversal (c-d) de un lobulillo o unidad secretoria.

III. RECEPTORES HORMONALES

En la clínica, se utiliza la identificación de RE y de RP para elegir a los pacientes que podrían responder a la terapia hormonal con tamoxifeno. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y se incluyen dentro de la subfamilia de receptores esteroides (Figura 1-2) a la que también pertenecen entre otros, los de andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM). Los receptores esteroides son factores de transcripción que existen como apoproteínas inactivas formando parte de complejos multiproteicos que se encuentran en el citoplasma y/o en el núcleo (61). Al unirse la hormona, se activan a través de una “transformación” que involucra fosforilación, cambio de conformación y liberación de proteínas de *shock* térmico (*heat shock proteins*: hsp. Ej.: hsp 70 y hsp 90). En algunos casos su activación/dimerización inducida por la unión de ligando no es necesaria para su actividad biológica, por ejemplo monómeros de los receptores RXR y de hormona tiroidea son capaces de silenciar la actividad transcripcional basal (Figura 1-2). En ausencia de ligando, los RA y los RG se encontrarían fundamentalmente en el citoplasma mientras que los RP y RE estarían en el núcleo (62). Los primeros estudios sobre localización de los receptores esteroides indicaban que difundían libremente al citoplasma y eran reclutados al núcleo activamente (63). Más recientemente, se ha demostrado en el caso del RG y RP que su liberación de la matriz nuclear es dependiente de ATP (64). Los receptores activados se dimerizan y se unen al ADN en secuencias consenso llamadas elemento respondedor de hormonas (*hormone responsive element*: HRE). El HRE consiste en una secuencia invertida separada por tres nucleótidos. Los RP, RG, RA y RM se unen todos a la misma secuencia (AGAACA_nnnTGTTCT), mientras que los RE se unen a AGGTC_nnnTGACCT (61). Una vez unido a estas regiones del ADN, el dímero de receptor facilita la formación del complejo de preiniciación reclutando factores co-activadores y/o represores, para de esta forma activar o disminuir la transcripción de ciertos genes (62). Ocasionalmente, las hormonas esteroides también regulan negativamente la expresión de genes afectando la estabilidad del ARNm y la eficiencia de la traducción (61).



Olefsky, 2001

Figura 1-2: Organización estructural y funcional de los receptores nucleares. Los cinco dominios (A-F) abarcan regiones conservadas en cuanto a secuencia y función. Todos los receptores nucleares contienen un dominio de unión al ADN (DBD), que es el dominio más conservado. El dominio de unión al ligando (LBD) se encuentra en la región C-terminal. Las regiones más variables son la N-terminal (A/B) y la cola C-terminal (F). Muchos miembros de la familia de receptores nucleares forman homo o heterodímeros y las secuencias importantes para esta función se encuentran dentro del DBD y LBD.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de los receptores esteroides indica que su estructura puede ser dividida en varios dominios modulares (Figura 1-3). La longitud y secuencia del dominio N-terminal A/B es altamente variable entre los distintos receptores. Generalmente en este dominio se localiza una función de transactivación (*activation function*: AF), que activa a los genes blanco presumiblemente interactuando con otras proteínas de la maquinaria transcripcional (citado en 61;65;66). La región C contiene dos dedos de zinc del tipo II, que son los responsables de la dimerización y reconocimiento de los HREs en el ADN, a este dominio se lo llama de unión al ADN (*DNA binding domain*: DBD) (61). En la región D se encuentra una secuencia variable llamada región bisagra (*hinge*), que confiere a la proteína la posibilidad de plegarse y sufrir cambios conformacionales. En esta región generalmente se encuentra la secuencia de localización nuclear (RG y RP). El dominio de unión al ligando (*ligand binding domain*: LBD), se halla hacia la parte C-terminal de la región D (región E). Este dominio es relativamente largo (aprox. 250 aa), complejo y contiene además regiones necesarias para la localización nuclear, dimerización, transactivación, y la interacción con hsp, (61). Finalmente, localizada en el extremo C-terminal se encuentra la región F, de función desconocida.

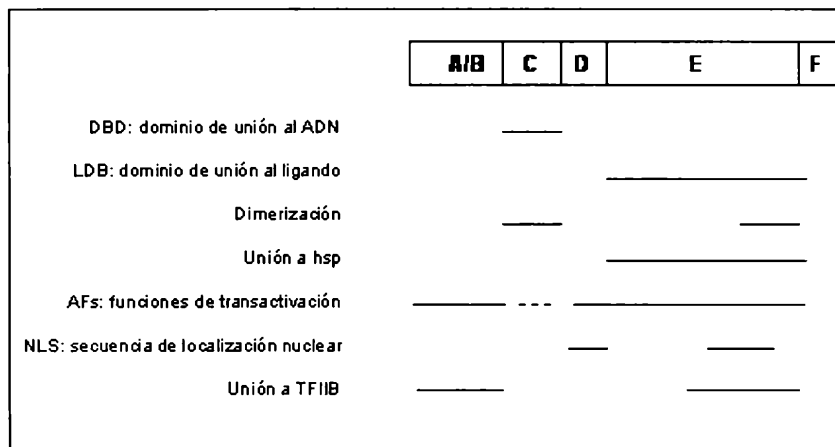


Figura 1-3: Dominios funcionales de los receptores esteroides. La estructura de los receptores esteroides se puede dividir en seis dominios: A, B, C, D, E y F. La función de cada dominio está indicada por las líneas sólidas. Copiado de Tsai *et al*, 1994.

RECEPTOR DE PROGESTERONA

Se conocen dos isoformas del RP que son codificadas por el mismo gen: RP_A y RP_B (67). Ambas isoformas se dimerizan y pueden unirse al ADN como homodímeros RP_A / RP_A y RP_B / RP_B o como heterodímeros RP_A / RP_B (68). El peso molecular (PM) de cada isoforma difiere según la especie, pero como regla general RP_A es más liviana y su secuencia más corta que RP_B . Por ejemplo, el PM de RP_B en la especie humana (hRP_B) varía entre 116 y 120 kDa mientras que hRP_A oscila entre 79 y 94 kDa, encontrándose truncada en su extremo N-terminal (68). En aves, cRP_B tiene un PM de 117 kDa y cRP_A de 79 kDa; en conejos rRP_B de 110 kDa y rRP_A 79 kDa (69). En roedores, el PM de RP_B y RP_A es 115 y 83 kDa respectivamente (67). Ambas isoformas se expresan en cantidades equimolares en aves y humanos, pero en roedores RP_A es la isoforma predominante (67;70). En aves, ambas proteínas son sintetizadas por traducción alternativa de un único ARNm (71); en humanos y ratón a partir de dos ARNm distintos que se sintetizan por transcripción alternativa a partir de dos promotores (72;73). EL estudio de la secuencia del ADN copia (ADNc) del RP humano permitió definir otro sitio de iniciación de la traducción, río abajo del sitio de iniciación de la traducción de RP_A . La nueva isoforma identificada truncada en su extremo N-terminal sólo abarca el segundo dedo de zinc del DBD, secuencias de localización nuclear, dimerización y el LBD (74). Esta tercer isoforma de 56 kDa se ha llamado RP_C y si bien se postula que tiene una función inhibitoria de la actividad de las otras dos, no se le ha dado una importancia significativa durante los últimos años.

La activación del RP involucra cambios estructurales a nivel proteico. Los dímeros de RP activados forman complejos multiproteicos con co-reguladores que proveen un soporte enzimático para la regulación de la transcripción. Los co-reguladores (Ej. proteínas de la familia SRC) influyen la remodelación de la cromatina por acetilación/deacetilación y metilación de histonas (75). Más aún, se cree que estas proteínas co-regulatorias se unen diferencialmente a distintos receptores esteroides y que funcionan de una manera combinatoria o secuencial para controlar la transcripción (76). La unión de ambas isoformas al ADN induce plegamientos en la estructura cromatínica, siendo RP_B la que induce un plegamiento mayor (77).

Dentro de la secuencia del RP se han descrito distintas funciones aparte de las enunciadas anteriormente y que serían responsables de la actividad diferencial de las isoformas. Por ejemplo, hRP_B posee en

su región N-terminal otro dominio de transactivación llamado AF-3 (62). En ambas isoformas se encuentra una función autoinhibitoria (*Inhibitory function*: IF) localizada en el dominio A/B (aa: 165-456; Figura 1-4) (78-80). La isoforma RP_B tendría un dominio en su extremo N-terminal que inactiva al IF, mientras que RP_A al ser más corta carece del mismo y por lo tanto es susceptible a la inhibición por su propia IF. También poseen una secuencia de sumoilización (SU) (aa: 387-391), que también sería la responsable de la actividad autoinhibitoria y transpresora de la isoforma RP_A respecto de la RP_B, observada bajo algunas condiciones (81).

La mayoría de los receptores esteroides (RP, RG, RE) son fosforilados post-traduccionalmente. El proceso de fosforilación-desfosforilación sería un mecanismo de regulación de la activación, unión a la hormona, unión al ADN y transactivación (82). En experimentos realizados con tejido de oviductos de pollo, se detectaron cuatro sitios de fosforilación en serina (Ser²¹¹, Ser²⁶⁰, Ser³⁶⁷, Ser⁵³⁰) en la región común a RP_A y RP_B. Tres de los sitios de fosforilación se encuentran en la región N-terminal (importante para la activación transcripcional) mientras que el cuarto sitio se encuentra en la región bisagra (Citado en (83)). Los RP se encuentran fosforilados aún en un estado basal de la célula y en presencia del ligando se hiperfosforilan. Aún no se conoce la función de la fosforilación y podría estar asociada a la liberación de hsp, dimerización, unión al ADN y regulación del estado funcional del receptor mientras se encuentra unido a la maquinaria de transcripción (84). La fosforilación cumpliría un papel fundamental en la activación de los receptores esteroides ya que se observó que muchos de ellos pueden ser activados en ausencia de hormona, por estimulación de vías de fosforilación (quinasas dependientes de ciclinas, MAP quinasas y quinasas dependientes de estrés). La activación de algunas de estas vías, como por ejemplo la de PKA, pueden alterar la respuesta a ciertos antagonistas como ocurre con el RU 38486, que en presencia de niveles altos de AMPc se comporta como agonista del RP (85).

Existen numerosas evidencias de la existencia de una conversación cruzada entre la vía del RP y otras vías de transducción de señales (62). Por ejemplo, el neurotransmisor dopamina tiene efecto sobre el comportamiento reproductivo de ratones hembra vía una conversación cruzada entre su receptor de membrana y el RP intracelular (86). Los niveles de fosforilación del RP aumentan en células T-47D que sobreexpresan MEK1, y este fenómeno concuerda con un aumento de la transcripción de un gen reportero y la posterior degradación del receptor. Estos experimentos sugieren una conversación cruzada entre el RP y las vías de señalización de factores de crecimiento en células de cáncer de mama, donde el RP sería fosforilado por

MAPK (87). La activación de la vía de PKA aumenta la actividad transcripcional del RP_B en células T-47D (88) y en aves activa la transcripción dependiente de RP por activación del coactivador SRC-1 (89). También se ha descrito comunicación cruzada entre RP_A y RE o RP_A y RG, donde la primera inhibe la actividad transcripcional de las segundas, probablemente por una competencia entre factores (84;90).

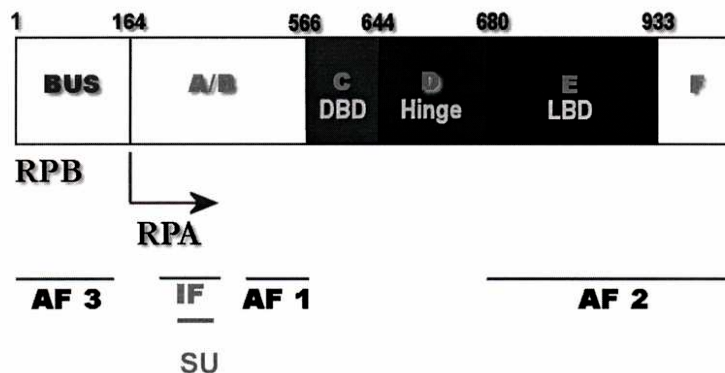


Figura 1-4: Modelo del receptor de progesterona humano mostrando el sitio de iniciación de la traducción de RP_B y de RP_A . BUS (B upstream sequence): segmento exclusivo de la isoforma RP_B ; DBD: dominio de unión al ADN; H: región bisagra; LBD: dominio de unión al ligando; Hinge: secuencia de localización nuclear y región bisagra; AF: secuencias de transactivación, AF1 es ligando independiente, AF2 ligando dependiente y AF3 ligando dependiente específica de RP_B . IF: función inhibitoria, sólo activa en la isoforma RP_A . SU: región de sumoilización

ACCIONES NO GENÓMICAS DE LA PROGESTERONA - RECEPTORES DE PROGESTERONA DE MEMBRANA

Desde hace más de 30 años, existen evidencias que sugieren efectos proliferativos y electrofisiológicos de los esteroides que ocurren muy rápido y podrían estar mediados por una señal a nivel de la membrana plasmática. Existen diversos sistemas en la naturaleza donde los esteroides ejercen efectos no genómicos

mediados por otros receptores. Entre ellos se encuentra la modulación GABAérgica por neuroesteroides (como Pg) (91), o la liberación de calcio inducida por Pg en la reacción acrosomal de espermatozoides de mamíferos en los que no se ha identificado al RP nuclear clásico (92). Además, estos efectos no son enantio-selectivos, son necesarias altas concentraciones de hormona para lograr un efecto (10^6 M) y en muchos casos no se bloquean con antiprogéstágenos/antagonistas como el RU 38486. Estos datos llevan a pensar que en estos sistemas existen otras proteínas capaces de unir Pg que no pueden ser asociadas a los receptores nucleares clásicos.

Los efectos no genómicos de la Pg también se han descrito en células de la granulosa, donde el aumento de la entrada de calcio durante los primeros 5 segundos ocurre a concentraciones de 0.1 pM-1 nM, siendo este efecto mediado por una proteína G (93). Las evidencias indican que existe un RP de membrana, pero que sería diferente al RP clásico conocido. En extractos de membranas de cerebro de ratón se encontraron proteínas de 29-64 kDa que unen Pg (94). En membranas de hepatocitos de rata se han descrito dos sitios capaces de unir Pg, uno con Kd 9.5 nM y otro 50.7 nM (95), mientras que en microsomas de hepatocitos porcinos se han identificado dos sitios pero de Kd 11 y 286 nM, además de dos proteínas, una de 28 y otra de 56 Kda (96).

Los efectos no genómicos de la Pg también se observan en otros niveles de la escala evolutiva como en la maduración de ovocitos de *Xenopus laevis*, donde la Pg también ejerce una acción no genómica y enantio-selectiva. Masui *et al* demostraron inyectando el esteroide dentro del ovocito que no se inducía la maduración, pero sí incubándolo en un medio con Pg (citado en (97)), indicando que el efecto se ejercía desde afuera por unión a un receptor en la membrana. Estos datos fueron confirmados induciendo la maduración con Pg unida a BSA (citado en (97)) y en ovocitos enucleados o tratados con actinomicina D donde no es posible un efecto genómico (citado en (97)). Si bien se ha reportado que el RP clásico asociado a la membrana plasmática sería el responsable de la maduración de los ovocitos (98;99), estos resultados no son del todo convincentes puesto que la EC_{50} necesaria para lograr la maduración es de alrededor de 200 nM, o sea unos dos órdenes de magnitud mayor que la del RP clásico (97).

RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

El RE existe como dos isoformas distintas cada una localizada en genes separados y en distintos cromosomas (100). El primero en describirse fue el RE α con PM de 67 kDa (101), pero los efectos de los estrógenos sobre tejidos y células de ratones *knock-out* del RE α (alfa-ERKO) indicaban que debía existir otro receptor capaz de unírseles. Recientemente se ha clonado de próstata de rata el RE β con un PM de 54 kDa (102). Los RE comparten un 96 % de homología en el DBD y 59 % en el LBD (Figura 1-5). Se han descrito numerosas variantes de cada tipo de receptor, que son productos del corte y procesamiento alternativo de cada uno de los ARN (citado en (103)). Ambos receptores comparten una relación entre ellos similar a la que existe entre el RG y RM o RG y RP, que muestran homología entre sus dominios de unión al ADN y al ligando similares a las compartidas entre RE α y RE β . Los dos tipos de RE se expresan ampliamente en varios tejidos. En el humano, el RE β se expresa en tejido nervioso, aparato cardiovascular, sistema inmune, tracto urogenital, tracto digestivo, riñones y pulmones (104). RE α se encuentra mayormente expresado en glándula mamaria y útero si bien RE β también se expresa, aunque en menor proporción (RE α /RE β : 9/1) (105).

La distribución diferencial de ambos receptores correlaciona con respuestas biológicas diferentes. En la glándula mamaria de roedores, durante la fase más proliferativa (inicio de la preñez) hay baja expresión de RE α y alta de RE β (Shigehira S et al; 1999). De hecho, esta última se mantiene constante y es la forma predominante en la mama normal y tumores benignos. La situación opuesta (RE α >RE β) parece característica del cáncer de mama aunque este concepto todavía no está bien establecido debido a la escasa información que existe concerniente a RE β (105). Todos estos resultados llevan a inferir que el RE β podría tener un papel protector de la carcinogénesis (104), pero también existen evidencias que contradicen esta afirmación. En un muestreo piloto sobre 240 tumores de mama Fuqua *et al* (citado en Tilley et al; 2001) evaluaron la proporción relativa de RE α y RE β . Si bien una alta proporción coexpresa ambos receptores, RE α está más asociado con la expresión de RP y correlacionó positivamente con parámetros biológicos indicativos de buen pronóstico como bajo grado y diploidía. En contraste, RE β se correlacionó con un pronóstico menos favorable y aneuploidía, especialmente en ausencia de RE α . Coincidiendo con estos resultados, Murphy *et al* informaron que los tumores con mejor pronóstico tienden a expresar una mayor proporción de RE α (citado en Tilley 2001).

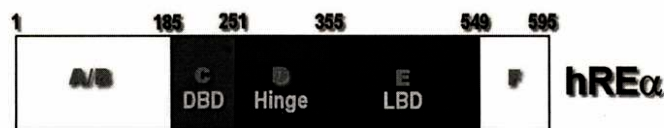


Figura 1-5: Receptores de estrógeno humanos. DBD: dominio de unión al ADN; Hinge: región visagra; LBD: ligand binding domain. Los números indican la homología entre los receptores en cada dominio.

El RE ha sido el foco de interés en el estudio del cáncer de mama, debido a la asociación entre su expresión y la respuesta favorable a la terapia endocrina (106). La terapia más ampliamente usada es el tratamiento con el antiestrógeno tamoxifeno, lo que indicaría la importancia del RE en el cáncer de mama. Desde hace más de 25 años se evalúa la expresión de RE, siendo éste un buen marcador de sensibilidad a hormonas en la mama (103). En la clínica dichos estudios se realizaban por técnicas de unión del radioligando al receptor y más recientemente con técnicas de inmunohistoquímica. Estas dos metodologías no discriminan entre una u otra isoforma ya que RE α y RE β tienen igual afinidad por el 17- β -estradiol (E $_2$) y la mayoría de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica son policlonales producidos con RE purificado, generados antes de la descripción del RE β . Como se ha descrito en el párrafo anterior, sería de suma importancia reevaluar los resultados informados hasta el año 1996 (previos a la descripción del RE β) y discriminar cual de las dos isoformas es la indicadora de buen pronóstico. Alrededor de 2/3 de los pacientes con tumores que expresan RE α responden favorablemente al tamoxifeno y otras terapias endocrinas. Pero aún los cánceres de mama respondedores parecen seguir un patrón predecible de progresión hacia un fenotipo más maligno y resistente a la terapia hormonal. Sin embargo, las células que adquieren este fenotipo frecuentemente conservan la expresión de RE y RP (106). La resistencia a la terapia hormonal puede desarrollarse debido a

cambios a nivel del RE mismo o vías de señalización pre y/o post receptor. Se han propuesto al menos cuatro posibles mecanismos para la adquisición de resistencia a la terapia hormonal (107):

- 1) Pérdida o mutación de RE.
- 2) Alteraciones de los niveles de otros mensajeros (AMPC) o activación de cascadas de fosforilación (MAPK), o cambios en los niveles de co-reguladores (CBP/p300, SRC-1) y co-represores (N-cor/SMRT) que influyen la actividad transcripcional del RE.
- 3) Cambios en la sensibilidad/producción a/de factores de crecimiento, o interacciones paracrina.
- 4) Incorporación y retención alterada del antiestrógeno, o metabolismo de la droga.

La idea de deleciones/mutaciones en el RE resulta, por su simpleza, la hipótesis más atractiva para explicar la resistencia a la terapia hormonal. Durante años se ha invertido mucha energía en buscar variantes del RE a nivel de ARNm y proteína. De hecho se han descrito numerosos productos generados por corte y procesamiento alternativo del ARNm de RE α y últimamente de RE β (108-110), pero en la mayoría de los casos estos productos se encuentran en el tejido normal o no correlacionan con mayor grado tumoral o resistencia al tamoxifeno. Estos datos llevan a un debate sobre la malignidad de estas variantes y su papel en la adquisición de hormono-independencia y resistencia hormonal (103;111). Paralelamente, se ha tratado de correlacionar la expresión de formas anormales (truncadas, mutadas) del RE con el cáncer de mama y con la resistencia a la terapia endocrina (103;111;112), pero hasta el momento nada se ha podido concluir de estos estudios.

Recientemente, se han descrito sitios receptores para estrógeno en membranas celulares de útero de conejo (113) así como también de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano (114). Estos receptores tendrían una estructura similar a la del RE α clásico puesto que son reconocidos por los mismos anticuerpos. Un pequeño porcentaje de la unión del ligando total (5-10 %, (115)) correspondería a estos receptores de membrana. En células T-47D se demostró una interacción del RE α y RP β a nivel de membrana (116) dónde los autores postulan una conversación cruzada entre las vías del RE y RP.

IV. PROGESTERONA EN LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL

El desarrollo de la glándula mamaria normal continúa luego del nacimiento y en una forma discontinua. En todas las especies, las glándulas están compuestas de varios tipos celulares que proliferan en respuesta a diversos estímulos, pero el epitelio es blanco para la proliferación y diferenciación. Los patrones de crecimiento, así como la generación de varias de las estructuras morfológicas importantes son similares en la glándula mamaria humana y murina (117). La proliferación y diferenciación de la glándula mamaria se inducen principalmente por estrógeno y Pg. La mayoría del desarrollo mamario acompaña a la pubertad y la preñez, que son los dos estados fisiológicos bien definidos en los que estrógeno y Pg son las hormonas dominantes. Durante la pubertad, el crecimiento epitelial es ductal con un patrón de ramificación que asemeja a un árbol (Figura 1-6, estadio de brote alveolar) y cuando las glándulas se completan (estadio alveolar), se vuelven quiescentes excepto por períodos cortos durante el ciclo de ovulación. Durante el inicio de la preñez y bajo influencia de la Pg, las células epiteliales comienzan a proliferar resultando en más ramificaciones y crecimiento lóbulo-alveolar (Figura 1-6, lóbulos de tipo 2 y 3) (118;119). Este tipo de crecimiento representa un estado de la glándula mamaria diferenciado desde el punto de vista morfológico y es durante la lactancia que la glándula se diferencia completamente y adquiere su funcionalidad.

Otra hormona que juega un papel muy importante en el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria es la prolactina (PRL). Interviene en el desarrollo lóbulo-alveolar y proliferación de las células epiteliales alveolares que ocurre durante la preñez. Por otro lado, el crecimiento cíclico de la glándula madura durante el ciclo estral requiere de PRL para mantener la sensibilidad de las células epiteliales a estrógeno y Pg. Si bien su papel en este caso no sería mitogénico sino que tendría un a función permisiva (120).

EL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y SUS ISOFORMAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL

En la glándula mamaria la síntesis del RP está bajo control del RE pero, por otro lado, la Pg antagoniza la acción de los estrógenos regulando negativamente la expresión del RP (73). Como cada una de estas dos hormonas regula las actividades de la otra, su impacto individual ha sido poco claro. Durante los últimos años, con el desarrollo de los ratones *knock-out* del gen del RE α y RP (RP_A y RP_B) (alfaERKO y PRKO), el papel

DESARROLLO DE LA GLANDULA MAMARIA

Modificado de J Russo et al, 1982

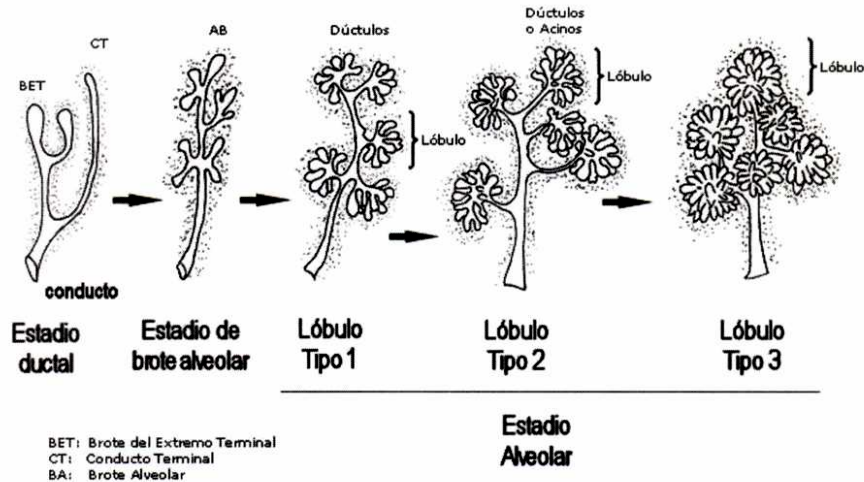


Figura 1-6: Representación esquemática del desarrollo de la mama de ratón. La mama inmadura está formada por conductos que terminan en los brotes terminales (BET), o conductos terminales (CT). Al inicio de la pubertad, los conductos crecen y se dividen con un patrón que asemeja a un árbol, a partir de los BET se desarrollan los brotes alveolares (estadio de brote alveolar) que siguen creciendo hasta alcanzar una estructura de lóbulo tipo 1 en el estadio alveolar. El número y tipo de lóbulos aumenta con la edad y las sucesivas preñeces alcanzando los estadios alveolares de lóbulo tipo 2 y 3.

relativo de estos receptores se ha vuelto más claro. En los ratones alfaERKO se observan alteraciones graves de la morfogénesis ductal (121). En los PRKO el crecimiento ductal acompaña a la pubertad y no se observan alteraciones en la morfogénesis (122;117), pero no hay crecimiento ductal lateral (*branching*) y desarrollo lóbulo-alveolar durante la preñez (122). Por lo tanto, en la morfogénesis de la glándula mamaria, el RE α tendría un papel importante durante la pubertad y el RP sería necesario para la generación de estructuras lóbulo-alveolares que ocurren durante la preñez. Estos resultados indican que, si bien las dos hormonas tienen efectos proliferativos, sólo la Pg está asociada a la diferenciación lóbulo-alveolar. La importancia de estos resultados radica en que la diferenciación no solo está asociada a la adquisición de funcionalidad, por ejemplo la producción de leche durante la lactancia, sino en que la falta de diferenciación sumada a la proliferación de células del epitelio mamario es un factor de riesgo importante en la carcinogénesis.

Durante la etapa adulta no todas las células de los conductos expresan RP (117). Dentro del mismo conducto se encuentran células RP positivas y negativas que pueden estar adyacentes, y no se detecta RP en el estroma (123).

La regulación de la expresión de isoformas del RP es crítica para el desarrollo mamario normal. En roedores adultos la proporción de RP_A/RP_B es 3/1 (67;70). Estudios *in vitro* demostraron que ambas isoformas pueden tener diferentes funciones en la misma célula y también una actividad diferente según los tipos celulares (124). RP_A puede disminuir o aumentar la actividad transcripcional de RP_B dependiendo del tipo celular (124-126). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la respuesta apropiada de las células a la Pg depende de la regulación de la expresión y/o actividad de ambas isoformas del receptor (127).

Se han desarrollado líneas celulares inmortalizadas o transformadas con el objetivo de estudiar el papel de RP_A y RP_B (125;127;128), pero su importancia relativa en la morfogénesis y carcinogénesis mamaria sólo se puede evaluar *in vivo*, ya que estos fenómenos involucran un juego complejo entre varios sistemas fisiológicos. Para encarar dicho estudio se desarrollaron modelos transgénicos introduciendo una copia adicional de cada gen. Uno sobreexpresa RP_A y en el otro los niveles de RP_B son mayores (73). En ambos casos se altera la proporción normal RP_A/RP_B (73). En hembras nulíparas las glándulas mamarias exhibieron una morfología aberrante. En el caso de los transgénicos RP_A se observaron conductos más gruesos y ramificación lateral excesiva, imitando la glándula de una preñez temprana. Las ramificaciones terminan en estructuras bulbosas con conductos que exhiben un número extraordinario de brotes creciendo de lo que normalmente

son zonas quiescentes. En los transgénicos de RP_B se observó un crecimiento alveolar inapropiado y un arresto prematuro de la habilidad de los conductos para llenar el panículo adiposo, pero a diferencia de los transgénicos RP_A , no hubo alteración en el crecimiento lóbulo-alveolar. Estas observaciones mostraron que la expresión regulada de ambas isoformas del RP es crítica para una respuesta apropiada a la Pg y por lo tanto para el desarrollo mamario normal. Con los transgénicos de RP_A se demostró que una alteración en la señalización de la Pg podría resultar en displasias mamarias, caracterizadas por un aumento de la proliferación de células epiteliales y disrupción de la integridad de la membrana basal, similar a lo que ocurre con células transformadas.

V. PROGESTERONA EN EL CÁNCER DE MAMA

En el endometrio humano, los estrógenos regulan la proliferación de las células epiteliales y la Pg su diferenciación. Durante años se han extrapolado estos mecanismos de regulación a la glándula mamaria, siendo esto probablemente incorrecto (revisado en (84)). En el útero, los estrógenos tienen efecto proliferativo y la adición de Pg al endometrio estrogenizado lleva a la aparición de un patrón secretorio (diferenciación). Los estrógenos son tumorigénicos para el endometrio, mientras que el riesgo de hiperplasia endometrial y cáncer disminuyen cuando se agregan progestágenos a los estrógenos (129);(130). A partir de estos resultados en la terapia de reemplazo para las mujeres post-menopáusicas se utiliza una combinación de estrógenos más Pg (E+Pg). Sin embargo y como se discutió en secciones anteriores, hay información considerable que sugiere que en el epitelio mamario la Pg al igual que los estrógenos, tiene un efecto proliferativo (36;38;55).

Al estudiar el papel de la Pg y los progestágenos en el cáncer de mama es importante distinguir entre los efectos en la carcinogénesis mamaria, y su papel regulando la proliferación de cánceres ya establecidos.

Progestágenos en la inducción tumoral:

Se ha demostrado que ciertos análogos de la progesterona como el MPA, son carcinogénicos o que aumentan la incidencia de tumores mamarios espontáneos de ratones (131). Nuestro grupo demostró en 1986 que el progestágeno MPA induce en hembras vírgenes de la cepa BALB/c carcinomas de mama ductales y hormono-dependientes, que conservan altos niveles de RE y RP en los sucesivos pasajes singeneicos (49; 131). Unos años más tarde, en 1993 también se pudieron inducir carcinomas mamarios con Pg, aunque en este caso la mayoría fueron lobulillares y progresivamente, a través de los pasajes, dejaron de expresar RE y RP. La importancia de la progesterona en los tumores de mama inducidos por carcinógenos está bien documentada (revisado en (84)) y se demostró que los progestágenos pueden actuar como carcinógenos en combinación con iniciadores químicos, como N-nitrosometilurea NMU (52;54) y 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) (Aldaz 1996) y que el RP estaría involucrado en la carcinogénesis inducida por DMBA (132).

En humanos, como se indicó anteriormente, ha quedado demostrado que el tratamiento combinado de estrógenos más MPA aumenta el riesgo de incidencia de cáncer de mama invasor en mujeres postmenopáusicas (36;38;55).

RECEPTORES DE PROGESTERONA EN EL CÁNCER DE MAMA

En la clínica uno de los parámetros que se tienen en cuenta antes de utilizar la terapia hormonal es la expresión de RE y RP, pero hasta el momento sólo dos grupos han investigado la expresión de isoformas del RP en tumores de mama humano (133;134). En estos estudios se encontró que una fracción significativa de los tumores evaluados expresa ambas isoformas del RP. A diferencia de lo observado en la glándula mamaria normal, donde se detectan niveles equimolares de ambas proteínas, en los tumores de mama, se observó una alteración de la proporción RP_A/RP_B , donde en un 61 % de las muestras la proporción estuvo entre 0.04 y 2 y valores por encima de 4 estuvieron sobre representados. El aumento de la proporción RP_A/RP_B se debió a bajos niveles de RP_B más que a sobreexpresión de RP_A . En los cánceres invasores y con pronóstico más pobre se detectaron mayores niveles de RP_A (133). El mismo grupo informó la expresión de una proteína más pequeña (PR78kDa) en 25 % de los tumores evaluados, truncada en el extremo N-terminal demostrando que no era producto de degradación y que une progestágenos (133) (135). Posteriormente, se describieron posibles productos del corte y procesamiento alternativo del ARNm (135;136) cuyo largo daría como resultado una proteína con un PM similar, pero hasta el momento su origen no está claro ya que las variantes de ARNm también fueron descritas en tejido normal (135).

Bamberger *et al* (134) informaron que de 53 tumores, 42 de ellos de histología ductal, el 94 % expresaba RP_A en niveles iguales o mayores que RP_B . La expresión equimolar de ambas isoformas se correlacionó con un fenotipo más diferenciado, mientras que mayor proporción de RP_A se asoció con un fenotipo de menor diferenciación. Recientemente Richer *et al* (137) en experimentos de *DNA array* informaron que la Pg regula positiva y negativamente distintos subgrupos de genes a través de las dos isoformas del RP. De los 94 genes activados por Pg, 25 son regulados por ambas isoformas, 4 sólo por RP_A y el resto únicamente por RP_B , lo que indica que la proporción de las mismas podría ser importante en el fenotipo de el tejido normal, al igual que en el tumoral.

VI. TRATAMIENTO ENDÓCRINO DEL CÁNCER DE MAMA

La terapia endocrina en el cáncer de mama humano se basa en inducir la alteración del entorno hormonal, en particular la disminución en los niveles de estrógenos. De esta forma, inhibiendo la acción estimuladora del crecimiento ejercida por los mismos se logra reducir el crecimiento del tumor mamario en muchas especies (30;138). En un 70-80 % de los pacientes con cáncer de mama, los tumores expresan RE y RP. La expresión de ambos receptores es altamente indicativa de un RE funcional y en consecuencia de que el tumor responderá favorablemente al tratamiento. De todas maneras, en la gran mayoría de los cánceres de mama, el tratamiento hormonal deja de ser efectivo luego de un cierto tiempo y la enfermedad recurre y se disemina (106;139). El tipo de tratamiento puede ser ablativo o aditivo:

Tabla 1-1: Terapia endocrina para el cáncer de mama

I. Tratamiento único

1. Ablativo/castración

hipofisectomía
adrenalectomía

2. Aditivo

estrógenos/antiestrógenos
progestágenos/antiprogestágenos
andrógenos/antiandrógenos
corticosteroides/anticorticosteroides
inhibidores de la aromatasa
análogos de LHRH
análogos de la somatostatina
inhibidores de prolactina
bloqueantes de la unión de factores de crecimiento o su transducción de la señal
Inhibidores de factores específicos involucrados en metástasis y/o angiogénesis

3. Tratamiento hormonal combinado

4. Tratamiento hormonal alternado

II. Quimioterapia y terapia hormonal combinadas

Alternando tratamiento hormonal y quimioterapia
Compuestos de metales citotóxicos incorporados dentro de agentes hormonales

III. Factores de crecimiento o antihormonas marcados con radioisótopos

Klijn J, 2000

Durante los últimos 20 años, el número de agentes endocrinos disponible ha crecido dramáticamente, si bien sólo el tamoxifeno es utilizado en el tratamiento de rutina. Algunos acercamientos a la terapia endocrina del cáncer de mama son los antiestrógenos puros (*pure antiestrogens: AEs*) y los moduladores específicos del receptor de estrógeno (*specific estradiol receptor modulators: SERMs*). La diferencia entre uno y otro radica en que para los AEs sólo se conoce actividad antagonista, mientras que los SERMs pueden tener actividad antagonista o agonista dependiendo del órgano blanco. Los antiprogéstágenos también son agentes hormonales con potencial aplicación en el tratamiento del cáncer de mama, si bien en la actualidad su uso más conocido es como abortivos. El primer antiprogéstágeno desarrollado fue la mifepristona, también denominado RU 38486 (140;141), y desde entonces han surgido decenas de compuestos análogos relacionados cuya acción va desde antagonistas puros (*pure antagonists: PAs*) hasta antagonistas-agonistas mixtos. Estos últimos se conocen en el presente como moduladores del receptor de progesterona (*progesterone receptor modulators: PRMs*). Nuevamente, los PAs tienen actividad conocida sólo de antagonista mientras que los PRMs pueden ser agonistas o antagonistas según el órgano o célula blanco.

Es importante destacar que a pesar del incremento de potenciales agentes endocrinos en el mercado a los que además de los antes mencionados se suman los inhibidores de aromatasa, análogos de la hormona liberadora LH, anticuerpos anti receptores de factores de crecimiento, etc. (Tabla 1-1). El tamoxifeno es el agente terapéutico de primera línea que se utiliza casi exclusivamente para el tratamiento del cáncer de mama hormono-dependiente y metastásico (106).

Si bien la expresión de ambos, RE y RP aumenta la respuesta al tamoxifeno en un 80 %, los tumores de mama respondedores a la terapia endocrina evolucionarán a fenotipos hormono-independientes con la consecuente adquisición de resistencia al tratamiento (106). La aparición de fenotipos resistentes aún no ha sido esclarecida, pero dado que estos tumores frecuentemente conservan la expresión de RE y RP, aún pueden responder a un tratamiento endocrino de segunda o tercera línea (142). Por esta razón, los PAs como PRMs podrían ser utilizados en el tratamiento del cáncer de mama y sus efectos están siendo evaluados en humanos.

PRUEBAS CLÍNICAS

Se han llevado a cabo ensayos clínicos con los antiprogéstágenos mifepristona y onapristona (ZK 98 299) y hasta el momento se informaron resultados de cinco estudios en fase II realizados en pacientes con carcinoma de mama metastásico (Tabla 1-2).

Tres estudios utilizan PAs como tratamiento de segunda o tercera línea (143;144), donde analizando los datos de los tres ensayos, de un total de 123 pacientes el 11 % respondió (completa o parcialmente) y en el 43 % la enfermedad no progresó. Recientemente se informaron los resultados obtenidos utilizando mifepristona (145) u onapristona (146) como agentes de primera línea. En este caso de un total de 46 pacientes, 28 % respondió parcialmente a alguno de los tratamientos y en otro 28 % la enfermedad no progresó. La duración media de la respuesta fue de 70 semanas. Si bien los resultados obtenidos con onapristona eran prometedores durante las primeras seis semanas de tratamiento algunas pacientes presentaron toxicidad hepática por lo que los estudios con esta droga se abandonaron. Los efectos positivos de estos tratamientos se observaron principalmente en pacientes con tumores que expresaban RP.

Tabla 1-2: Efectos antitumorales del tratamiento con antiprogéstágenos en pacientes post-menopáusicas con cáncer de mama metastásico.

Autores	Antiprogéstágenos	Dosis (mg/día)	Número de pacientes	Respuesta completa	Respuesta parcial	Sin cam- bios	Progresión
Romieux et al (1987)	Mifepristona (tercera línea)	200	22	0	3	9	10
Klijn et al (1989)	Mifepristona (segunda línea)	200-400	11	0	1	6	4
Jonat et al (1994)	Onapristona (segunda línea)	100	90	1	8	38	43
Perrault et al (1996)	Mifepristona (primera línea)	200	28	0	3	11	14
Robertson et al (1999)	Onapristona (primera línea)	100	18	0	10	2	7

Klijn, 2000

EFECTOS EN MODELOS EXPERIMENTALES

En tumores mamarios de rata inducidos por DMBA, el tratamiento con mifepristona por tres semanas, tanto profiláctico como en presencia de tumores palpables, disminuyó el tamaño tumoral entre el 75 y 90 %, con distintas dosis entre 2.5 a 40 mg/día (147). La actividad antitumoral de la onapristona resultó ser tan o más potente que la del tamoxifeno u ovariectomía en el modelo murino MXT y en tumores de mama de rata inducidos por DMBA y NMU (147;148). Se ha demostrado que los efectos antiproliferativos de este compuesto se deben a su habilidad para inducir la diferenciación terminal, aumento de apoptosis y la acumulación en Go-G1 (149-151).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIPROGESTÁGENOS

Los antagonistas hormonales sintéticos son muy útiles como herramientas clínicas y experimentales. En los últimos años el estudio de los antiprogéstágenos ha sido de gran interés por dos razones principales:

- Uso terapéutico: en la interrupción de un embarazo temprano, como desencadenante del trabajo de parto y potencial terapéutico para el tratamiento de tumores hormono-dependientes.
- Herramientas de estudio: del mecanismo molecular de acción hormonal.

Los antiprogéstágenos compiten/desplazan la unión del RP al ligando natural, y una vez formado el complejo RP-antagonista ejercen su actividad inhibitoria en cada uno de los niveles de acción hormonal (activación, dimerización del receptor y unión de los dímeros a los HREs) según el antiprogéstágeno en cuestión (63). Algunos autores los han dividido en tres categorías de acuerdo a su mecanismo de acción (152):

Tipo I: El complejo RP-antagonista no se une al ADN. Ej: onapristona y ZK135 695.

Tipo II: El complejo RP-antagonista se une al ADN pero no es posible la activación de la transcripción. En ensayos de transactivación en presencia de activadores de PKA como el AMPc, estos compuestos se pueden comportar como agonistas (85). Ej: mifepristona, ZK 137 316 y ZK 112 993.

Tipo III: El complejo RP-antagonista se une al ADN, no hay activación de la transcripción y a diferencia de los Tipo II no tienen actividad agonista en presencia de AMPc. Ej: ZK 230 211 y ZK 193 151 (citado en (152)).

Cada antiprogéstágeno posee distinta potencia inhibitoria, que estaría controlada por numerosos factores como: la afinidad por el RP, la afinidad del complejo antagonista-receptor por el HRE, el número y cantidad disponible de HREs en un promotor y otros factores (68). Se describieron dos mecanismos básicos para explicar la acción inhibitoria de los antiprogéstágenos: clásico y no convencional.

1. Clásico. *Inhibición directa de la acción agonista.*

El antiprogéstágeno (AP)/antagonista se une al RP y este complejo a su vez se une al HRE. Como el cambio conformacional sufrido por el receptor es ligeramente diferente al que tendría unido a su agonista, no se forma el complejo de preiniciación y en consecuencia no hay transcripción del gen. Este mecanismo involucra, en primer lugar, la competencia entre ambos ligandos (agonista y antagonista) por ocupar el receptor, y en segundo lugar, la competencia entre los complejos agonista-RP y antagonista-RP para ocupar los HRE. En general, ambas isoformas poseen diferente potencial inhibitorio y se observó que cuando ambas están presentes en concentraciones equimolares el complejo antagonista-RP_A es un inhibidor transcripcional y proliferativo más fuerte que el complejo antagonista-RP_B.

2. No convencional. *Inhibición inducida por el complejo antagonista-RP sin la unión directa al ADN en los HRE.*

Existen evidencias de diversos mecanismos que podrían estar involucrados en este tipo de inhibición:

- El complejo antagonista-RP podría estar secuestrando un factor accesorio requerido para iniciar la transcripción por el complejo agonista-RP unido al HRE. En este mecanismo la isoforma RP_A sería un inhibidor más potente que RP_B.
- En experimentos *in vitro* con una construcción conteniendo una secuencia consenso para estrógenos, se observó que los complejos antagonista-RP_A pueden inhibir la activación de genes regulados por el RE. El mecanismo se desconoce, pero podría tratarse del secuestro de una proteína regulatoria común a la función de varios receptores de hormonas esteroides.

- Finalmente, otro mecanismo de inhibición de la transcripción restringido a RP_A es a través de sitios de unión al ADN *no canónicos*. La isoforma RP_A unida al antiprogéstágeno inhibiría la transactivación constitutiva utilizando estos elementos.

Por otra parte, se sabe actualmente que bajo ciertas condiciones, los antiprogéstágenos pueden tener efectos agonistas, por ahora restringidos a RP_B , independientemente del modelo utilizado. Existen diversos mecanismos propuestos, todos independientes de la unión al HRE canónico:

- Los receptores no se unen directamente al ADN sino que interactúan con otras proteínas que sí lo hacen, y activan la transcripción.
Los receptores se unen a otros sitios de unión al ADN distintos de los HRE activando la transcripción (68).

La acción agonista-antagonista de ciertos antiprogéstágenos sobre determinados receptores, depende de las condiciones internas de la célula, como se demostró en la línea de cáncer de mama humano T-47D (127). En presencia de concentraciones elevadas de AMPc, la mifepristona o ZK 112 993 pueden cambiar su efecto de antagonista a agonista, cuando predomina la expresión de la isoforma RP_B . Este efecto no se observa con la isoforma RP_A ni con el antiprogéstágeno onapristona. Este antiprogéstágeno no funciona como agonista, probablemente porque el complejo onapristona-RP no se une al HRE o lo hace en forma anómala y para que se active la transcripción en estas condiciones, el complejo AP-RP debe estar unido al ADN, aparentemente en el HRE. Estos resultados son consistentes con el hecho de que la transcripción esté indirectamente regulada por proteínas co-activadoras cuya actividad estaría controlada por fosforilación dependiente de AMPc (84).

El único antiprogéstágeno utilizado terapéuticamente hasta el momento es la mifepristona, pero solamente como abortivo. Se trata de un potente antagonista de la progesterona y de los glucocorticoides, que se une con alta afinidad a ambos receptores (153). La constante de disociación para el RP humano y de roedores es de aproximadamente 2×10^{-9} M, la cual es similar a la del progéstágeno sintético R5020 y mayor que la de la progesterona (141). No existen diferencias en cuanto a la especificidad, afinidad y estabilidad de la unión del RP al ADN al comparar la mifepristona con el R5020 (154). La unión al RP humano induce una

hiperfosforilación aún mayor que la observada al utilizar el agonista R5020 y permite la formación de homodímeros y heterodímeros entre las isoformas RP_A y RP_B . En células T-47D estimuladas con R5020, la inactivación del RP ocurre luego de aproximadamente una hora de la unión del complejo agonista-RP al ADN y los niveles de receptores descienden hasta un 80-90 % durante las primeras 24 horas (125). Por el contrario, cuando estas células se tratan con mifepristona los niveles de receptores permanecen elevados por horas o días (141).

VII. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSICIÓN DE HORMONO-DEPENDENCIA A HORMONO-INDEPENDENCIA Y EN LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO HORMONAL

Como ya dijimos anteriormente, los carcinomas de mama, que en un principio son hormono-dependientes, evolucionan hacia estadios de crecimiento autónomo y hormono-independiente. Esto no sólo se observa en la clínica sino también en distintos modelos experimentales. Los mecanismos responsables de esta transición no se conocen y diversas hipótesis se han propuesto para explicar estos fenómenos:

1. Selección de clones hormono-independientes que no expresan receptores hormonales: Durante muchos años se sugirió que en los tumores podrían coexistir poblaciones que expresen receptores hormonales y otras de crecimiento autónomo. Con el tiempo se seleccionarían las poblaciones hormono-independientes. Ballaré *et al* (155) sugirieron que las células más diferenciadas expresan receptores y son las eliminadas en la terapia endocrina. Las células progenitoras serían las más indiferenciadas con alta tasa de proliferación y que no expresan receptores. El hecho de que exista un alto porcentaje de tumores que no responde al tratamiento pero que sigue expresando receptores hormonales sugiere que este mecanismo no sería el que prevalece.

2. Mutaciones a nivel de receptores hormonales: Mutaciones, rearrreglos o deleciones en los genes, o variantes de ARNm producto del corte y procesamiento alternativo, que codifican a los receptores esteroides podrían alterar su función. Una consecuencia puede ser la terminación prematura de la transcripción y producción de receptores truncados (103). Otro ejemplo son las mutaciones que provocan una activación constitutiva del receptor, es decir que éste estimula la expresión de genes respondedores a esteroides aún en ausencia de hormona (156). Fuqua *et al* (157), investigando deleciones en el RE, observaron que la deleción del exón 5 ($\Delta 5$) del RE, producía un receptor transcripcionalmente activo aún en ausencia de ligando. Para el caso del RP, Vegeto *et al* (124) demostraron que si se eliminaba el extremo carboxilo-terminal se perdía la respuesta a progestágenos y se confería plena actividad agonista a la mifepristona. A pesar de que hay muchas evidencias experimentales que apoyan estas hipótesis y se han descrito mutaciones en el cáncer de mama humano, la expresión de proteínas con una secuencia

alterada no correlaciona con la resistencia al tamoxifeno, sugiriendo que estos no serían los mecanismos predominantes en la adquisición de resistencia al tratamiento.

3. Mutaciones en otros genes:

a. Mutación en proto-oncogenes: Se postuló que mutaciones que activan proteínas involucradas en la transducción de señales Ej. Ras, podrían hacer que estas vías se activen constitutivamente estimulando la transcripción de genes blanco involucrados en la proliferación celular. En ratones atímicos ovariectomizados en los que se transplantaron células MCF-7 transfectadas con un vector que sobreexpresa el protooncogen Ras, se indujeron tumores aún en ausencia de estrógenos (158). De esta forma, los tumores ya no necesitarían de la administración de hormonas para crecer. Esto ha sido cuestionado ya que en algunos modelos experimentales como el de carcinogénesis mamaria inducida por NMU se observó que la inserción de copias múltiples del gen ras disminuye la susceptibilidad al carcinógeno (159).

b. Mutación en genes supresores de tumores: Ej. p53. En células de cáncer de mama T-47D tratadas con progestágenos la expresión de p53 disminuye, sugiriendo que los mismos podrían estimular la proliferación celular disminuyendo los niveles de la proteína inhibidora. La pérdida de la hormono-dependencia lleva a una regulación negativa constitutiva de p53 y este podría ser un mecanismo que lleve a un aumento del crecimiento en ausencia de hormona (160).

c. Mutación en ciclinas de G₁: Poseen roles fundamentales en el control del ciclo celular y se encuentran transcripcionalmente reguladas por esteroides. Se demostró que las hormonas esteroides (incluyendo estrógenos) ejercen su efecto sobre la proliferación celular afectando el control del ciclo celular en G₁ (161). Recientemente, en células T-47D se demostró que la sobreexpresión de la ciclina D1 podría ser importante en el pasaje a la hormono-independencia (162).

d. Mutaciones en HRE: Se sugiere que podrían llevar a una activación constitutiva de la transcripción de los genes a los que se une el complejo hormona-receptor (107).

4. Activación constitutiva de otras vías proliferativas:

a. Factores de crecimiento. Estos se encuentran involucrados en la regulación del crecimiento del cáncer de mama por mecanismos autocrinos y paracrinos. Por lo tanto, la hormono-independencia podría deberse a un desacople en la regulación por factores de crecimiento (106;163).

b. Receptores para factores de crecimiento. Transcripción constitutiva o aumentada de receptores de factores de crecimiento con efecto estimulador. En células T-47D los progestágenos aumentan los niveles de ARNm de EGF y REGF. Este efecto es dependiente de la dosis y puede ser revertido por la administración de mifepristona. Una secreción constitutiva de REGF podría estar mediando el pasaje de hormono-dependencia a hormono-independencia (160).

c. Disminución en la secreción de un factor de crecimiento con efecto inhibitorio o disminución del número de receptores. Ej. TGF- β que inhibe la proliferación celular en células T-47D (160). La falta de expresión de receptores para TGF- β ha sido también postulado como un mecanismo importante en el crecimiento hormono-independiente (164).

5. **Activación de vías proliferativas que utilizan la vía de receptores esteroides.** Se han descrito interacciones entre vías convencionales de estimulación de la proliferación y la activación de vías de receptores hormonales. Vignon *et al* (165) observaron que los antiestrógenos podían inhibir la proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama estimuladas con EGF o insulina en ausencia de estrógenos. Kato *et al* (166) encontraron que el RE podía ser activado (fosforilado) por EGF e IGF's sugiriendo una conversación cruzada entre ambas vías. Además, en células tumorales humanas T-47D se observó que el EGF aumenta la respuesta a progestágenos. Este efecto estaría mediado por la activación del receptor de EGF y no altera la unión del RP al ADN (167). Por otra parte, se vio que el RP de pollo puede ser activado por neurotransmisores como la dopamina (168), pero si se muta la Ser⁶²⁸, pierde la capacidad de activarse por dicho transmisor, aunque aún puede ser activado por Pg. Todas estas observaciones sugieren que podría haber numerosas vías de activación hormono-independientes. También se demostró una conversación cruzada entre la vía de RP y la del AMPc (153). Este segundo mensajero y otros pueden afectar las cascadas de fosforilación como las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos). La activación independiente de la administración de esteroides se descubrió inicialmente para el RP de pollo (83).

VII. MODELOS EXPERIMENTALES

Son ampliamente utilizados para estudiar cambios que no pueden ser observados en el humano, ya sea por dificultades técnicas y/o éticas.

Inducción tumoral y trasplante: Los animales más usados son ratones y ratas. Los ratones son útiles porque se utilizan cepas endocriadas con alta incidencia para determinados tumores y una vez que los mismos surgen espontáneamente se los mantiene por trasplantes singeneicos (cada individuo de la colonia es genéticamente idéntico con el otro). Una de las ventajas de trabajar con este tipo de tumores es la reproducibilidad de los experimentos debido al alto número de tumores y también a lo largo del tiempo, ya que trocitos del tumor pueden congelarse en ampollas en nitrógeno líquido hasta que se necesiten nuevamente. También se puede inducir la aparición de tumores administrando un carcinógeno. El problema es que los tumores resultantes son muy inmunogénicos, por lo que es más difícil mantenerlos por trasplante aún en animales singeneicos (1).

Cultivos celulares: Se utilizan para la observación directa de fenómenos que ocurren en células tumorales y normales aisladas de su ambiente normal. De los tumores se obtienen cultivos primarios de los cuales un bajo porcentaje dará origen a líneas celulares inmortalizadas. Estas líneas son las que generalmente se utilizan en estudios *in vitro*. Las líneas celulares son una herramienta muy útil en el estudio de los mecanismos involucrados en la proliferación celular, pero es importante tener en cuenta que en el proceso de transformación la célula ha cambiado algunas de sus características originales y que los resultados obtenidos pueden no ser representativos de lo que ocurrió en el tumor que les dio origen (1).

Los modelos animales pueden ser muy útiles para el estudio de la biología del cáncer de mama. Estos contribuyen a una mayor comprensión de la enfermedad y los factores endocrinológicos que influyen tanto sobre el desarrollo de la glándula mamaria normal como en la susceptibilidad al cáncer. Existen numerosos efectores fisiológicos (endocrinológicos, inmunológicos y de comportamiento) que podrían influir sobre el

tes terapéuticos en el tratamiento del cáncer de mama humano y para investigar los mecanismos asociados a la iniciación, promoción y progresión de la enfermedad. Un factor de gran importancia en la elección del modelo es tener claro hasta qué punto refleja la enfermedad humana y sirve para el propósito de la investigación (169). Algunos de los modelos animales utilizados para el estudio del cáncer de mama son:

Inducidos por carcinógenos químicos: Útiles para la disección de los mecanismos de la carcinogénesis y la progresión maligna (Ej. DMBA y NMU) (52). La ventaja de estos carcinógenos en la rata es que los tumores inducidos expresan RE y se han usado para el estudio del impacto de la diferenciación mamaria sobre la carcinogénesis. Los tumores inducidos en ratones no expresan receptores hormonales.

▪ **Inducidos por virus:** Desde hace años se utiliza el modelo de MMTV en ratón donde se están identificando mutaciones en oncogenes que tendrían una potencial importancia en el desarrollo de la enfermedad humana (170). Los carcinomas asociados con virus no expresan en general receptores hormonales y son de histología lobulillar. El hecho de que los tumores sean biológicamente diferentes a los humanos hizo que no sean muy usados. Por otra parte, recientemente se han desarrollado modelos inducidos por adenovirus tipo 9 (171) y por virus polioma (172) los cuales no están todavía muy caracterizados.

▪ **Xenotransplantes humanos:** Son los modelos animales de cáncer de mama más utilizados. Poseen la ventaja de que son de origen humano, pero como ya están transformados no se pueden estudiar eventos tempranos como la iniciación (173). Además poseen la desventaja de que se utilizan animales inmunosuprimidos.

▪ **Modelos en ratones transgénicos y *knock out*:** Surgieron durante los últimos años pero su aplicación podría ser limitada (174). Se ha tenido mucha expectativa con la inducción de tumores de mama en estos ratones con oncogenes transfectados, la gran cantidad de fracasos se debe probablemente a que se necesitan varios oncogenes para desarrollar una neoplasia. El uso de múltiples transgénicos y cruza entre ellos está mejorando los resultados. Sin embargo, hasta ahora en los modelos informados, los tumores inducidos no tienen mucha similitud a los humanos en cuanto a histología y expresión de receptores hormonales.

▪ **Inducidos por hormonas:** Por administración prolongada de MPA a hembras vírgenes BALB/c (49;175). La ventaja de los tumores inducidos por MPA en hembras singeneicas es que, al igual que aproximadamente el 70 % de los carcinomas de mama humanos, tienen una histología ductal, surgen con un feno-

tipo hormono-dependiente y evolucionan hacia el crecimiento autónomo. Conservan los RE y RP a través de los pasajes singeneicos lo cual los hace una herramienta única para el estudio de los mecanismos involucrados en la adquisición de resistencia a la terapia endocrina (176).

MODELO EXPERIMENTAL DE INDUCCIÓN DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS POR ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA

En nuestro laboratorio se desarrolló un modelo de cáncer de mama en el que la administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/c induce carcinomas con una incidencia actuarial de 76 % y una latencia media de 52 semanas (49;175) (Figura 1-7). Los carcinomas son en su mayoría de origen ductal, con capacidad de dar metástasis en pulmón y nódulos linfáticos (47), y poseen un comportamiento progestágeno-dependiente. Expresan altos niveles de RE y RP (50). Los tumores se mantienen por pasajes en ratones hembra vírgenes singeneicas de la cepa BALB/c. Se logró seleccionar por presión selectiva en ratones sin tratar variantes progestágeno-independientes, que conservan altos sus niveles de RE y RP.

En menor proporción, el MPA induce también carcinomas del tipo lobulillar, que luego de varios pasajes no expresan RE ni RP mientras que sí expresan REGF. Histológicamente, se asemejan a los tumores mamarios que surgen espontáneamente en hembras multíparas BALB/c. Tanto los tumores del tipo ductal como lobulillar son precedidos por lesiones preneoplásicas (43;50), en forma similar a lo que se ha descrito en el cáncer de mama humano (177).

En los primeros experimentos, los tumores inducidos por MPA se transplantaron en hembras BALB/c y luego de un período de latencia de 4 a 12 meses se establecieron diversas líneas de tumores (Figura 1-8). Algunas de ellas se definieron como progestágeno-dependientes y se caracterizaron por tener una mayor tasa de crecimiento, un menor período de latencia en animales tratados con MPA o progesterona (Pg) y por no crecer en animales ovariectomizados sin tratar. Por otro lado, también se obtuvieron líneas tumorales progestágeno-independientes que crecían tanto en presencia como en ausencia de la hormona (47) (41). La administración de estrógenos inhibió el crecimiento e indujo regresión tumoral en tumores progestágeno-dependientes e independientes (42). En experimentos *in vitro* (40) se comprobó que el MPA tiene un efecto

directo sobre las células y que probablemente esté mediado por el RP. MPA es también un ligando de receptores de andrógenos y de glucocorticoides, por lo que se evaluaron también los efectos de la dexametasona y dihidrotestosterona, que no demostraron ser significativos sobre el crecimiento tumoral.

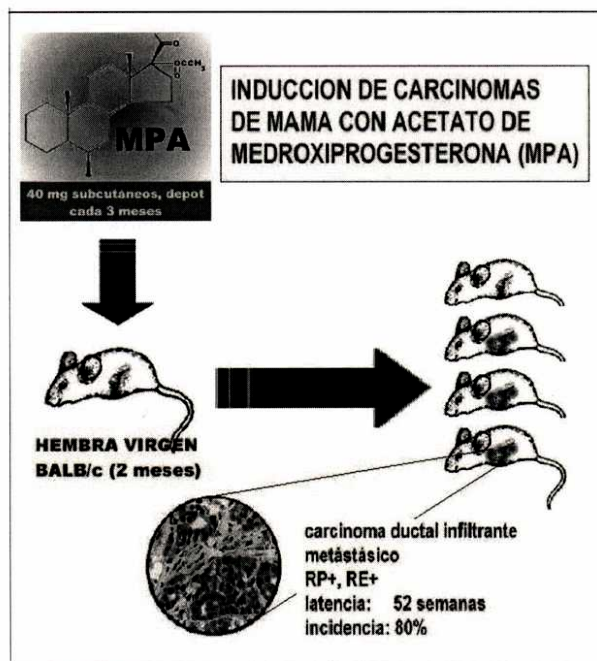


Figura 1-7: Inducción de adenocarcinomas mamarios en ratones hembra BALB/c. Se administra MPA depósito sc, 40mg cada 3 meses durante un año o bien se implanta un pellet de 40 mg cada 6 meses. La latencia de aparición de los tumores es de 52 semanas. Los tumores son en su mayoría ductales y expresan RE y RP.

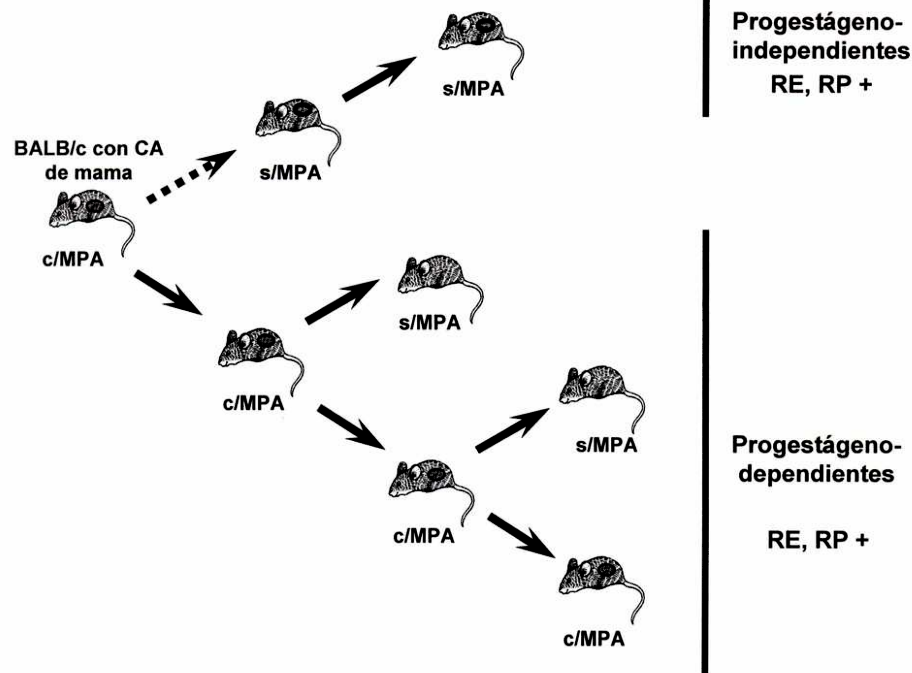


Figura 1-8: Mantenimiento *in vivo* de adenocarcinomas mamarios en ratones hembras BALB/c. Trocitos de 3-5 mm² de tumor se transplantan en hembras vírgenes y simultáneamente se inocula contralateralmente con 20 mg de MPA, depósito sc. Para controlar la hormono-dependencia el tumor se transplanta también en animales sin MPA. Ocasionalmente, o por presión selectiva el tumor comienza a crecer en animales sin MPA. Estos tumores son progéstágeno-independientes y conservan la expresión de RE y RP.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel del receptor de progesterona (RP) en la transición del crecimiento hormono-dependiente a independiente y en la adquisición de la resistencia hormonal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluar la respuesta a progestágenos y antiprogestágenos *in vivo* e *in vitro*.
- II. Cuantificar por unión del radioligando el número de RP en los tumores progestágeno-dependientes e independientes sensibles y resistentes al tratamiento endocrino. Evaluar los parámetros K_d , Q , y EC_{50} para una variedad de progestágenos y antiprogestágenos.
- III. Caracterizar la expresión de isoformas del RP (RP_A y RP_B) en los carcinomas progestágeno-dependientes e independientes.
- IV. Evaluar posibles diferencias a nivel proteína y ARN.
- V. Correlacionar los hallazgos anteriores con el pasaje de hormono-dependencia a independencia y con la adquisición de resistencia al tratamiento endocrino.
- VI. Verificar la funcionalidad del RP y estudiar su papel en el crecimiento progestágeno-independiente de tumores resistentes al tratamiento con antiprogestágenos.

PARTE II

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES y SOLUCIONES

Extractos celulares totales

TEDG: Tris-HCl (Gibco BRL) pH 7.4	20 mM
EDTA (Sigma)	1.5 mM
dithiothreitol (Sigma)	0.25 mM
Na ₂ MoO ₄ (Merck)	20 mM
glicerol (Raudo)	10 %

Inhibidores (Sigma): PMSF 0.5 mM y una mezcla de ZPCK, TLCK, TPCK y TAME 0.025 mM (se agregan inmediatamente antes de usar el buffer).

Western blot

Acrilamida 30 % :	Acrilamida (Gibco BRL)	29 g
	Bisacrilamida (Gibco BRL)	1 g
	H ₂ O	100 ml

Agitar durante 30 minutos. Si la bisacrilamida no se disuelve calentar un poco. Cuando todo se haya disuelto filtrar la solución. Guardar protegida de la luz.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:	Tris	90.85 g
	H ₂ O	400 ml

Llevar a pH con HCl 1:2. Completar el volumen hasta 500 ml con H₂O.

Tris-HCl 1.0 M pH 6.8:	Tris	60.57 g
	H ₂ O	400 ml

Llevar a pH con HCl 1/2. Completar el volumen hasta 500 ml con H₂O.

SDS 10 %:	SDS (Gibco BRL)	10 g
	H ₂ O	100 ml

Persulfato 10 % (APS):	APS (Gibco BRL)	1 gr
	H ₂ O	10 ml

PBST (PBS-Tween 0.1 %):	PBS pH 7.4:	NaCl (Sigma)	0.8 %
		KCl (Sigma)	0.02 %
		Na ₂ HPO ₄ (Baker)	0.144 %
		KH ₂ PO ₄ (Baker)	0.024 %
		Tween 20 (Sigma)	0.1 %

Buffer desnaturalizante 3X:	SDS	6 %
	β- mercaptoetanol (Sigma)	15 % v/v
	Glicerol (Raudo)	60 %
	Tris 0.18M pH 6.8	0.18 M
	Azul de Bromo Fenol (BPB) (Sigma)	0.006 % p/v

Se diluye a 1X con la muestra, o con un volumen de muestra y otro de H₂O destilada si la muestra está muy concentrada.

Ponceau S:	Red Ponceau (Sigma)	0.5 %
	Acido acético glacial (Merck para análisis)	1 %

Buffer de corrida 10X:	Tris	30 r
	Glicina (BioRad)	144 g
	SDS	10 g

Se diluye 1/10 en H₂O antes de usar.

Buffer de transferencia:	Buffer de corrida 1X	800 ml
	Metanol (Merk, para análisis)	200 ml

Marcadores de peso molecular:

Prestained molecular weight markers (Gigco BRL).

Kaleidoscope prestained standards (Bio Rad).

Raibow prestained molecular weight markers (Amersham).

Membrana de nitrocelulosa:

Trans-Blot transfer Medium (0.2 μm) (BioRad).

Hybond c (0.2 μm) (Amersham).

Solución de bloqueo:

Leche descremada (Molico) 5 % en PBST

Anticuerpos:

Anticuerpos monoclonales:

RP: PgR Ab-7/hPRa 7 (NeoMarkers)

PgR Ab-6/hPRa 6 (NeoMarkers)

PgR Ab-5/hPRa 5 (NeoMarkers)

Anticuerpos policlonales:

RP: Ab-1 PRAB (gentilmente cedido por la Dra. Shyamala)

C-20 (Santa Cruz Biotechnology)

RE: MC-20 (Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpos secundarios:

Anti-mouse Ig, horseradish linked whole antibody (Amersham Life Science).

Anti-rabbit Ig, horseradish linked whole antibody (Amersham Life Science).

Sustrato quimioluminiscente:

ECL western blotting detection reagent (Amersham Life Science).

Supersignal (Pierce)

Película fotográfica:

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

Método de Lowry

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

Sc1 : CuSO_4 1 %, tartrato de Na_2K 1 % en buffer Na_2CO_3 2 %/ NaOH 0.1N.

Se diluye la muestra 3/100 y 5/100. De esta dilución se toman 100 μl y se agregan 0.9 ml de Sc1. Luego de 10 minutos se agrega reactivo de Folin (Folin-Ciocalteu, Merck) diluido a la mitad. Esperar 30 minutos y medir absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

Cultivos celulares

Medio de cultivo:

DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1) (Sigma) sin rojo fenol + sulfato de gentamicina comercial en concentración de 50 mg/l. Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada o deionizada. Esterilizar por filtración (Filtro de 0.22 μ)

SFB de complementado (SFB dec):

SFB (Gibco o Gen S.A.) calentado a 56° C durante treinta minutos.

Medio de lavado:

Medio de cultivo (DMEM/F12) + 2.5 % SFB dec.

Medio de mantenimiento de cultivos primarios y línea celular:

Medio de cultivo (DMEM/F12) + 10 % SFB dec.

SFB adsorbido con carbón-dextrano (SFBch):

Carbón activado (Mallinckrodt) 5 % + 10 % SFB dec. Agitar permanente durante 1 hora a 4° C. Luego de la adsorción, centrifugar el suero dos veces a 12.000 rpm durante 20 minutos. Repetir el procedimiento con el sobrenadante pero esta vez incubando durante toda la noche a 4° C. Centrifugar el suero 5-6 veces hasta eliminar completamente el carbón. Esterilizar por filtración (0,22 μ).

Solución de tripsina-EDTA: en PBS (sin Ca^{**} o Mg^{**}).

Tripsina (Gibco BRL) 0.25 %

EDTA (Gibco BRL) 0.2 %

PBS:	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (Baker)	3.06 g
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O(Anedra)	0.256 g
	NaCl	8.76 g

Se lleva a un litro con H₂O deionizada.

Solución enzimática:	Tripsina (Gibco BRL)	0.25 %
	Colagenasa Tipo II (Gibco BRL)	0.25 %
	ó tipo IV Sigma (AE: 485 U/mg)	
	Albúmina sérica bovina (Sigma Co)	0.5 %

Se lleva a volumen con buffer fosfato (PBS).

Líquido de centelleo: Optiphase Hisafe³ (Wallac).

Extracción de ARN total

Todas las soluciones deben prepararse con H₂O-DEPC

H₂O-DEPC: H₂O miliQ estéril + 1 % DEPC (ICN). Incubar a 37° C, 2 hs y luego autoclavar.

Solución D:

Para un volumen final de 100 ml:

GTC (isotiocianato de guanidinio)	4M	47.26
Citrato de sodio	25 mM	1.25 ml de una solución 2M
Laureato de sarcosilo	0.5%	0.5 g
2-mercaptoetanol	0.1M	714µl
H ₂ O-DEPC		hasta 100 ml

El 2-mercaptoetanol se agrega al final a la cantidad de solución que se usará en un determinado momento. La solución de citrato de sodio debe estar previamente autoclavada.

Protección de RNasa

Para el desarrollo de esta técnica se utilizaron los kits: Maxiscript *in vitro* transcription kit y RPAII ribonuclease protection kit (Ambion). Los detalles se explican en la sección de metodología.

Hormonas y nucleótidos radioactivos:

(³H)-R5020, ³H-timidina y (³²P)-αCTP, se compraron a NEN, Boston MA, USA.

METODOLOGÍA

Animales:

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

Tumores utilizados:

Se utilizaron tumores de histología ductal inducidos por MPA (47;175). La administración de MPA, 40 mg (depósito sc, cada 3 meses) a hembras vírgenes de la cepa BALB/c induce la aparición de carcinomas de mama con una incidencia de 80 % y una latencia media de 52 semanas (175) (Figura 1-7). Un alto porcentaje de estos tumores son ductales y se encuentran precedidos por lesiones preneoplásicas ductales, displasias y carcinomas *in situ*. Las lesiones invasoras expresan RE y RP y dan metástasis axilares y pulmonares (50). En menor proporción se obtuvieron carcinomas lobulillares que no dan metástasis y pierden los receptores en los sucesivos pasajes, pero que no fueron utilizados en este trabajo. El pasaje singeneico de los carcinomas ductales demostró que dependen de la administración de progestágenos para crecer, crecen luego de dos meses en animales no tratados y luego de seis meses en animales ovariectomizados (41). Estos tumores fueron denominados progestágeno-dependientes. Espontáneamente surgen tumores que crecen con igual velocidad en animales tratados, o no con progestágenos. A estos tumores los llamamos progestágeno-independientes. Por presión selectiva también se pudieron obtener líneas tumorales con este patrón de crecimiento. Para no perder las variantes progestágeno-dependientes, se congelan pedacitos de tumor en N₂ líquido que serán descongelados y transplantados nuevamente en el caso de que en un pasaje el tumor cambie su comportamiento a progestágeno-independiente.

En la Figura 2-1 se muestra la obtención de cada una de las líneas tumorales utilizadas en este trabajo. Los nombres corresponden a los rótulos de las cajas donde aparecieron los tumores por primera vez y los sufijos HD (Hormono-Dependiente) y HI (Hormono-Independiente) indican si su comportamiento *in vivo* es progestágeno-dependiente o progestágeno-independiente respectivamente. Por ejemplo, todos los tumores

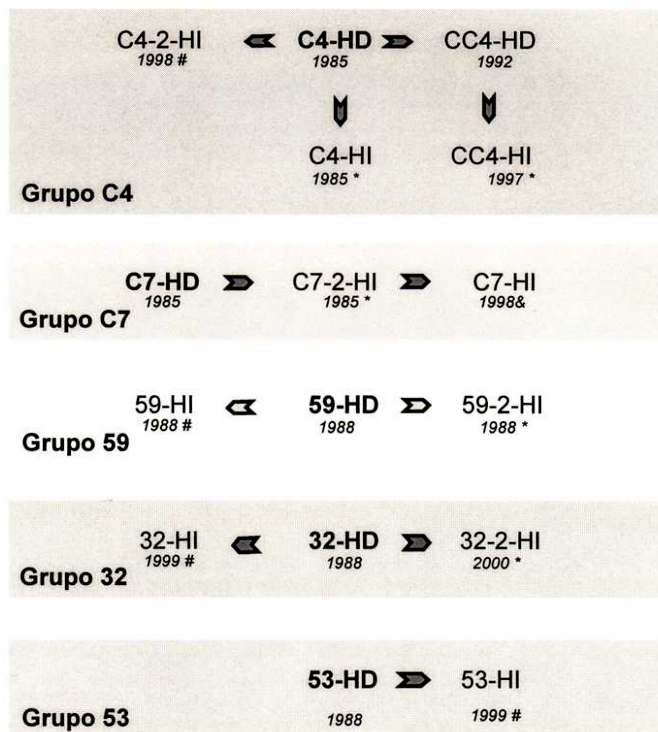


Figura 2-1: Grupo de tumores utilizados en este trabajo. Los tumores con sufijo HD son progestágeno-dependientes. Los tumores con sufijo HI son progestágeno-independientes. #: tumores de crecimiento independientes obtenidos por presión selectiva. *: tumores de crecimiento independiente que surgieron espontáneamente. &: tumor C7-HI es un pasaje tardío del C7-2-HI con respuesta diferente a antiprogéstágenos.

del grupo C4 se originaron en el carcinoma ductal que apareció en la caja 4 del experimento de inducción del año 1985. Ese tumor transplantado en animales con MPA dió origen a la línea tumoral C4-HD (progestágeno-dependiente) y con los años se fueron obteniendo las variantes progestágeno-independientes de esa línea (C4-HI y C4-2-HI). Así se puede identificar a cada línea tumoral de los distintos grupos. El tumor CC4-HD resultó de la inoculación de células epiteliales de un cultivo primario de C4-HD a una hembra con MPA.

Transplante de tumores (pasajes):

Todos los tumores se mantuvieron *in vivo* por pasajes seriados singeneicos en hembras vírgenes BALB/c. Se implantaron en el flanco inguinal derecho fragmentos de tumor de aproximadamente 2-3 mm³, en forma sc y con un trócar. En el caso de tumores progestágeno-dependientes se inocularon simultáneamente 20 mg de MPA, depósito sc (Medrosterona, Laboratorios Gador, Buenos Aires) contralateralmente. En cada pasaje los tumores se transplantaron siempre en un animal sin tratar con MPA para controlar la hormono-dependencia de los mismos. Los tumores progestágeno-independientes se transplantaron solamente en ratones sin inóculo de MPA (Figura 1-8).

METODOLOGÍA

En la Figura 2-2 se muestra un esquema de las técnicas utilizadas en este trabajo. Las mismas son descriptas en detalle a continuación.

EXPERIMENTOS IN VIVO

a) Evaluación de Hormono-Dependencia:

Los tumores se transplantaron a cuatro grupos de tres hembras vírgenes de la cepa BALB/c. Los grupos consistieron en ratones: 1) no tratados, 2) ovariectomizados, 3) con operación simulada y 4) inoculados contralateralmente con 20 mg de MPA, depósito sc, simultáneamente al implantar el tumor. Los tumores se midieron con un calibre Vernier cada 3-4 días (largo x ancho). Se graficó tamaño tumoral en función del tiempo.

b) Evaluación del efecto de distintas hormonas y antihormonas sobre el crecimiento tumoral:

Los tratamientos se comenzaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 25-100 mm². Se usaron 3-4 ratones por grupo. Los tumores se midieron con un calibre cada 3-4 días (largo x ancho) y se graficó tamaño tumoral en función del tiempo.

Tratamiento hormonal (hormonas utilizadas):

17-β estradiol (E₂) (Sigma): 5 mg en pellets de silastic implantados sc en la parte dorsal del ratón.

Mifepristona (Roussel Uclaf, Francia): Administrada sc en dosis diarias de 6.75 mg/kg de peso por día. Se preparó una solución madre de concentración 22.5 mg/ml y diariamente se preparó la solución de trabajo 1/100 en solución fisiológica (SF), inyectándose 0.6 ml/ratón.

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

Control: Se dejó un grupo con tratamiento de SF y otro grupo con pellet de silastic.

EVALUACIÓN DE RECEPTORES HORMONALES

Controles positivos:

Se utilizaron úteros de hembras vírgenes BALB/c adultas tratadas, o no con: E₂ 10 µg/kg sc diarios, o MPA 20 mg/ratón, por dos días. Antes de extraer los úteros se verificó por extendidos vaginales que los animales estuvieran en estro o proestro respectivamente. También se utilizó glándula mamaria normal de hembras vírgenes tratadas, o no con: E₂, MPA o en el día 15 de preñez.

Controles negativos:

Se utilizaron músculo esquelético de los mismos ratones tratados con E₂, y útero y glándula mamaria de hembras vírgenes *knock out* de RP (PRKO (122)). También se utilizó en algunos experimentos la línea celular de mama normal de ratón (NMuMg) que no expresa RP.

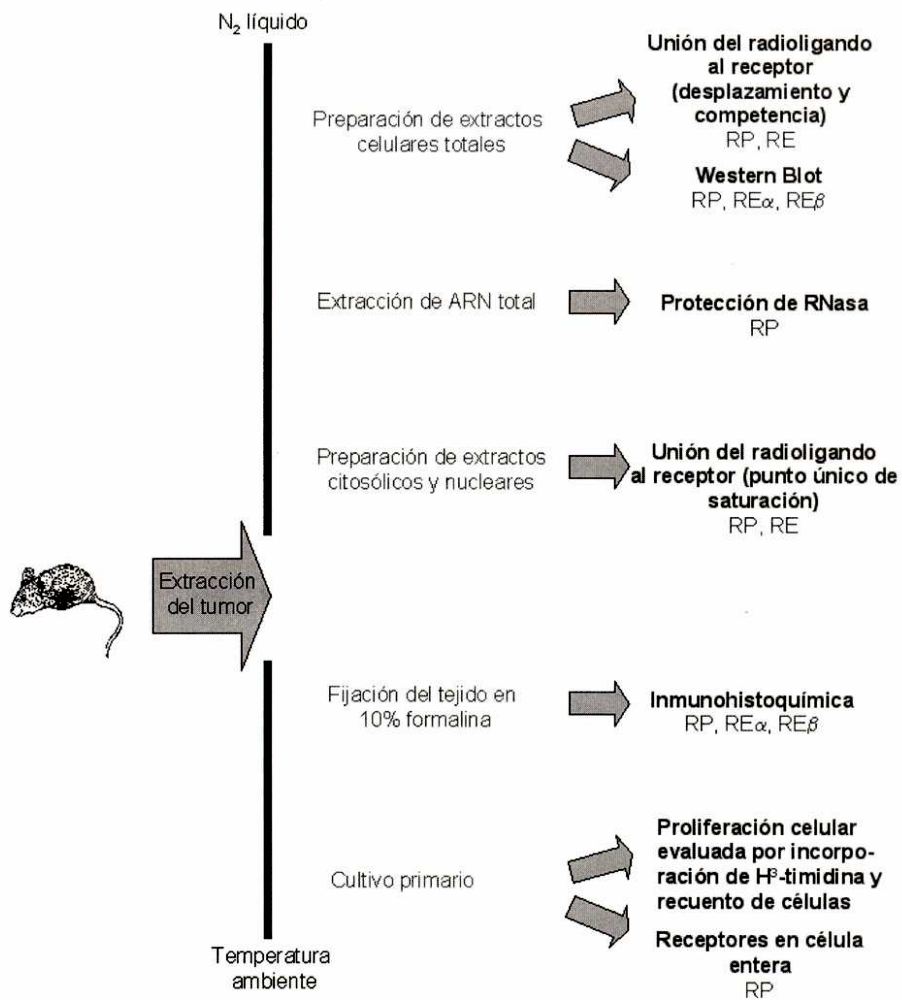


Figura 2: Esquema de las técnicas utilizadas. Los tumores se extrajeron y guardaron inmediatamente en N₂ líquido o formalina 10 % en PBS. Para realizar el cultivo primario, los tumores se extrajeron en esterilidad.

Tumores:

Se utilizaron los tumores progestágeno-dependientes e independientes descritos anteriormente. Los mismos se extrajeron con un tamaño aproximado de 50-100 mm², e inmediatamente se congelaron en N₂ líquido. Para todos los experimentos se guardó la periferia del tumor eliminando la parte del centro que es la más necrótica. Para evaluar la regulación por progestágenos se realizaron dos diseños experimentales: a los tumores progestágeno-dependientes se les removió quirúrgicamente el depósito de MPA 10 días antes de la escisión del tumor y a los progestágeno-independientes se los inoculó con MPA depósito de 20 mg/ratón por 10 días.

Preparación de extractos celulares totales:

Los tejidos y tumores se homogeneizaron en buffer de lisis (TEDG) en una proporción 1:4 p/v. El homogenato se realizó con un politron (Teckman) a velocidad media repitiendo la operación tres veces por 5 segundos cada una. Posteriormente, y sólo en las muestras destinadas a Western blot se sonicó a frecuencia media durante 10 segundos (dos veces). El homogenato se centrifugó a 40.000 rpm, 45 min, 4° C. Posteriormente los homogenatos se comenzaron a centrifugar a 12.000 rpm, 30 min, 4° C ya que se verificó que los resultados no diferían de los obtenidos a 40.000 rpm. El sobrenadante se utilizó inmediatamente en los experimentos de unión del radioligando al receptor o se guardó rápidamente a -70° C ó en N₂ líquido para ser usado posteriormente en Western blot. Paralelamente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (178)

Para realizar los extractos citosólicos a partir de células en cultivo, se lavaron las mismas con PBS, y se levantaron con un rastrillo en un volumen no mayor de 100-200 µl/frasco de cultivo (aprox. 1x10⁷ células) con buffer de lisis (en frío). El homogenato fue sonicado dos veces durante 10 segundos a intensidad media. Se centrifugó a 12.000 rpm, 30 min, 4° C. El sobrenadante se guardó inmediatamente a -70° C o en N₂ líquido.

Unión del radioligando al receptor:

Se realizaron experimentos de desplazamiento y competencia de [³H]-R5020. Se calculó la dosis efectiva 50 (EC50), constante de disociación (Kd) y número total de sitios receptores (Q) con el software GraphPad® (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Curvas de desplazamiento:

Los RP se midieron incubando alícuotas del extracto por duplicado con 3 nM [³H]-R5020 y desplazando con concentraciones crecientes de R5020, MPA, mifepristona u onapristona no radioactivas en el rango de 0.1 pM a 20 μM. La reacción se dejó llegar al equilibrio durante 18 hs a 0° C. Se utilizó 100 veces más de cortisol para bloquear el pegado no deseado a proteínas séricas. La separación de la hormona unida y libre se realizó agregando una solución de carbón-dextrano (buffer TEDG, 1 % carbón activado, 0.1 % dextran) y luego de 10 min, las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm, 10 min, 4° C. El sobrenadante se contó en presencia de líquido de centelleo en un contador de emisión β. Los resultados se graficaron como % hormona unida (cpm unidas en cada punto/total de cpm unidas) vs log concentración (log nM) y se calculó la EC50.

Experimentos de saturación y análisis de Scatchard:

Los extractos celulares totales se incubaron con [³H]-R5020 en concentraciones en el rango de 3 pM a 30 nM en presencia o ausencia de 3 μM R5020. La unión inespecífica a proteínas séricas, RG y RA se impidió con un exceso 100 veces mayor de cortisol o 5α-dihidrotestosterona (DHT). Se dejó llegar al equilibrio durante 18 hs a 4° C. La hormona unida se separó de la libre con la adición de carbón-dextrano. Los datos se ajustaron realizando el análisis de Scatchard y se calculó la Kd y Q del RP.

Evaluación de RP totales:

Los ensayos de unión de [³H]-R5020 se realizaron en las fracciones nucleares y citosólicas. Los tejidos se homogeneizaron en buffer TEDG + 0.25 M sacarosa (TEDGS) y el homogenato se centrifugó a 1.000 rpm, 10 min, 4° C. Se recolectó el sobrenadante que se centrífugo a 12.000 rpm, 20 min a 4° C. El sobrenadante resultante es la fracción citosólica. Se resuspendió el precipitado de 1.000 rpm en buffer TEDGS + 0.4 M KCl, se incubó durante 1 h en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 min a 4° C. El sobrenadante es la fracción nuclear. La unión de [³H]-R5020 al RP se realizó en ambas fracciones. Los RP se marcaron incuban-

do alícuotas por duplicado de los extractos con 30 nM [³H]-R5020 por 3 hs sólo o con 3 µM R5020 y siempre con 3 µM de cortisol para bloquear la unión inespecífica. La hormona libre se separó de la unida adsorbiéndola con carbón-dextrano.

Western blot :

Las muestras (100 µg de proteínas totales/calle) se separaron en un gel de poliacrilamida discontinuo (7.5 % para separar al RP y 12 % para separar al RE) usando el sistema de buffers discontinuos de Laemmli (179). Se separó un conjunto de marcadores de PM en cada gel. Las proteínas se disolvieron en buffer desnaturalizante y se hirvieron durante 4 min. Se realizó la electroforesis por 60-75 min a 25 mAmp/gel. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 hs a 80 V. Las membranas se bloquearon durante toda la noche en solución de bloqueo. Al terminar el bloqueo, las membranas se lavaron varias veces en PBST y luego fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes. Para RP con el anticuerpo monoclonal PgR Ab-7/hPRa 7 (Ab 7) (Neomarkers, Union City, CA) a temperatura ambiente, por 2 hs, en una concentración de 2 µg/ml, en PBST. Otros anticuerpos monoclonales fueron también utilizados en algunos experimentos: PgR Ab-5/hPRa 5 (Ab 5) y PgR Ab-6/hPRa 6 (Ab 6). Estos anticuerpos comerciales se obtuvieron utilizando RP purificado de carcinoma de endometrio humano como antígeno (180) y se ha demostrado que reaccionan con el RP de ratón (181). Ab5 y Ab7 detectan RP_A y RP_B, mientras que Ab 6 sólo reconoce RP_B. Todos se utilizaron en una concentración final de 2 µg/ml (diluido 1/100 del vial madre en PBST). El segundo anticuerpo utilizado fue un anti IgG de ratón realizado en oveja conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK), diluido 1/1500 en PBST. Se utilizó también el anticuerpo policlonal anti RP de ratón Ab-1 PRAB (Ab 1) desarrollado en el laboratorio de la Dra. Shyamala (182), este suero se diluyó 1/1000 en solución de bloqueo y como segundo anticuerpo se utilizó anti IgG de conejo realizado en oveja conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (Amersham Life Science), diluido 1/1500 en PBST. En el caso de RE se utilizó el anticuerpo policlonal MC-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), diluido 1/100 en PBST. Las bandas inmunoreactivas se revelaron por quimioluminiscencia. Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica durante 10 seg a 5 min, dependiendo de la intensidad de la señal observada. Sólo se cuantificó la intensidad de las bandas en

los geles donde la proporción de intensidad se mantuvo lineal, es decir que la mancha no estaba saturada. Se repitieron los experimentos con 5 a 20 muestras de cada tumor.

Inmunohistoquímica:

Los tumores se fijaron en formalina 10 % en PBS y se incluyeron en parafina según técnicas de rutina. Se desparafinaron cortes de 5 μ en xileno y se hidrataron en una serie de alcoholes de graduación decreciente. La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió con H₂O₂ al 3 % en PBS durante 20 min. Los cortes se bloquearon con albúmina 3 % en PBS por 30 min y luego se incubaron con Ab 7, Ab 6, Ab 1 o el anticuerpo polyclonal PR C-20 (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1/100 en PBS durante 48 hs a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y sucesivamente se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (anti IgG de ratón o anti IgG de conejo conjugados con biotina, Vector Labs, San Francisco, CA), diluidos 1/250 en PBS, y con el complejo ABC, preparado según las indicaciones del fabricante (Vector Labs). Los vidrios se lavaron varias veces con PBS y se revelaron bajo el microscopio con 3-3' diaminobenzidina 0.06 % en PBS y H₂O₂ 0.1 %. La reacción se detuvo con H₂O destilada, entonces los cortes se deshidrataron en una serie de alcoholes de graduación creciente, xileno y se montaron en medio sintético (DPX, Fluka). Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario o secundario en algunos cortes.

Cultivos primarios:

Se realizaron cultivos primarios de las líneas tumorales C4-2-HI, C7-HI, 59-HI, C7-2-HI y CC4-HI utilizando tumores de entre 50 y 100 mm², aproximadamente a los 15-20 días del trasplante. Los tumores se extirparon en esterilidad disgregando primero en forma mecánica y luego con solución enzimática, agitando a 37° C durante 40 minutos. La suspensión celular obtenida estuvo compuesta por dos poblaciones, una de estirpe epitelial y otra de estirpe fibroblástica. Para su separación se utilizó la técnica de Pandis *et al* (183) con algunas modificaciones (40). Esta técnica se esquematiza en la Figura 2-3 y se basa en que la velocidad de sedimentación de las células epiteliales que forman agregados celulares es mayor que la de los fibroblastos, permitiendo así su separación luego de varias decantaciones diferenciales. Se colocaron las células en

un tubo de centrifuga junto con 15 ml de medio de lavado y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio de lavado. La suspensión se dejó sedimentar durante 20 minutos; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales, que se encuentran habitualmente en agregados. Estas se volvieron a resuspender en medio de lavado y se repitieron las decantaciones cada 20 min descartándose el sobrenadante cada vez hasta que en él no se detectaron más células. Este es el momento en que se considera que se han separado exitosamente ambas poblaciones. Luego de la última decantación las células se resuspendieron en 10 % SFB dec y se sembraron en frascos de cultivo. Los cambios de medio se realizaron cada 48 horas con 10 % SFB dec. Al cabo de 7 a 10 días las células se tripsinizaron y repicaron en placas de 96 o 24 hoyos donde se realizaron los ensayos de proliferación o determinación de receptores en célula entera, respectivamente.

Repique de células:

Se reemplazó el medio con la solución de tripsina estéril y las células se incubaron durante 2-15 min a 37° C con la cantidad de tripsina necesaria como para cubrir el fondo mínimamente. Una vez que éstas se despegaron del fondo de la placa se las pasó a un tubo conteniendo 10 ml de medio de cultivo con 10 % SFB ddec se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos. Luego, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 5 % SFBch. Finalmente, se sembraron las células en las placas correspondientes.

Ensayos de proliferación:

1. Cultivos primarios

Los cultivos enriquecidos en células epiteliales fueron subcultivados en microplacas de 96 hoyos con 5 % SFBch y se incubaron durante 24-48 horas para permitir la adhesión. Luego, el medio fue reemplazado por medio fresco (2.5 % SFBch) conteniendo las soluciones cuyo efecto se deseaba evaluar. Los ensayos se realizaron por octuplicado. Las células se incubaron durante 48 hs con las soluciones correspondientes, reemplazándose, a las 24 hs, el 50 % del volumen de cada hoyo por solución fresca. Durante las últimas 18 horas de incubación se aplicó un pulso de 0.4 μ Ci de 3 H-timidina (actividad específica 20 Ci/mmol) en cada hoyo. Luego los cultivos fueron tripsinizados y cosechados en un cosechador de células (Inotech) y la radioactivi-

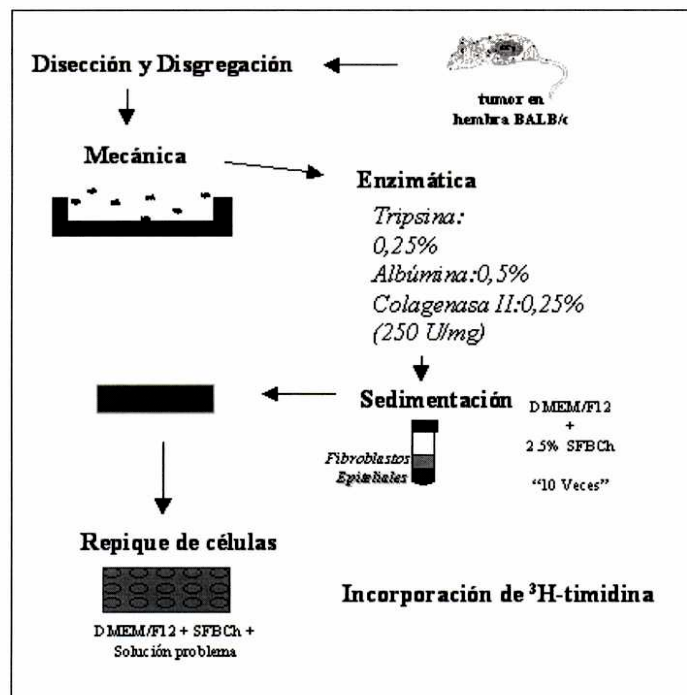


Figura 2-3: Representación esquemática del cultivo de tumores primarios y ensayos de proliferación celular.

dad incorporada fue medida en presencia de líquido de centelleo en un contador de emisión β durante 1 min.

2. Cultivo de la línea celular NMuMg

Se realizaron subcultivos de la línea celular de mama normal (NMuMg) en placas de 96 hoyos donde se ensayaron los distintos tratamientos. Los ensayos se realizaron por octuplicado. A las 24 hs se reemplazó el 50 % del volumen de cada hoyo por solución fresca. Durante las últimas 18 hs se le dio un pulso de 0.4 μ Ci de 3 H-timidina en cada hoyo. Finalmente, las células fueron cosechadas y la radioactividad incorporada fue medida en un contador de emisión β .

Hormonas

En todos los experimentos de proliferación, las hormonas utilizadas se diluyeron en etanol absoluto para obtener una concentración madre de 1×10^{-3} a partir de las cuales se realizaron diluciones seriadas en 2.5 % SFBch cubriendo el rango de 1×10^{-6} a 1×10^{-15} M. Nunca se realizaron diluciones con una proporción de etanol mayor que 1/1000 para evitar una posible toxicidad.

Oligonucleótidos antisentido

Se sintetizaron dos oligonucleótidos con secuencias complementarias al ARNm del RP. Una diseñada por nosotros para bloquear la expresión de RP_B (asRPB) y la otra para bloquear ambas isoformas (asRPAB) (184)(Fagos, Buenos Aires, Argentina y DNagency, Malvern PA, USA). Para controlar la especificidad del asRPAB, se diseñó el oligonucleótido scrRPAB, que contiene la misma cantidad y tipo de bases pero ordenadas en otra secuencia al azar que no resultó tener homología con ninguna proteína conocida de ratón. Se prepararon en una concentración madre de 4 mg/ml (en medio DMEM/F12 estéril) y se diluyeron en medio 2.5 % SFBch en un rango de 5 a 0.3 μ g/ml antes de usar.

asRPB: 5' G CAG CTC AGT CAT GAC GAC T 3'

asRPAB: 5' AC TCA TGA GCG GGG ACA ACA 3'

scrRPAB: 5' ACG CTA GAC TGA CGA CGA GA 3'

3. Determinación de RP en célula entera por unión del ligando al receptor

Las células se sembraron en una placa de 24 hoyos con 5 % SFBch. Cuando alcanzaron un 60 % de confluencia el medio se reemplazó por 2.5 % SFBch sólo o con agregado de asRP. Las células se incubaron 24 hs a 37° C. Posteriormente, las soluciones se reemplazaron con medio sólo por 1 h y luego se agregó en todos los hoyos (³H)-R5020 a una concentración final de 30 nM. La unión del radioligando se desplazó con R5020 no radioactivo en una concentración final de 3 µM. Se incubó a 37° C durante 3 hs. La hormona libre se eliminó lavando tres veces con PBS y las células se despegaron con tripsina 0.25 %. La radioactividad incorporada se midió en un contador de emisión β.

4. Recuento celular

Las células se sembraron en placas de 24 hoyos con 5 % SFBch y se dejaron adherir durante 48 hs. Se incubó con el asRPAB durante una semana cambiando las soluciones regularmente cada dos días. Al finalizar el experimento se eliminó el medio de cultivo y las células se despegaron con 1 ml de solución de tripsina. Se contaron 10 µl de esta suspensión en una cámara de Neubauer. Cada tratamiento se realizó en octuplicados y se graficó número medio de células / ml ± DS.

Purificación de ARN:

Se extrajo el ARN total a partir de 0.4 g de tejido congelado utilizando el método de extracción de Chomczynski y Sacchi (185). El tejido se disgregó en un mortero con N₂ líquido y el polvo se homogeneizó hasta completa disolución en 4 ml de solución D. Se agregó 200µl de acetato de sodio 2M pH 4 y se mezcló bien. Se agregaron 4 ml de fenol saturado con citrato y se separaron las proteínas de los ácidos nucleicos con dos extracciones sucesivas con 4 ml de cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 49/1 centrifugando a 12.000 rpm, 4° C, 15 min cada vez. El ARN se precipitó de la fase acuosa superior agregando isopropanol frío e incubando toda la noche a -20° C. Luego, se centrifugó a 12.000 rpm, 4° C, 30 min. El precipitado se disolvió en 150 µl de solución D y se precipitó nuevamente con isopropanol durante 2 hs a -20° C. Luego de la segunda centrifugación, el precipitado se lavó con etanol 75 % y se dejó secar al aire. Finalmente, el ARN se disolvió en 50 µl SDS 0.1% y se guardó a -70° C.

Ensayo de protección a RNasa:

Se basa en utilizar una sonda marcada con ($\alpha^{32}\text{P}$)-dNTPs para detectar la expresión y estructura de un gen. La ribosonda forma un híbrido con el ARN de interés y luego se trata con RNasa para digerir regiones de la ribosonda que no hayan formado híbridos con el correspondiente ARN. El fragmento protegido y marcado se separa en un gel de poliacrilamida y se visualiza exponiendo el gel a una película fotográfica. La sonda utilizada se muestra en la Figura 2-4 y fue desarrollada por el Dr. Asaithamby en el laboratorio de la Dra. Shyamala (Lawrence Berkeley Laboratory):

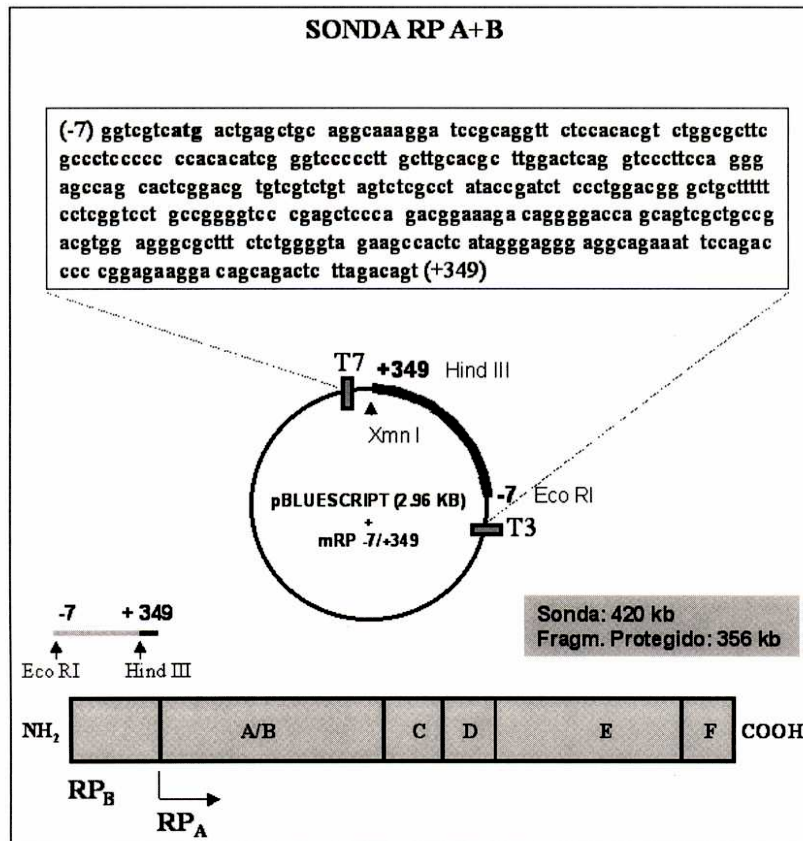


Figura 3: Clonado y obtención de la sonda PR A+B.

La sonda se diseñó para detectar los niveles de expresión de las dos isoformas del RP. Utilizando el ADNc del RP de ratón (mPR17) (186), se subclonó un fragmento de 356 pb, correspondiente a los nucleótidos -7 a +349 dentro del vector pBluescript (Stratagene) digerido con Hind III y Eco RI. Esta región corresponde a la N-terminal de PR_B y la 5' no traducida de PR_A. La ribosonda (antisentido) se transcribió con el kit "Maxiscript *in vitro* transcription kit" (Ambion, TX, USA) linearizando el plasmido con Xmn I y transcribiendo luego con T3 ARN polimerasa en presencia de ($\alpha^{32}\text{P}$)CTP. La ribosonda resultó en un transcripto con un tamaño total de 420 pb, de las cuales 356 pb hibridaron completamente con PR_B y PR_A, correspondiendo a los nucleótidos -7 a + 349. Los ensayos se realizaron con 10 μg de ARN total extraído de tumores o útero, usando el kit "RPAll ribonuclease protection assay kit" (Ambion). La ribosonda se agregó en exceso para asegurar la linealidad del ensayo. El producto de hibridación protegido y marcado con ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP se purificó extrayendo con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y se analizó en un gel de poliacrilamida 5 % seguido de autorradiografía. Los niveles de expresión de las dos isoformas del RP se cuantificaron utilizando el software Image Quant[®] (Molecular Dynamics, Version 3.3), se normalizaron a los niveles de β -actina.

Análisis Estadístico:

Las diferencias entre los tratamientos *in vivo* se evaluaron realizando una regresión lineal para cada tratamiento y comparando diferencias entre las pendientes. Las diferencias en la distribución subcelular del RP en las etapas del ciclo estral se compararon con la prueba "t" de Student para datos apareados. En los experimentos de proliferación celular y recuento de células, las diferencias entre concentraciones de un único tratamiento y el control se compararon usando ANOVA y "t" de Tukey para comparar grupos entre sí. Las diferencias entre medias de dos tratamientos se evaluaron con una prueba "t" de Student. La intensidad de las bandas se cuantificó usando el software Image Quant[®] (Molecular Dynamics, Versión 3.3); sólo se cuantificaron exposiciones no saturadas. Para evaluar las diferencias entre la intensidad de las isoformas del RP en tumores de animales tratados y sin tratar con MPA (proporción RP_A/RP_B) sólo se compararon muestras separadas en el mismo gel y se utilizó la prueba "t" de Student para datos apareados. El análisis de los PMS

se realizó trazando una recta de regresión con los valores correspondientes a cada marcador y su movilidad en el gel. En función de estos datos se calculó el PM de cada banda en el gel.

PARTE III



RESULTADOS

CAPÍTULO 1

I. CRECIMIENTO DE LAS LINEAS TUMORALES *IN VIVO*, EVALUACIÓN DE PROGESTAGENO-DEPENDENCIA E INDEPENDENCIA

Los tumores se definen como progestágeno-dependientes (PD) si crecen en animales tratados con MPA y no crecen o lo hacen mucho más tarde en ratones ovariectomizados. El grado de hormono dependencia varía entre los distintos tumores, y dentro de un mismo tumor va disminuyendo con los sucesivos pasajes *in vivo*. En la Figura 3-1A se muestra un ejemplo de un pasaje temprano de un tumor progestágeno-dependiente. Este tumor crece dentro de los primeros 40 días de transplantado en animales tratados con MPA (depósito sc de 20 mg) y no crece en animales sin MPA u ovariectomizados. A medida que se avanza en el número de los pasajes el tumor va creciendo más rápido en animales con MPA (dentro de los primeros treinta días), crece en animales sin MPA (aproximadamente a los dos meses de transplantado) y luego de por lo menos seis meses en animales ovariectomizados. En este caso particular, los tumores inoculados en hembras con operación simulada (y sin MPA) crecieron inicialmente pero luego se reabsorbieron. Este resultado podría deberse a que el proceso operatorio es un factor de estrés que podría estar influyendo sobre la acción de las hormonas ováricas.

Los tumores progestágeno-independientes crecen en forma similar en animales tratados con MPA, no tratados, ovariectomizados y con operación simulada (Figura 3-1B). En la figura se muestra un pasaje tardío de un tumor progestágeno-independiente. Su velocidad de crecimiento es en general mayor que la de los tumores progestágeno-dependientes y también aumenta con el número de pasajes *in vivo*.

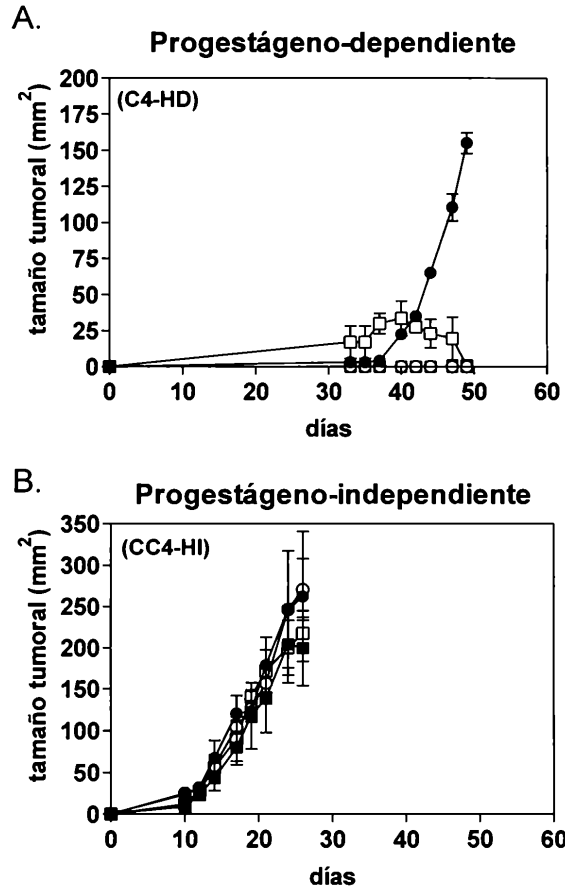


Figura 3-1: Crecimiento de adenocarcinomas mamarios murinos *in vivo*. Los tumores se transplantaron con trocar en el flanco inguinal derecho de animales ovariectomizados (■), con operación simulada (□), inoculados sc en el flanco inguinal izquierdo con un depósito de MPA (20 mg/ratón) (●) y controles (○). El tamaño se midió cada 2 días con un calibre (largo x ancho). En el gráfico se indica tamaño tumoral medio \pm DS. Se muestra una curva representativa de cada tipo de tumor.

II. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRADIOL Y ANTIPROGESTÁGENOS *IN VIVO* DE LOS TUMORES PROGESTÁGENO-INDEPENDIENTES

En experimentos previos del laboratorio se había demostrado que tumores progestágeno-independientes eran capaces de regresionar completamente luego del tratamiento con E_2 o los antiprogéstágenos mifepristona u onapristona (Montecchia et al 1999), sugiriendo que el RP estaría involucrado en el crecimiento progestágeno-independiente. Nuestro objetivo fue evaluar la respuesta a estos tratamientos en los nueve tumores progestágeno-independientes desarrollados en el laboratorio (Figura 3-2). Observamos que de las nueve líneas estudiadas seis respondieron regresionando al tratamiento con antiprogéstágenos (C4-HI, CC4-HI, 59-2-HI, C7-2-HI, 32-2-HI y 53-HI) mientras que las otras tres no lo hicieron (C4-2-HI, 59-HI y C7-HI). Basándonos en estos resultados dividimos a los tumores en dos clases: progestágeno-independientes respondedores (PI-R) y progestágeno-independientes no respondedores (PI-NR).

GRUPO C4

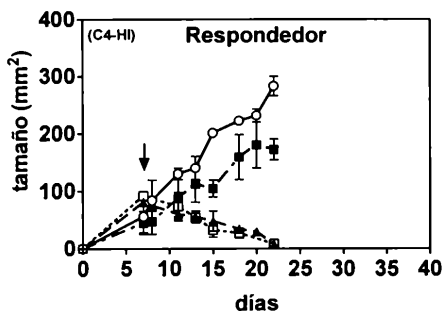
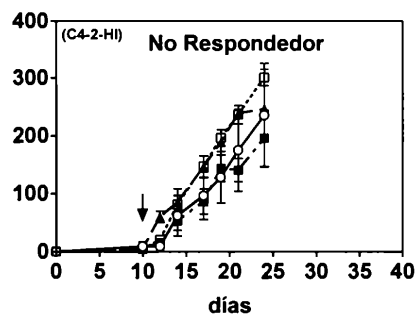
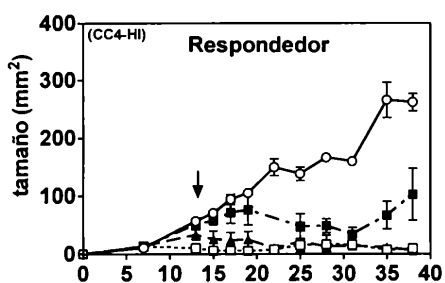
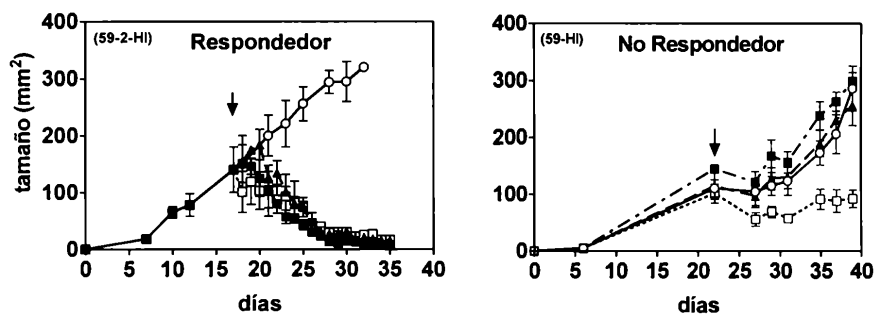
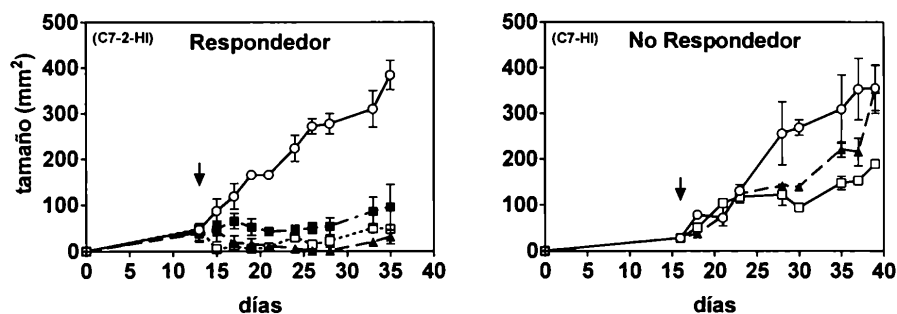


Figura 3-2: Respuesta *in vivo* al tratamiento con antiprogéstágenos y E_2 . La leyenda continúa en la página siguiente.

GRUPO 59



GRUPO C7



GRUPO 32 Y 53

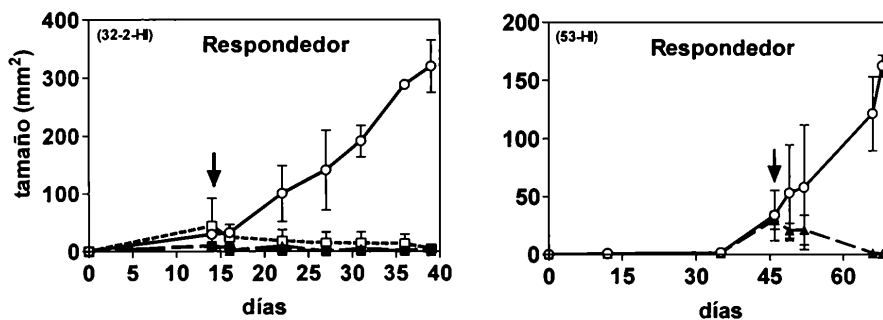


Figura 3-2: Respuesta *in vivo* al tratamiento con antiprogéstágenos y estradiol. El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 25–100 mm². Se utilizaron 3-4 animales por grupo. Los tratamientos consistieron en implante dorsal de un pellet de estradiol (5mg; □), o inoculaciones sc diarias de onapristona (10 mg / kg; ■), mifepristona (6.5 mg / kg; ▲) y control (O). El tamaño tumoral se midió cada 3-4 días (largo x ancho). Los experimentos en los tumores C4-HI, 59-2-HI y 59-HI se repitieron con tres pasajes distintos; en los tumores CC4-HI, C4-2-HI y 32-2-HI se realizaron sobre dos pasajes distintos; en los tumores C7-2-HI, C7-HI y 53-HI los experimentos se realizaron sobre un único pasaje. La flecha indica el inicio de los tratamientos.

Con el tratamiento de onapristona no se observó regresión completa en los tumores CC4-HI y C4-HI, pero las diferencias con el control fueron significativas ($p < 0.05$). Se observó la misma tendencia en todos los experimentos realizados sobre estos dos tumores. El tumor 59-HI mostró respuestas discordantes al tratamiento de E_2 . En un pasaje temprano respondió interrumpiendo su crecimiento, pero los experimentos se repitieron en pasajes más avanzados donde en un caso no se observaron diferencias con el control, en otro experimento algunos tumores se mantuvieron sin modificaciones y otros crecieron en forma similar a los controles. Dado que el tratamiento con los antiprogéstágenos creció igual que el control, a este tumor se lo clasificó como no respondedor.

III. RESPUESTA A MPA *IN VITRO* DE LÍNEAS PROGESTÁGENO-DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES

El efecto proliferativo del MPA sobre tumores progéstágeno-independientes se comparó con el de tumores PD. Realizamos experimentos *in vitro* en los que evaluamos la proliferación de las células provenientes de un cultivo primario por incorporación de (3H)-timidina.

Para evaluar los tumores PD, se utilizaron cultivos primarios del tumor CC4-HD (Figura 3-3). La respuesta al MPA fue bifásica. Se observaron dos pendientes, una a concentraciones muy bajas ($EC_{50} = 1.5 \pm$

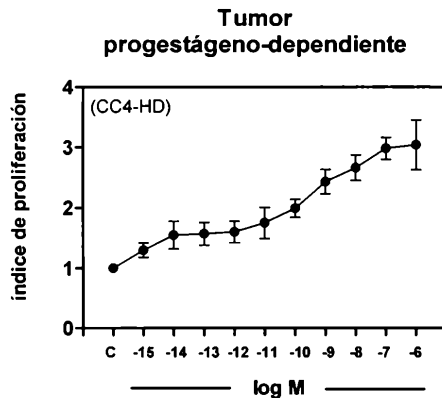


Figura 3-3: Ensayos de proliferación por incorporación de (3H)-timidina en cultivos primarios de un tumor progéstágeno-dependiente. Las células se sometieron a concentraciones crecientes del progéstágeno MPA durante 48 hs. La proliferación celular se midió por incorporación de (3H)-timidina. C es el control sin tratamiento (2.5 % SFB ch). Los valores se refieren al control y se graficaron como índice de proliferación. Se observa una respuesta proliferativa y bifásica con $EC_{50} = 1.5 \pm 0.7$ fM y 0.33 ± 0.3 nM. Experimento representativo de tres.

0.7 fM) y la otra a concentraciones más altas ($EC_{50} = 0.33 \pm 0.3$ nM), que está dentro del orden del K_d del RP reportado previamente (Maggi 1984).

Se evaluó el efecto del MPA en cuatro de las nueve líneas progestágeno-independientes (Figura 3-4). Las células de los tumores PI-R, CC4-HI y C7-2-HI respondieron al MPA proliferando. Sin embargo, el índice de estimulación fue bajo, apenas 1.5 veces mayor que el control y la ventana para ver el efecto fue más acotada. Se observó una estimulación máxima de 1.5 veces mayor que la proliferación basal. Esto indicaría que ya existe una proliferación basal mayor en los tumores PI-R que PD. Por otro lado, las células epiteliales de los tumores PI-NR, C4-2-HI, C7-HI y 59-HI (el último no se muestra) no respondieron al MPA en el rango de concentraciones estudiado excepto C4-2-HI en 10^{-6} M.

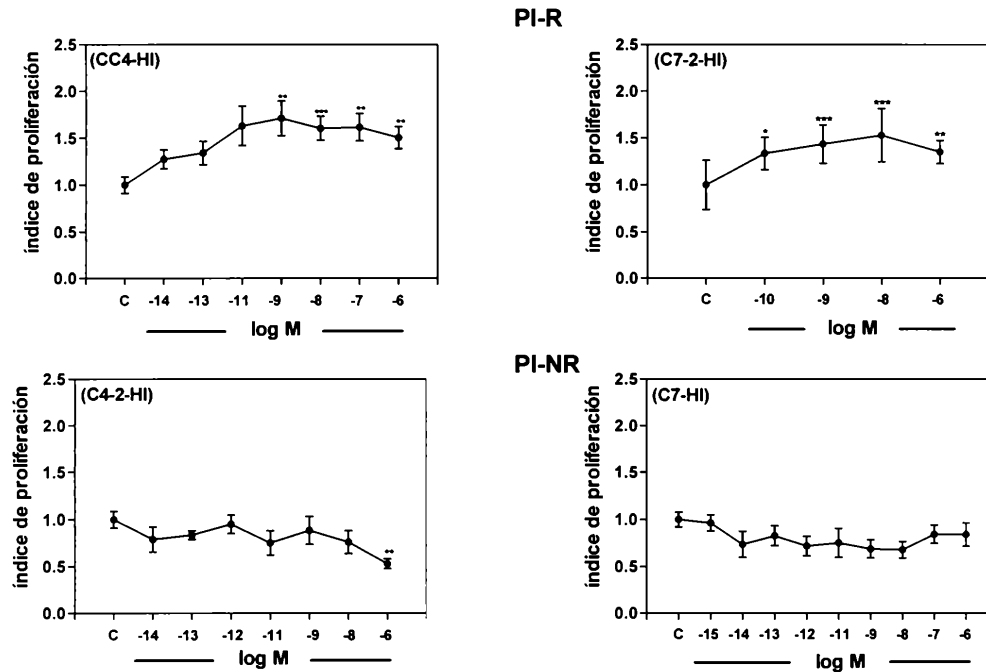


Figura 3-4: Ensayos de proliferación por incorporación de (3 H)-timidina en cultivos primarios. Las células se sometieron a concentraciones crecientes del progestágeno MPA durante 48 hs. Los valores se refieren al control sin tratamiento (C: 2.5 % SFBch) y se graficaron como índice de proliferación. Se muestra un experimento representativo de un total de dos para CC4-HI ; de tres para C7-2-HI; de cuatro para C4-2-HI y de siete para C7-HI.
*: $p < 0.01$; **: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$.

IV. EFECTO DEL ESTRADIOL Y ANTIPROGESTÁGENOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES PROGESTÁGENO-INDEPENDIENTES

Evaluamos los efectos de los antiprogéstágenos y del E₂ en cultivos primarios de tumores PI-R y PI-NR utilizando la técnica de incorporación de (³H)-timidina. Los antiprogéstágenos mifepristona y onapristona inhibieron la proliferación celular de los cultivos primarios de tumores PI-R (Figura 3-5 A-B). El E₂ ejerció un efecto inhibitorio más evidente en el tumor C7-2-HI que en el CC4-HI. *In vivo*, los antiprogéstágenos o E₂ no sólo inhiben el crecimiento sino que inducen regresión total (excepto onapristona en CC4-HI). La proliferación celular de los cultivos de tumores PI-NR no se vió afectada por ninguno de los tratamientos (Figura 3-5 C-E). En la figura se muestran experimentos representativos de: dos para CC4-HI; tres para C7-2-HI, C4-2-HI y 59-HI; cinco para C7-HI.

La respuesta diferencial de los tumores progéstágeno-independientes observada *in vivo* e *in vitro* podría deberse a que en los PI-NR, los antiprogéstágenos no tienen efecto inhibitorio por falta de unión a su receptor. Para probar esta hipótesis realizamos experimentos de unión del radioligando al RP.

V. UNIÓN DEL RADIOLIGANDO AL RECEPTOR

Curvas de desplazamiento: Se realizan para evaluar y comparar la capacidad de distintos agonistas y antagonistas de unirse a un receptor. Se incubaron extractos tumorales totales con el progéstágeno (³H)-R5020 y se desplazó el pegado específico con dos progéstágenos, R5020 y MPA, y dos antiprogéstágenos, mifepristona y onapristona, no radioactivos en concentraciones crecientes en el rango de 1x10⁻⁴ - 2x10⁻⁴ nM.

Dado que la respuesta proliferativa bifásica de las células del tumor CC4-HD sugería la presencia de dos sitios receptores, realizamos experimentos de desplazamiento en este tumor. Observamos curvas típicas de dos sitios receptores (Figura 3-6A) con dos EC₅₀: 1.96 pM y 5.1 nM. Para estudiar si este fenómeno era característico del tumor o, si también se detectan dos sitios receptores en un tejido normal, decidimos realizar los mismos experimentos en útero de hembras vírgenes de dos meses de edad. En el tejido normal

también se obtuvieron dos pendientes para el desplazamiento de R5020 con EC50: 1.86 pM y 2.01 nM (Figura 6B). En la Tabla 3-1 se muestran los datos del experimento de la Figura 3-6A para que se pueda comparar la variación de la radioactividad unida y desplazada en cada punto.

En los tumores PI-R, los agonistas MPA y R5020, y los antagonistas mifepristona y onapristona desplazaron (^3H)-R5020 en forma concentración dependiente (Figura 3-7). Con los cuatro compuestos se obtuvieron curvas bifásicas, indicando el desplazamiento de dos sitios receptores. Los valores de EC50 fueron: R5020 = 2.4 ± 0.5 pM y 30.4 ± 6.78 nM (n = 8); MPA = 4.8 ± 1.3 pM y 91.42 ± 9.68 nM (n = 3); mifepristona = 3.13 ± 0.9 pM y 60.2 ± 15.8 nM (n = 4); onapristona = 4 ± 2.06 pM y 94.13 ± 4.67 nM (n = 3). En el sitio de alta afinidad las EC50 no variaron significativamente entre los distintos compuestos (excepto R5020 vs. MPA, $p < 0.05$). La EC50 del sitio de baja afinidad del R5020 fue significativamente menor a la del MPA ($p < 0.001$), mifepristona ($p < 0.01$) y onapristona ($p < 0.001$). La EC50 correspondiente al sitio de menor afinidad también fue significativamente distinta entre mifepristona y MPA ($p < 0.05$) y mifepristona vs onapristona ($p < 0.01$). La afinidad relativa al R5020 (100 %) fue para los sitios de mayor y menor afinidad: mifepristona (77 % y 50 %), MPA (50 % y 33 %) y onapristona (60 % y 32 %) respectivamente.

No se observó desplazamiento con los agonistas ni los antagonistas en los tumores PI-NR (no se muestra).

Curvas de saturación: Una manera de calcular la constante de afinidad (o su inversa la constante de disociación o Kd) de un receptor es por medio de experimentos de saturación. En este caso se incubaron extractos totales de los tumores con concentraciones crecientes del agonista (^3H)-R5020 en un rango de 0.01 -30 nM. Por análisis de Scatchard se obtuvo la Kd y el número total de sitios receptores (Q).

En un análisis con todos los puntos, sólo se detectó el sitio de menor afinidad (el clásico). Los valores de Kd y Q para útero normal, tumores PD y PI-R (Figura 3-8) fueron Kd: 9.2 ± 4.2 nM, Q: 376 ± 64 fmoles/mg de proteína (n = 8) (ver panel izquierdo). Posteriormente decidimos analizar por separado los datos obtenidos con baja concentración de (^3H)-R5020 (0-50 pM), que también se ajustan a una curva de saturación (ver panel derecho). Para estos sitios de alta afinidad y baja capacidad el Kd y Q fué 43 ± 9 pM y 9 ± 3 fmoles/mg de proteína (n = 8), respectivamente. Una observación interesante es que el número total

de sitios receptores de alta afinidad siempre representó 2-3 % del contenido total de RP. En la Tabla 3-2 se muestran los datos de un experimento representativo del tumor PI-R. Ninguno de estos sitios se pudieron ver en los tumores PI-NR (no se muestra). Como a lo largo de todo el rango de concentraciones evaluado hubo intervalos donde se obtuvo una diferencia significativa entre total unido y desplazado, no descartamos la posibilidad de algún tipo de interferencia en la unión como por ejemplo alta concentración lipídica, interacción fuerte con otras proteínas o ADN, etc...

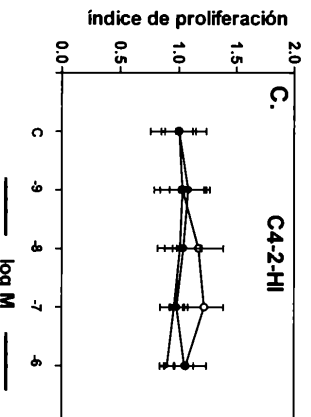
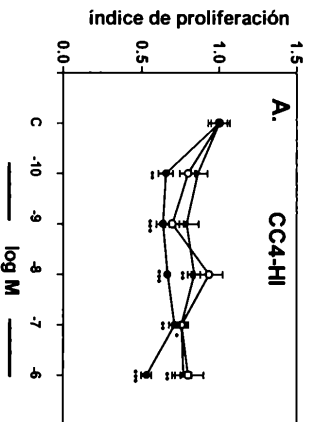
Número total de RP: Además del análisis de Scatchard también evaluamos los niveles de RP en las fracciones nucleares y citosólicas en el punto de saturación (Tabla 3-3). En los tumores PD ($p < 0.01$) y PI-R el contenido de RP fue mayor en el citosol que en el núcleo ($p < 0.05$). Además, en los tumores PD los niveles de RP en ambas fracciones se regularon negativamente por MPA ($p < 0.01$). No se observaron diferencias significativas entre tumores PD creciendo sin MPA y PI-R. En el 48 % (35/73) de las muestras de tumores PI-NR se pudieron determinar los niveles de RP, y estos se detectaron principalmente en el núcleo ($p < 0.01$).

Se encontraron variaciones en el número y distribución de los receptores de acuerdo a la etapa del ciclo estral del animal al ser extraído el tumor (Figura 3-9). Los niveles de RP en tumores PD (en animales sin MPA, es decir ciclando normalmente) y PI-R alcanzaron un máximo durante la fase estrogénica (estro) localizándose principalmente en el citosol ($p < 0.001$). En los tumores PI-NR se observó lo opuesto, con la mayoría de los RP en la fracción nuclear durante la fase estrogénica ($p < 0.01$).

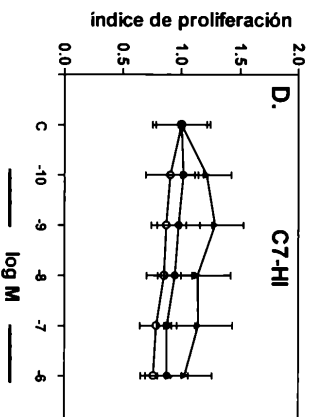
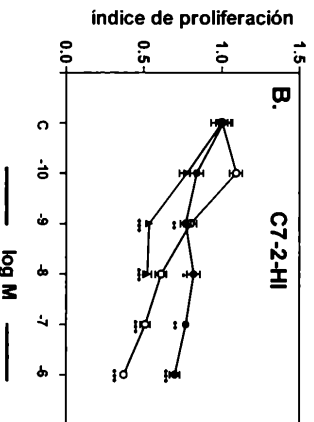
RESPONDEDORES

NO RESPONDEDORES

GRUPO C4



GRUPO C7



TUMOR 59-HI

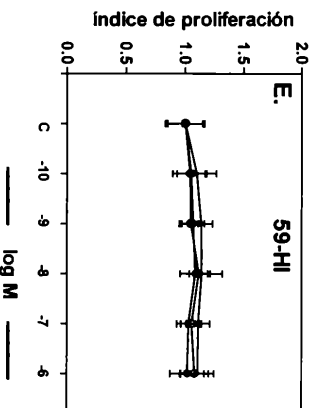


Figura 3-5: Respuesta *in vitro* a E_2 y antiprogesterágenos. El efecto de onapristona (○), mifepristona (●) o E_2 (▲) se evaluó por incorporación de (^3H) -timidina en cultivos primarios de tumores Pt-R y Pt-NR. Se grafica la media \pm SD de octuplicados. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. C = 2.5% SFB ch

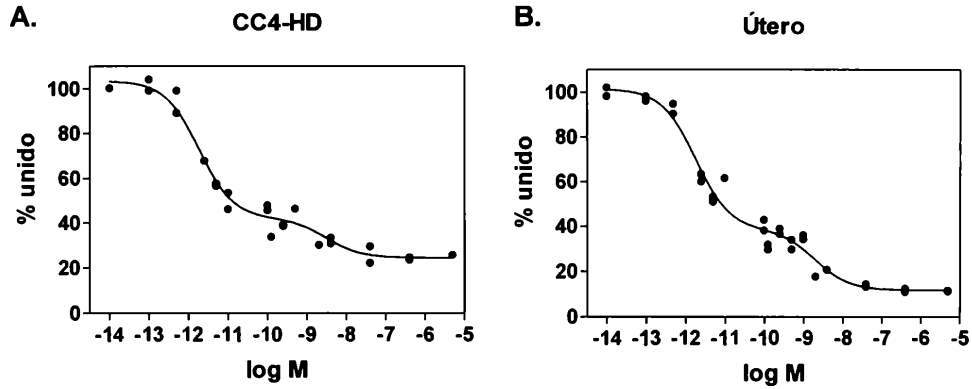


Figura 3-6: Curvas de desplazamiento. Los extractos celulares totales se incubaron por duplicado con 3 nM (3H)-R5020 y se desplazó con R5020 no radioactivo. En el tumor PD y útero normal se observaron dos pendientes con EC50: 1.96 pM y 5.1 nM para CC4-HD; 1.86 pM y 2.01 nM para útero normal.

Tabla 3-1: datos correspondientes al experimento de la Figura 6A

R5020 (nM)	Unido total (cpm)		% Unido	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
0	3639	3633	99.97	100.03
1x10 ⁻⁴	3596	3777	99.00	104
5x10 ⁻⁴	3590	3852	98.84	89.00
2.5x10 ⁻³	2456	1244	67.62	34.25
5x10 ⁻³	2089	2051	57.52	56.47
0.01	1674	1941	46.09	53.44
0.1	1737	1652	47.82	45.48
1	1803	1894	49.64	52.15
2	1675	1678	46.12	46.20
4	1398	1419	38.49	39.07
8	3188	1223	87.78	33.67
25	1092	1762	30.07	48.51
50	1115	1207	30.70	33.23
250	800	1067	22.03	29.38
2.5x10 ³	889	853	24.48	23.48
2x10 ⁴	1164	930	32.05	25.61

El porcentaje unido se calculó como cpm unidas en cada punto/cpm unidas totales sin desplazar. Los valores tachados no se incluyeron en el análisis.

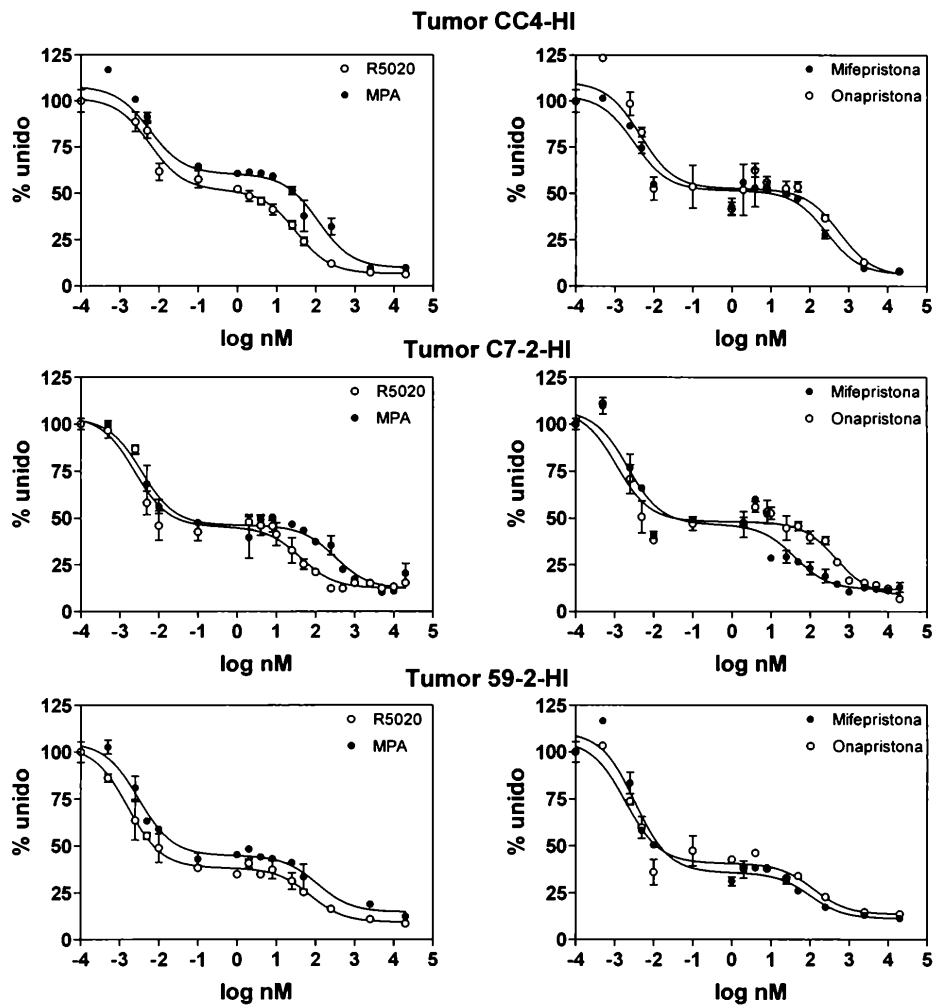


Figura 3-7: Curvas de desplazamiento en tumores PI-R. Los extractos celulares totales se incubaron por duplicado con 3 nM (^3H)-R5020 y se desplazó con R5020, MPA, mifepristona u onapristona no radioactivas. Se incubó durante 18 hs a 0° C y luego la hormona se eliminó con carbón dextrano. Se graficó la media \pm DS. Las curvas son representativas de al menos dos experimentos con cada compuesto sobre el mismo tipo de tumor.

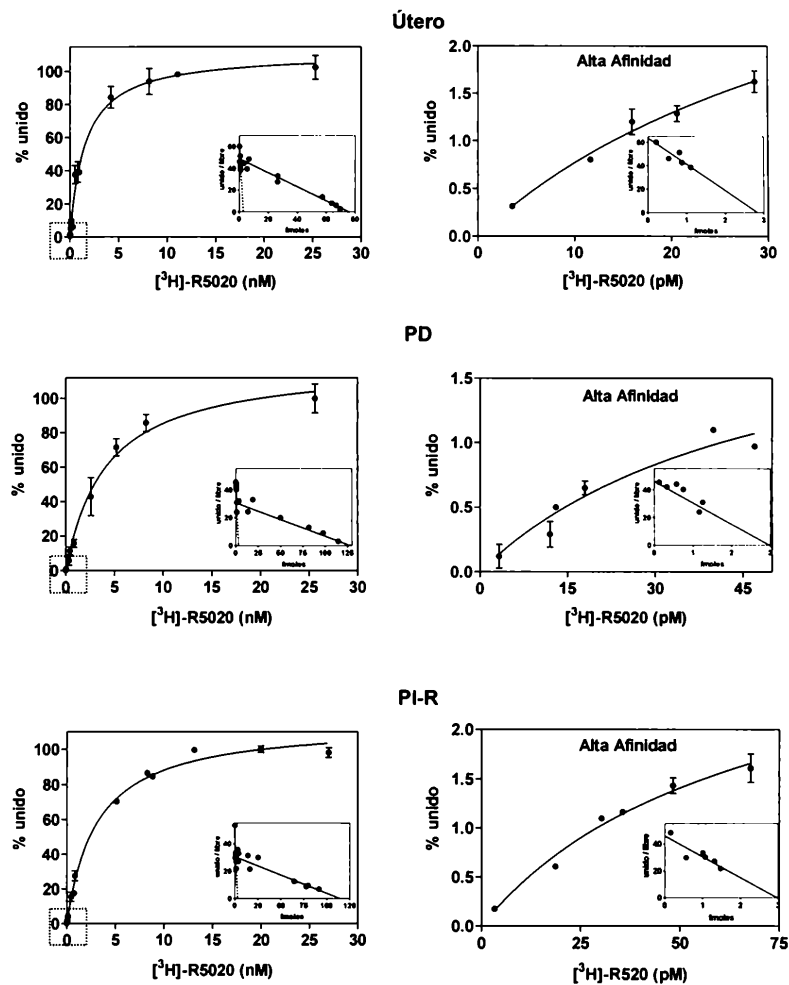
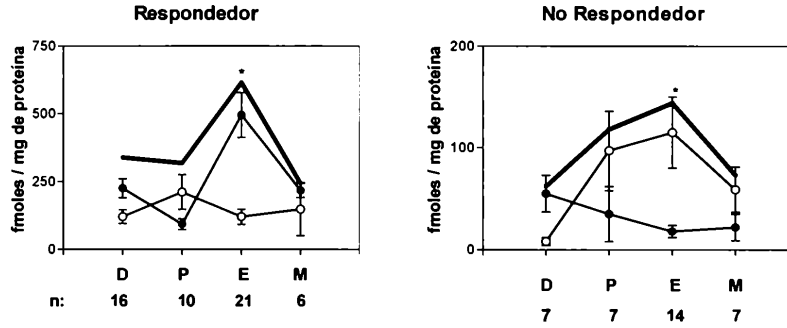


Figura 3-8: Curvas de saturación y análisis de Scatchard. Los extractos celulares totales de útero normal, un tumor PD (CC4-HD) y un tumor PI-R (CC4-HI) se incubaron con concentraciones crecientes de (³H)-R5020 desde 5 pM hasta 30 nM. Los paneles de la izquierda muestran la curva y análisis incluyendo todos los puntos. El recuadro punteado en la parte inferior izquierda de los gráficos está ampliado en los paneles de la derecha y representa sólo los puntos correspondientes a bajas concentraciones de (³H)-R5020. Paneles derechos: en esta escala se observa el sitio de mayor afinidad. Útero y CC4-HD experimentos representativos de dos; CC4-HI representativo de cuatro.

Progestágeno – independientes



Progestágeno - dependiente

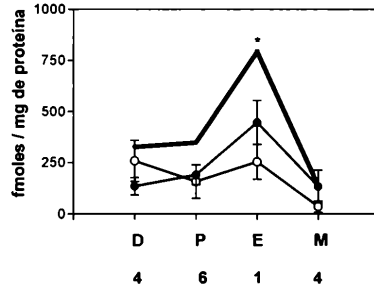


Figura 3-9: Variación de RP nucleares y citosólicos en el ciclo estral. La etapa del ciclo se verificó antes del sacrificio de los animales. El número de RP totales se determinó a punto único de saturación sobre las fracciones nucleares (○) y citosólicas (●). La línea gruesa indica la cantidad total en las dos fracciones. D: diestro; P: proestro; E: estro; M: metaestro.*: $p < 0.001$.

VI. RESUMEN:

En nuestro laboratorio desarrollamos tumores que se mantienen *in vivo* con un patrón de crecimiento PD y que *in vitro* responden al MPA proliferando. De los sucesivos pasajes singeneicos de estos tumores se seleccionaron o surgieron espontáneamente variantes con un patrón de crecimiento progestágeno-independiente. Estas variantes tienen dos tipos de comportamiento *in vivo* frente al tratamiento con E₂ y antiprogestágenos, algunas regresionan (PI-R) y otras siguen creciendo (PI-NR). *In vitro* se observó que las células de los tumores PI-R mantienen la capacidad de ser estimuladas por MPA aunque en menor grado que las PD, y que los antiprogestágenos y E₂ inhiben la proliferación. Las células de tumores PI-NR no modifican su índice de proliferación con los tratamientos.

En experimentos de desplazamiento y saturación encontramos que en útero normal, tumores PD y PI-R se encuentran dos sitios receptores para el RP, uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad. No fue posible ajustar los datos de tumores PI-NR al análisis de Scatchard y por lo tanto no se pudo obtener una K_d. Evaluando el número total de RP se observó que en el 48 % (35/73) de las muestras de estos tumores existiría unión a un sitio aceptor ("receptor") de progestágenos presente en menor cantidad que en los tumores PD y PI-R. Este sitio "receptor" se detecta principalmente en el núcleo y estaría regulado por hormonas ováricas al igual que en los tumores PD y PI-R. La falta de respuesta a progestágenos y antiprogestágenos de los tumores PI-NR podría deberse a que:

- Estos compuestos no se unen al RP.
- La cantidad de RP que expresan estos tumores no es suficiente para obtener una respuesta proliferativa.
- Los receptores están localizados mayormente en el núcleo formando parte de un complejo proteico, constitutivamente activados (Ej. Complejo de preiniciación activando ciertos genes) e impedido de interactuar con el ligando.
- No expresan RP clásicos.

CAPÍTULO 2

I. EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DEL RP

El objetivo de estos experimentos fue caracterizar la expresión de isoformas del RP en todos los tumores de nuestro modelo e investigar una posible correlación con la respuesta hormonal, ya sea progestágeno-dependencia/independencia, o respuesta al tratamiento endocrino.

Especificidad de los Anticuerpos utilizados:

Para detectar estas proteínas por *Western blot* utilizamos 2 anticuerpos monoclonales y uno policlonal. Si bien este último fue obtenido contra el antígeno de ratón, los monoclonales se obtuvieron de antígenos humanos, por lo que fue necesario verificar su especificidad. Como se muestra en la Figura 4-1, las isoformas RP_A y RP_B de 83 y 115 kDa respectivamente se detectaron con todos los anticuerpos en el útero normal (wt) y no hubo marcación en músculo ni útero PRKO.

Expresión de isoformas del RP en tumores progestágeno-dependientes (PD), progestágeno-independientes respondedores (PI-R) y progestágeno-independientes no respondedores (PI-NR):

Una vez comprobada la especificidad de los anticuerpos se procedió a la caracterización de la expresión de las distintas isoformas de RP en todos los tumores de nuestro modelo. En las Figuras 4-2 a 4-6, se muestran los resultados representativos de al menos cinco muestras de cada tumor con el anticuerpo Ab 7 y de al menos dos con el Ab 1. En experimentos seleccionados de los grupos C4 y C7 se utilizó también el anticuerpo Ab 5.

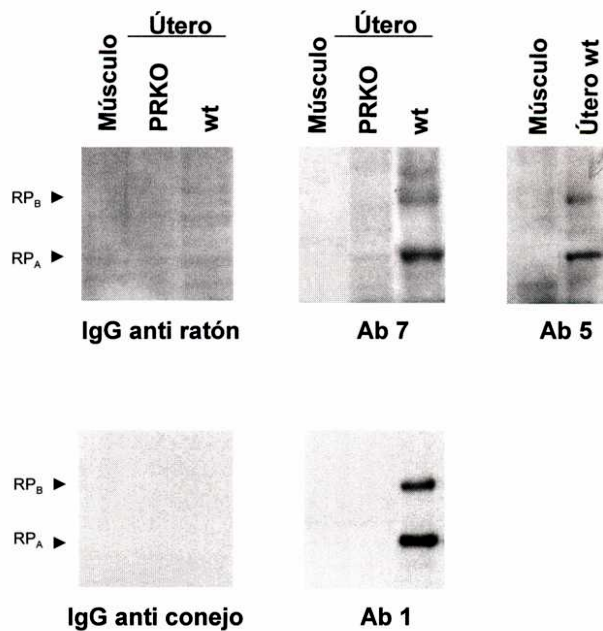


Figura 4-1: Expresión de RP en tejidos control. Se separaron 100 μ g de proteínas totales en un SDS-PAGE 7.5 % y se transfirió a nitrocelulosa. Las proteínas se detectaron con los anticuerpos Ab 7, Ab 5 o Ab 1. La señal se visualizó por quimioluminiscencia. Los paneles de la izquierda muestran el control de especificidad de los anticuerpos secundarios.

GRUPO C4: En todas las muestras de tumores PD y PI-R se detectaron las isoformas RP_A , RP_B y en un 60 % una nueva banda de 78 kDa nunca antes descrita en carcinomas mamarios de ratón (Figura 4-2). Estas bandas se observaron con menor intensidad en el tumor PI-NR (C4-2-HI). En este tumor, la isoforma RP_B se detectó en 5/15 muestras evaluadas con el Ab 7. Con el anticuerpo policlonal Ab 1 y el monoclonal Ab 5 también se detecta la banda de 78 kDa. Con este último anticuerpo las isoformas de RP también son detectadas con menor intensidad en el tumor no respondedor y de hecho RP_B no se observó en este caso.

Las bandas de 69, 92 y 105 kDa se observaron con los tres anticuerpos y una intensidad variable al evaluar tumores de todos los grupos. No nos detuvimos en el análisis de las mismas ya que no aparecieron con un patrón definido y también fueron detectadas en útero normal.

GRUPO 59: En todas las muestras evaluadas de los tumores de este grupo se detectaron las isoformas RP_A , RP_B y la banda de 78 kDa (Figura 4-3) con los dos anticuerpos utilizados. No se observaron diferencias en los patrones de expresión del tumor PD (59-HD) y el PI-R (59-2-HI). En el tumor PI-NR (59-HI) estas bandas se detectaron con menor intensidad. En este tumor, la intensidad de RP_B fue tan baja que en algunos casos no pudo verse (como se muestra en la membrana revelada con Ab 7), sólo se detectó en 4/9 muestras analizadas, y la intensidad de la señal fue más fuerte con el anticuerpo Ab 1.

GRUPO C7: Dos tumores progestágeno-independientes pertenecen a este grupo, uno responde a la terapia endocrina (C7-2-HI) y el otro no responde (C7-HI). En ambos tumores se detectaron todas las isoformas (Figura 4-4), aunque con menor intensidad en el PI-NR (C7-HI). RP_B se detectó en 14/21 de las muestras evaluadas del tumor C7-HI. La banda de 78 kDa también resultó inmunoreactiva con el anticuerpo Ab 5.

GRUPO 32: Está formado por un tumor PD y uno PI-R. Ambos tumores expresan RP_A , RP_B y en un 90 % de las muestras se detectó la banda de 78 kDa (Figura 4-5).

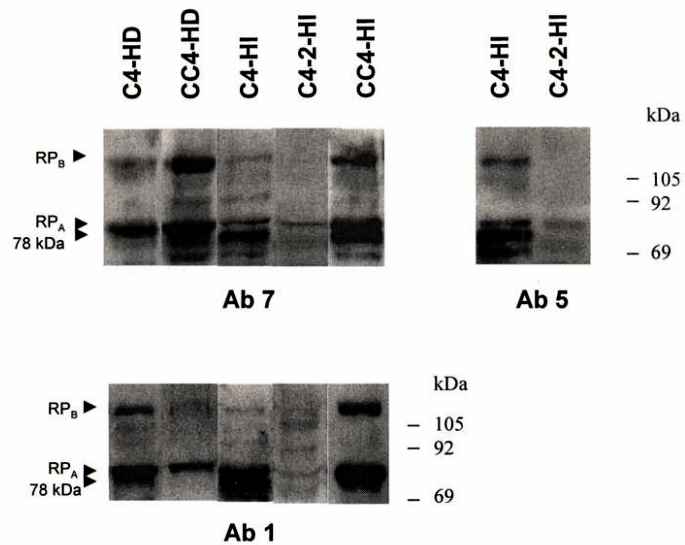


Figura 4-2: Expresión de RP en el grupo C4. Se separaron 100 µg de proteínas totales en un SDS-PAGE 7.5 %. Los tumores C4-HI y C4-2-HI se originaron a partir del C4-HD. El tumor CC4-HI deriva del CC4-HD. Los ejemplos de tumores C4-HD y C4-2-HI corresponden a la misma muestra revelada con Ab 7 y Ab 1. C4-HI es la misma muestra revelada con Ab 7 y Ab 5. Tumores PD: C4-HD y CC4-HD; PI-R: C4-HI y CC4-HI; PI-NR: C4-2-HI.

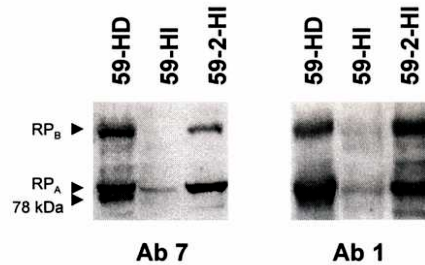


Figura 4-3: Expresión de RP en el grupo 59. Se sembraron iguales cantidades de proteína total (100 µg) en cada calle. Se separaron en un SDS-PAGE 7.5 %, y se revelaron con el anticuerpo Ab 7 o Ab 1. Todos los tumores se originaron del 59-HD. La muestra de 59-HI es la misma revelada con ambos anticuerpos. 59-HD y 59-2-HI son muestras distintas de los tumores y por eso se observan variaciones en la intensidad de la exposición. Tumor PD: 59-HD; PI-R: 59-2-HI; PI-NR: 59-HI.

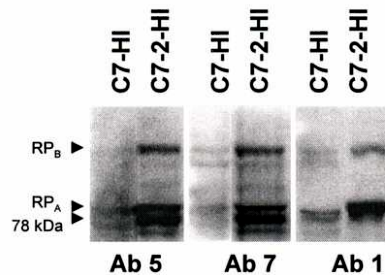


Figura 4-4: Expresión de RP en el grupo C7. Se sembraron iguales cantidades de proteína total en cada calle. Las proteínas se revelaron con los anticuerpos Ab 7, Ab 5 o Ab 1. Los dos tumores derivan de la línea hormono-dependiente C7-HD que ya no está disponible en el laboratorio. Las muestras reveladas con Ab 5 y Ab 7 son las mismas. Tumor PI-R: C7-2-HI; PI-NR: C7-HI.

GRUPO 53: Al igual que el grupo anterior, está formado por un tumor PD y uno independiente respondedor al tratamiento endocrino. Las dos isoformas del RP y la banda de 78 kDa se detectaron con los dos anticuerpos utilizados (Figura 4-6). En este caso la intensidad de la señal con el anticuerpo Ab 1 es menor que en las figuras anteriores, probablemente debido a la pobre calidad de la muestra tumoral.

TUMOR 48-HD: En este tumor PD observamos la banda de 78 kDa en un 100 % de las muestras y las isoformas RP_A y RP_B (Figura 4-6).

Análisis global de expresión de isoformas del RP en los tumores de nuestro modelo:

En la Figura 4-7 se muestran resultados representativos de todos los grupos. Los tumores PD y los PI-R expresan RP_A y RP_B (calles 1 y 3). La banda correspondiente a 78 kDa se detectó en 32/82 (40 %) de los tumores progestágeno-dependientes (calle 2) y en 47/71 (66 %) de los PI-R (calle 4). En los tres tumores PI-NR, la intensidad de estas isoformas fue mucho más baja (calle 5), de hecho RP_B se detectó sólo en 26 de las 56 muestras estudiadas (calle 6).

Regulación de las isoformas del RP por MPA:

En tumores PD y PI-R creciendo en animales tratados con MPA, se observó regulación negativa de todas las isoformas, incluyendo la banda de 78 kDa, (Figura 4-8, panel de la izquierda). No se observó regulación en tumores PI-NR (no se muestra). La proporción RP_A/RP_B en todos los casos fue significativamente mayor a uno ($p < 0.05$). En los tumores PD, el MPA reguló negativamente de igual forma a RP_A y RP_B , y la proporción RP_A/RP_B se mantuvo constante entre animales tratados o no con MPA. La proporción RP_A/RP_B en los tumores PI-R fue significativamente mayor en animales tratados con MPA ($p < 0.05$) debido a que el progestágeno reguló negativamente principalmente a RP_B (Figura 4-8, paneles de la derecha). Un resultado importante que se desprende de este análisis es que, si bien la intensidad con que los anticuerpos detectan a las isoformas es variable, la afinidad relativa que tienen por cada una de ellas se mantiene constante, ya que la relación RP_A/RP_B permaneció dentro de los mismos valores con uno u otro anticuerpo (Figura 4-8, paneles de la derecha).

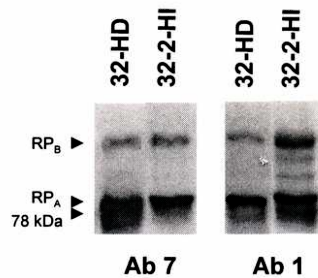


Figura 4-5: Expresión de RP en el grupo 32. El tumor 32-2-HI deriva del 32-HD. Las muestras reveladas con ambos anticuerpos son las mismas, pero el tiempo de exposición con el anticuerpo Ab 1 fue menor. Tumor PD: 32-HD; PI-R: 32-2-HI.

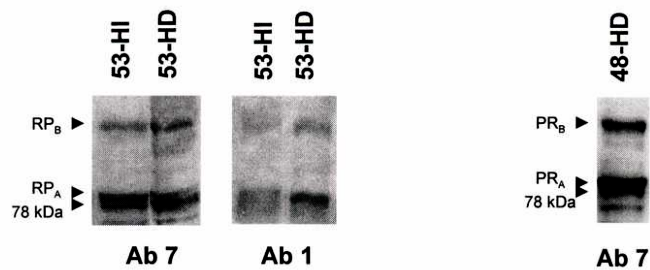


Figura 4-6: Expresión de RP en el grupo 53 y en el tumor 48-HD. El tumor 53-HI deriva del 53-HD. Las muestras incubadas con uno u otro anticuerpo son distintas. Tumores PD: 53-HD y 48-HD; PI-R: 53-HI.

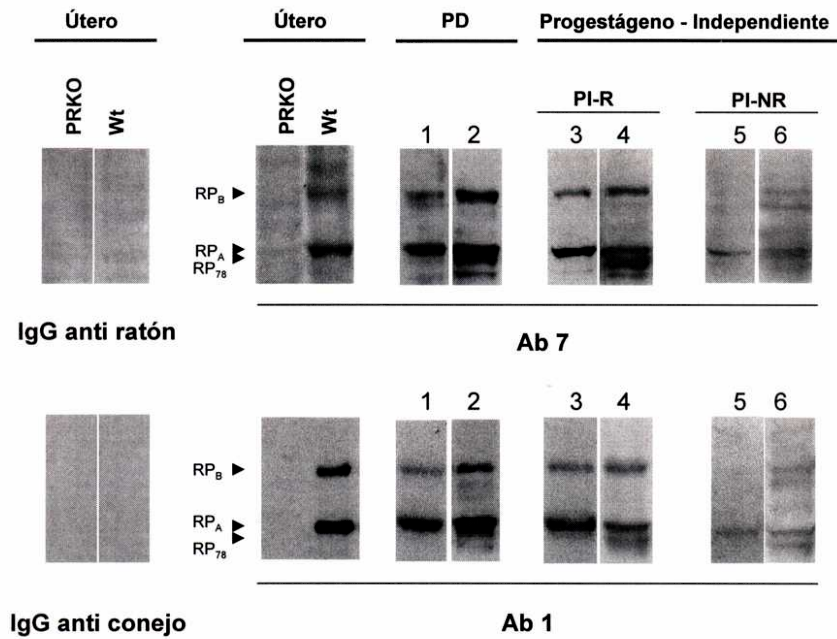


Figura 4-7: Resumen de la expresión de RP en los tumores de todos los grupos. *Western blots* representativos de la expresión de isoformas en tumores PD e independientes. Se separaron 100 µg de proteínas totales en un SDS-PAGE 7.5 % y se revelaron con los anticuerpos Ab 7 y Ab 1. Calle 1: tumor PD mostrando RP_A y RP_B; calle 2: PD mostrando RP_A, RP_B y la banda de 78 kDa; calle 3: tumor PI-R que expresa RP_A y RP_B; calle 4: PI-R donde se detectó RP_A, RP_B, y la banda de 78 kDa; calle 5: tumor PI-NR mostrando sólo la isoforma RP_A; calle 6: tumor PI-NR mostrando todas las isoformas.

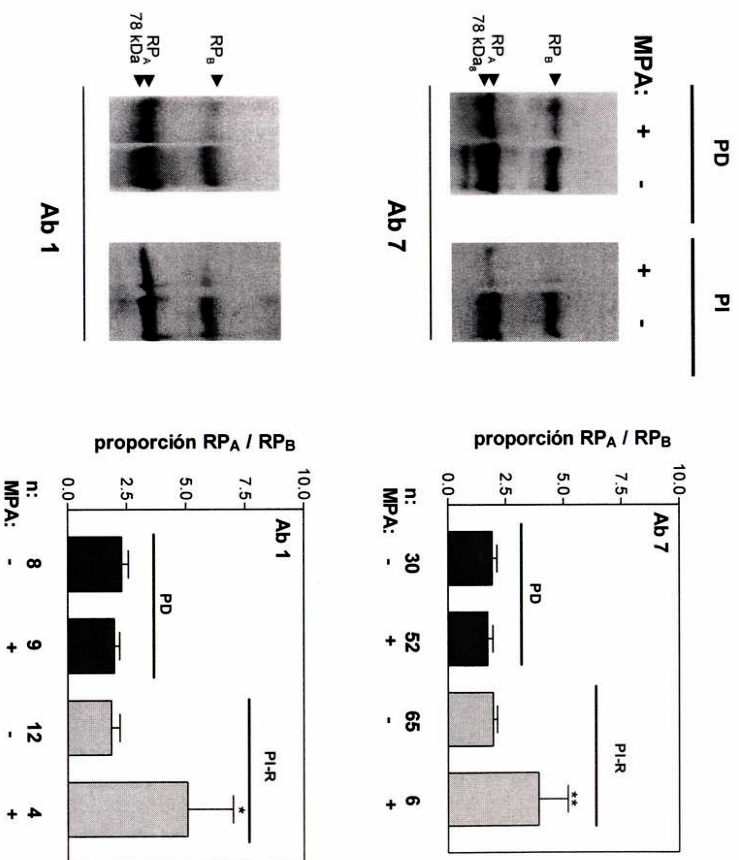


Figura 4-8: Regulación de RP por MPA. Se prepararon extractos celulares totales de tumores creciendo en ratones con (+) y sin (-) MPA. Se sembró 100 µg de proteína total en cada calle y se separaron en un SDS-PAGE 7.5 %. Se reveló con Ab 7 o Ab 1. La intensidad de la señal de RP_A y RP_B se cuantificó en cada muestra y la proporción RP_A/RP_B se comparó dentro del mismo tipo de tumor. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.05$.

Evaluación de la reactividad del anticuerpo Ab 6 (anti RP_B humana) en tumores progestágeno-independientes respondedores y no respondedores a la terapia hormonal:

De los *immunoblots* anteriores se desprende que en los tumores PI-NR la expresión de RP_B sería mucho menor que en los tumores PI-R. Con el objetivo de evaluar estas diferencias realizamos *Western blots* con el anticuerpo monoclonal Ab 6. Este anticuerpo fue desarrollado utilizando RP purificado de carcinoma de endometrio humano (180) y en el presente es comercializado por Neomarkers. Se ha comprobado que detecta RP_B en carcinomas de mama y endometrio (133) (187), en la línea celular T-47D y en tejido normal humano (187). Si bien el catálogo de Neomarkers aclara que no existen estudios en ratón que demuestren una reactividad cruzada de este anticuerpo, Shyamala *et al* (181) lo han utilizado con éxito en glándula mamaria de ratón. En un primer acercamiento probamos el anticuerpo en el control positivo útero, donde se detectó una banda de 115 kDa correspondiente a RP_B y otra banda de 120 kDa con una intensidad muy débil (Figura 4-9), que correspondería según la bibliografía a la isoforma RP_B hiperfosforilada (187;188). En el tejido negativo músculo no se observó señal.

El próximo paso fue evaluar con este anticuerpo la expresión de RP_B en los tumores. En la Figura 4-9 se muestra un resultado representativo de lo observado en los tres grupos estudiados (C4, 59 y C7). Para facilitar la comparación de la posición de las bandas respecto de las isoformas RP_A y RP_B , se muestran los resultados obtenidos con el anticuerpo Ab 7. En los tumores PI-R, el anticuerpo Ab 6 mostró un patrón similar al observado en útero normal. En los tumores PI-NR se observaron ambas bandas (115 y 120 kDa) pero con una intensidad mucho más fuerte, en particular la mayor diferencia se observó en la banda de 120 kDa. Los tumores PD mostraron un patrón de expresión similar al de los tumores PI-R (no se muestra).

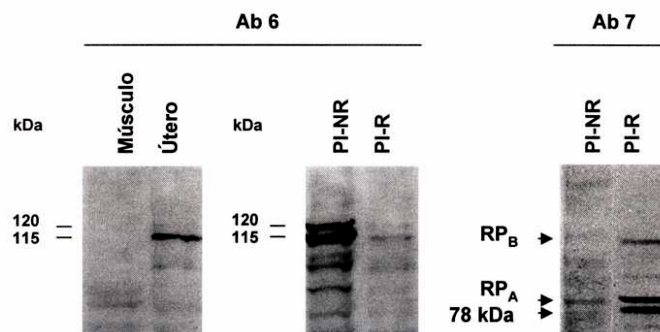


Figura 4-9: Reactividad del anticuerpo Ab 6 en tejidos controles y tumores progestágeno-independientes. 100 µg de proteínas totales se separaron en un SDS-PAGE 7.5 % y se reveló con el anticuerpo Ab 6 o Ab 7. Los resultados son representativos de lo observado en todos los tumores de cada tipo. Se muestran los tumores C4-2-HI (PI-NR) y C4-HI (PI-R) que han sido separados en el mismo gel.

Estos resultados sugerían la posibilidad de mutaciones en el gen del RP, donde los anticuerpos utilizados no detectaban a las isoformas del RP con igual afinidad en los tumores PD y PI-R vs PI-NR. Para verificar esta hipótesis se efectuaron los siguientes estudios:

- a) En colaboración con el Dr. Benavides en MD Anderson Cancer Center se procedió a buscar mutaciones en el gen de RP. Se utilizó la técnica de SSCP (single-stranded conformational polymorphism, no se muestra). No se encontraron mutaciones.
- b) En colaboración con la Dra. Shyamala se probó en *Western blot* el anticuerpo Ab 6 en útero de ratones PRKO. Sorpresivamente, la señal observada en el útero PRKO fue igual a la de útero wt (Figura 4-10).

Con los resultados de SSCP, quedó descartada la hipótesis de reactividad diferencial debido a mutaciones en el gen de RP en los tumores PI-NR.

En un principio estos resultados fueron desalentadores, pero habíamos encontrado un anticuerpo monoclonal que revelaba un patrón diferente de expresión entre tumores PI-NR y PI-R o tejido normal. De hecho, simplemente con un *Western blot* revelado con el anticuerpo Ab 6 se puede predecir si los tumores progestágeno-independientes de nuestro modelo responderán o no al tratamiento endocrino con antiprogestágenos. Decidimos evaluar en qué tejidos se expresan las proteínas reconocidas por el anticuerpo Ab 6. En la Tabla 4-1 se resumen los resultados obtenidos en *Western blot* sobre tejidos provenientes de distintos órganos. Para una mejor comparación del PM de las bandas y correlación con expresión de isoformas del RP se incluyó el Ab 7 en el análisis. En todos los tejidos indicados con una única cruz, se observó un patrón de bandas idéntico al obtenido con los anticuerpos en útero normal. Hígado y corazón están marcados con dos cruces, indicando que en estos casos se observaron las dos bandas (115 y 120 kDa) con mayor intensidad, y un patrón similar a lo observado en los tumores PI-NR. El anticuerpo Ab 6 resultó inmunoreactivo en bazo, donde al igual que con el útero PRKO no se detecta RP_A ni RP_B con el Ab 7.

Para estudiar la regulación hormonal de las proteínas también se extrajeron tejidos de hembras tratadas con MPA (dos días seguidos de proestro) y con pellet de E₂ (dos días seguidos de estro). Sobre las mismas se evaluó la reactividad de los anticuerpos Ab 6 y Ab 7 por *Western blot* (no se muestra).

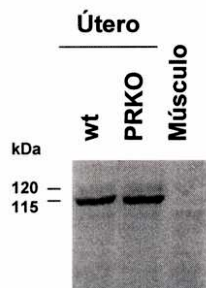


Figura 4-10: Especificidad del anticuerpo Ab 6 en tejidos controles. 100 μ g de proteínas totales se separaron en un SDS-PAGE 7.5 % y se reveló con el anticuerpo Ab 6. La señal se detectó por quimioluminiscencia.

Tabla 4-1: Reactividad de Ab 6 y Ab 7 en tejidos de ratón.

Tejido	Western blot	
	Ab 6	Ab 7
Útero wt	+	+
Útero PRKO	+	-
Vagina	+	+
Ovario	+	+
Mama	+	+
Colon	+	+
Hígado	++	+
Corazón	++	+
Bazo	+	-
Pulmón	-	-
Músculo	-	-
Riñon	-	-
Timo	-	-

Con el Ab 6 no se observó regulación por MPA ni E_2 . En el caso de Ab 7, sí se observó una clara regulación positiva de RP por E_2 y negativa por MPA.

La especificidad del anticuerpo Ab 6 se estudió paralelamente por inmunohistoquímica (Figura 4-11, columna izquierda). El anticuerpo Ab 6 marcó positivamente útero y mama de ratones wt y PRKO. La intensidad y distribución de la marcación no se modificó con el tratamiento hormonal. Un resultado interesante fue que el anticuerpo marcaba núcleos con fuerte intensidad en otros tejidos (Figura 4-11 a-d), donde por *Western blot* se había observado o no reactividad con este anticuerpo. Por ejemplo, en colon (a y b) y ovario (c), se detectaron las proteínas de 115 y 120 kDa y también se marcó por inmunohistoquímica, mientras que en pulmón (d) no se detectaron bandas por *Western blot* pero sí núcleos positivos. Una observación importante es que en estos tejidos la proteína reconocida por Ab 6 tampoco es regulada tal como se muestra en la Figura 4-11, donde los cortes de colon (b), ovario (c) y pulmón (d) fueron realizados en órganos de ratones tratados con MPA y conservan una fuerte marcación. El anticuerpo Ab 7 dio señal positiva en útero y mama tratados con E_2 , indicando una clara regulación positiva por esta hormona. No se detectó marca en tejidos de ratones con MPA. La segunda sorpresa fue que Ab 7 también marcó mama de ratones PRKO. De acuerdo a lo observado por *Western blot* con ambos anticuerpos los resultados con el Ab 6 eran esperados, pero no los obtenidos con el Ab 7.

Estos resultados indican, por una parte, que en los tumores PI-NR se expresan altos niveles de una proteína que también está presente en algunos tejidos normales. La falta de regulación por hormonas en *Western blot* e inmunohistoquímica, sugiere que se trataría de una proteína de reactividad cruzada con el anticuerpo anti-isoforma RP_B humana. Por otra parte utilizando al anticuerpo Ab 7 como control de especificidad en estos experimentos, hemos comprobado que a diferencia de lo informado en estudios sobre tejidos y tumores humanos, Ab 7 no es un anticuerpo adecuado para evaluar expresión de RP en ratón por inmunohistoquímica.

Leyendas de las figuras 4-11 y 4-12:

Figura 4-11: Reactividad del anticuerpo Ab 6 en cortes de tejidos de ratón. Los ratones se trataron durante dos días con pellets de E2 (5mg/animal), o MPA (depósito de 20 mg sc). El grupo control se inoculó con solución fisiológica (SF). Los tejidos se extrajeron y fijaron en formalina al 10 % en PBS. a: colon con solución fisiológica; b: colon con MPA; c: ovario con MPA y d: pulmón con MPA. Contraste nuclear con verde de metilo, aumento 20X

Figura 4-12: Detección de RP por inmunohistoquímica. Todos los tumores muestran marcación nuclear de variable intensidad en un número de células también variable, pero en general mayor que el 50%. G y H corresponden a glándulas mamaria normales de un animal wt, con marcación positiva nuclear, mientras que I y J, de un animal PRKO, no presentan inmunoreactividad. Columna derecha Ab-1; Columna izquierda C-20. Contraste nuclear con verde de metilo, aumento 20X.

Ab 6

Ab 7

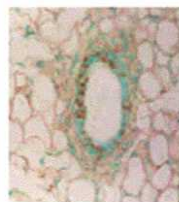
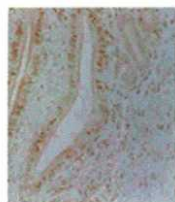
útero

mama

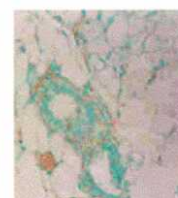
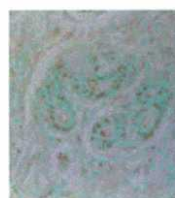
útero

mama

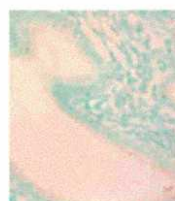
SF



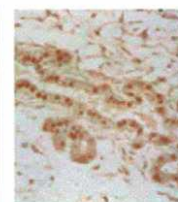
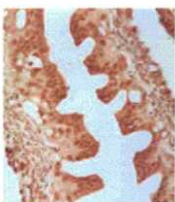
E₂



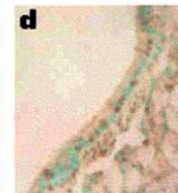
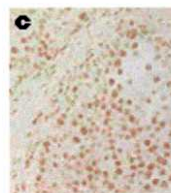
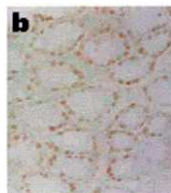
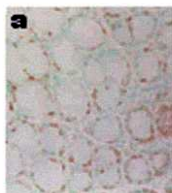
MPA



PRKO



Ab 6



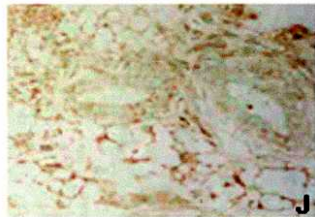
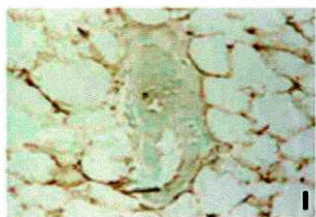
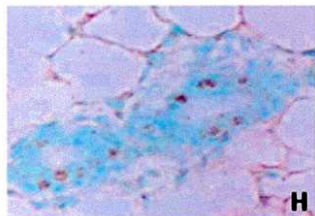
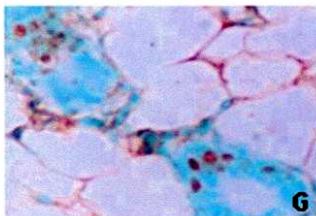
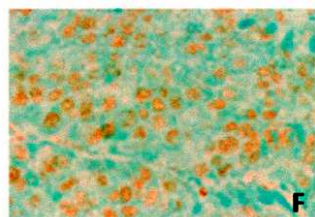
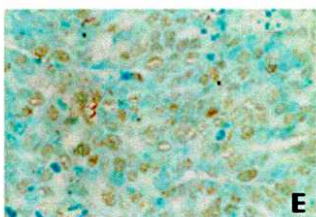
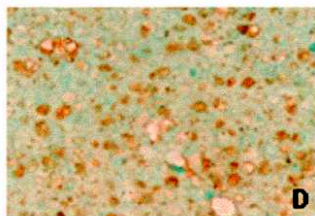
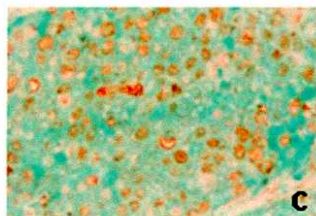
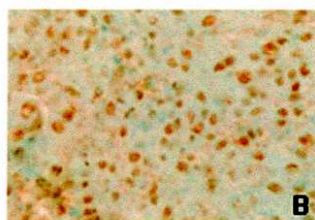
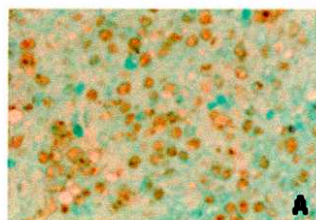
II. EVALUACIÓN DE RP POR INMUNOHISTOQUÍMICA Y PROTECCIÓN A RNAsa:

Investigamos la localización celular del RP y los bajos niveles observados por *Western blot* en los tumores PI-NR, determinando la expresión de la proteína por inmunohistoquímica en cortes de tumores fijados en formalina. Teniendo en cuenta los resultados anteriores para evaluar expresión de RP utilizamos los anticuerpos Ab 1 y PR C-20 que han sido previamente usados en tejidos murinos (189) (123). En la Figura 4-12 se muestra la especificidad de estos anticuerpos en glándula mamaria, donde se observó una señal positiva nuclear en mama wt y no hubo marcación en mama PRKO. Idénticos resultados se obtuvieron sobre útero wt y PRKO (no se muestra). En la Figura 4-12 se muestran resultados obtenidos en un tumor PD (32-HD, A y B), uno PI-R (C4-HI; C y D) y un tumor PI-NR (C7-HI; E y F) con el anticuerpo PR C-20 (paneles de la izquierda) o Ab 1 (paneles de la derecha); los mismos son representativos de lo observado en todos los tumores. Hubo marcación positiva en los tres tipos de tumor y no se encontraron diferencias significativas en el patrón de marcación entre ellos. El porcentaje de marcación no varió significativamente entre los tres tipos de tumores y estuvo entre 40-60 % de núcleos positivos.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica sugieren que no habría diferencias en la expresión de RP entre los tumores PI-R y PI-NR, mientras que por *Western blot*, se habían observado menores niveles de RP en los últimos. Esto podría deberse a que:

1. Podría haber una población de RP truncados que no se detectan por *Western blot*, que no hace binding pero se marcan en inmunohistoquímica.
2. Se expresa menos RP, pero por inmunohistoquímica el umbral para detectar positivos es más bajo y diferencias muy por encima del umbral no son detectadas.
3. Modificación post-traducciona que disminuye la reactividad en *Western blot*, es decir que sólo estoy detectando la fracción no modificada y el resto no es reconocido por los anticuerpos.

La hipótesis 1 quedó descartada con los estudios de SSCP, pero igualmente realizamos *Western blot* en los tumores progestágeno-independientes respondedores y no respondedores abarcando un rango de PM entre 200-10 kDa para detectar posibles receptores truncados y no observamos diferencias en el patrón de expresión de los mismos (no se muestra).



204

Para decidir si 2 y 3 eran posibilidades válidas, estudiamos los niveles de ARN del RP. Realizamos ensayos de protección a RNasa utilizando una sonda que detecta simultáneamente las isoformas RP_A y RP_B (Figura 4-13). No se observaron diferencias en los niveles de ARN de los tumores PI-R y PI-NR.

Los niveles similares de RNA de RP detectados en los tumores respondedores y no respondedores a la terapia endocrina indican que la reactividad diferencial observada en *Western blot* se debería a alteraciones en la proteína que disminuyen la afinidad de los anticuerpos en esta técnica.

III. EXPRESIÓN DE RE:

Dado que uno de los efectos del E₂ es inducir la expresión de RP a través de su unión al RE decidimos investigar la posibilidad de que en los tumores PI-NR los niveles bajos de expresión de RP se debieran a diferencias en la expresión de RE. Se evaluó RE α en todos los tumores. Los resultados indican que esta proteína se expresa en todos los tumores y que la intensidad de la señal no correlaciona con el tipo de respuesta al tratamiento hormonal (Figura 4-14).

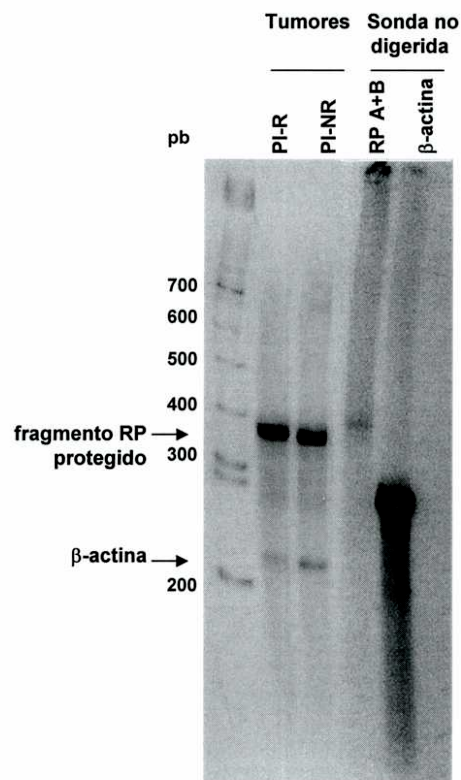


Figura 4-13: Niveles de ARN totales en un tumor PI-R y otro PI-NR. Se sembraron 10 μ g de ARN total en cada calle y las muestras se separaron en un urea-PAGE 5 %. Se indica la posición del fragmento de sonda protegido correspondiente a todo el ARN con secuencia homóloga al RP. El gel se secó en vacío y se expuso a una película radiográfica.

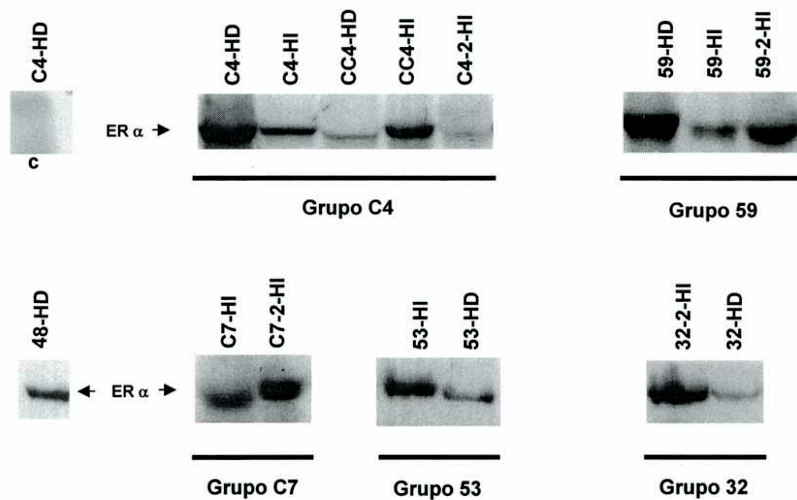


Figura 4-14: Expresión de RE en tumores progestágeno-dependientes e independientes. Se separaron 100 μ g de proteínas totales en un SDS-PAGE 12 %. Se reveló con el anticuerpo policlonal MC-20. C: control de especificidad del anticuerpo secundario anti-conejo. Tumores PD: C4-HD, CC4-HD, 59-HD, 32-HD, 53-HD y 48-HD; PI-R: C4-HI, CC4-HI, 59-2-HI, C7-2-HI, 32-2-HI y 53-HI; PI-NR: C4-2-HI, 59-HI y C7-HI.

IV. RESUMEN:

Observamos que los tumores de crecimiento progéstágeno-independiente pero que responden al tratamiento endocrino, tienen el mismo patrón de expresión de isoformas de RP que los tumores PD, excepto que en los primeros el MPA regula principalmente RP_{β} . Por otra parte, los tumores PI-NR, sobre los que no se pudo realizar un análisis de Scatchard, pero que tienen sitios que unen al ligando determinados por ensayos de punto único en condiciones de saturación, expresan una menor cantidad de RP por *Western blot*. Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y protección a RNasa indicaron que no existen diferencias en la expresión de RP entre tumores PI-R y PI-NR. No se encontraron evidencias para correlacionar estas diferencias con el patrón o nivel de expresión de RE_{α} .

Los experimentos con el anticuerpo Ab 6 mostraron que según el patrón de expresión por *Western blot* se podría predecir la respuesta de los tumores a hormonas. Sin embargo, la ubicuidad de la expresión de esta proteína en otros tejidos de otros órganos, y la falta de regulación hormonal de la misma indica que no se trataría de RP_{β} . Dilucidar la identidad de la misma requerirá de futuros experimentos. Por último, el anticuerpo Ab 7 utilizado en inmunohistoquímica sobre cortes en parafina de tejidos PRKO mostró una inmunoreactividad nuclear y específica, pero a diferencia de lo observado con el Ab 6, la intensidad de la marcación se reguló hormonalmente. Estos resultados indican que no es apropiado para la determinación de RP murino por inmunohistoquímica.

Todos estos resultados llevan a pensar que los tumores PI-NR expresarían un RP alterado cuyas isoformas no son detectadas en *Western blot* debido a una modificación post-traduccional que afectaría la afinidad de los anticuerpos. También podría haber pérdida de la estabilidad por interacción con otras proteínas, o disminución de la tasa de traducción del ARN.

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL RP EN TUMORES PROGESTÁGENO-INDEPENDIENTES NO RESPONDEDORES

Anteriormente, nuestro grupo había demostrado utilizando oligonucleótidos antisentido que el RP era necesario para la proliferación celular de cultivos primarios de un tumor PD (CC4-HD) y de uno PI-R (59-2-HI). En este trabajo investigamos si el RP también está involucrado en el crecimiento de los tumores PI-NR.

Se utilizaron oligonucleótidos de secuencias antisentido al gen de RP (asRP). Hasta el momento, se han descrito tres posibles mecanismos de acción: a) En general las secuencias antisentido son complementarias a la región 5' del gen, por lo que al formarse el híbrido doble cadena (ADN-ARN) el complejo ribosomal no puede ensamblarse y se inhibe la traducción; b) Forman una doble cadena con el ARN que codifica a la proteína en cuestión y el híbrido ADN (asRP)-ARN (RP) es degradado por RNAsas y c) Forman estructuras ternarias (por ejemplo triple hélices) con el ADN impidiendo la expresión del gen. Ninguna de las técnicas ensayadas que utilizan estos mecanismos parece ser efectiva para eliminar completamente los niveles de ARN en una célula, pero lo que debe quedar claro es que independientemente del mecanismo el resultado final será una disminución de los niveles de la proteína. En nuestro caso, la efectividad del asRP de bloquear la síntesis del receptor se evaluó midiendo la concentración de RP por la técnica de unión del radioligando (^3H)-R5020 en célula entera a punto único de saturación. Como en los tumores PI-NR la intensidad de las bandas por *Western blot* es muy tenue, no fue posible evaluar diferencias debido al tratamiento con el asRP. El efecto del asRP sobre el crecimiento los tumores PI-NR se evaluó *in vitro* en ensayos de proliferación por incorporación de (^3H)-timidina y por recuento celular.

Se evaluó el efecto de dos oligonucleótidos con secuencias complementarias a distintas regiones del RP. Uno de ellos inhibe la expresión de ambas isoformas (asRPAB) (184), y el otro tiene una secuencia diseñada para inhibir la síntesis del RP_b (asRPB). El efecto de ambos oligonucleótidos sobre la

proliferación celular se evaluó primero en la línea celular de mama normal de ratón NMuMg que no expresa RP (Figura 5-1A). Ninguno de los oligonucleótidos inhibió la proliferación celular en las concentraciones usadas (Figura 5-1B y C). Tampoco se observaron diferencias cuando se evaluó la secuencia control scrRPAB (Figura 1D). Estos resultados indican que en estas concentraciones los asRP no ejercen efectos inhibitorios inespecíficos mediados por otras vías independientes del RP.

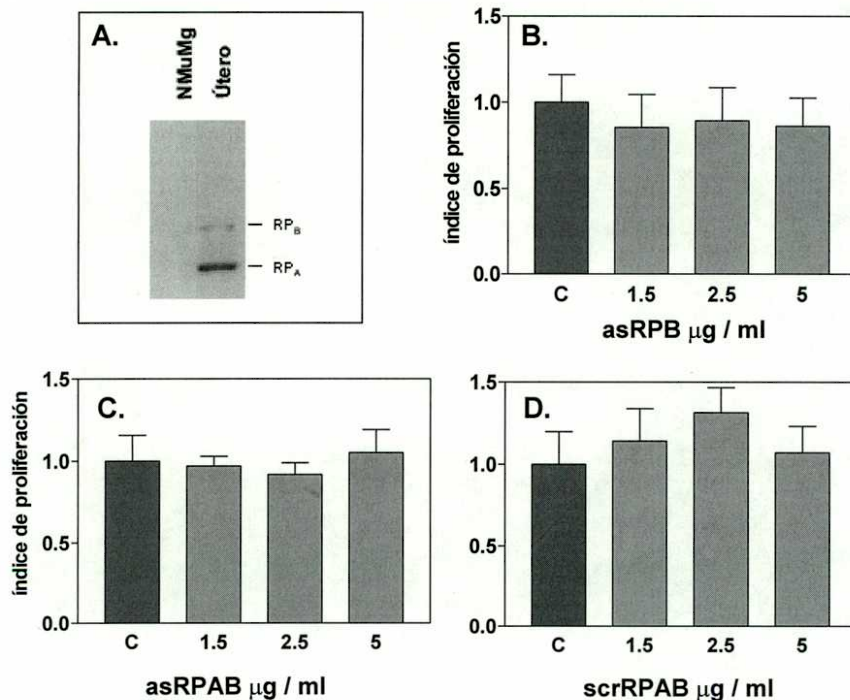


Figura 5-1: Efecto de oligonucleótidos antisentido del RP (asRP) sobre la incorporación de (³H)-timidina en la línea celular NMuMg. A. La línea celular utilizada no expresa RP_A ni RP_B. B. asRPB, experimento representativo de cuatro; C. asRPAB, representativo de dos y D. scrRPAB, es un único experimento. Los puntos representan la media ± DS. El índice de proliferación se calculó como cpm en cada punto/cpm en el control no tratado (C: 2.5 % SFBch).

Para controlar que los asRP eran funcionales, se realizó primero la evaluación de sus efectos en un tumor PI-R (CC4-HI), donde ambos oligonucleótidos inhibieron significativamente la proliferación celular a partir de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$), mientras que el control con el scrRPAB no tuvo efecto (Figura 5-2A). El efecto inhibitorio de asRPAB coincidió con un bloqueo completo de la capacidad del RP para unir el ligando (Fig 5-2B). El número de RP/ 10^5 células fue de 83 fmoles en el grupo control y no pudo determinarse en el tratado con asRPAB ya que como se observa en el gráfico, no hay diferencias entre los grupos incubados con (^3H)-R5020 y (^3H)-R5020 + R5020 (100 veces más concentrado). El tratamiento con el oligonucleótido control scrRPAB provocó una ligera disminución de la unión del ligando de 5 % (79 fmoles/ 10^5 células). Por otro lado, el tratamiento con el asRPB inhibió la unión de la hormona en un 7%. La falta de bloqueo de sitios receptores no correlaciona con la inhibición de la proliferación observada con este oligonucleótido. Probablemente, las concentraciones de asRPB usadas no hayan sido suficientes para ver una disminución de la hormona unida debido a que también está presente la isoforma RP_A.

El tratamiento de los cultivos primarios de tumores PI-NR (59-HI, C7-HI y C4-2-HI) con los oligonucleótidos antisentido inhibió la proliferación celular medida como incorporación de (^3H)-timidina (Figura 5-3 A-C). El oligonucleótido control scrRPAB no ejerció ningún efecto (Figura 5-3A). Para corroborar los resultados obtenidos se realizó el recuento de células luego de seis días de tratamiento con el asRPAB. En los tres casos, el oligonucleótido antisentido provocó una disminución significativa del número de células (Figura 5-3 D-F).

En los tumores C4-2-HI y 59-HI, la inhibición de la proliferación celular correlacionó con una disminución del número de RP (Figura 5-4 A-C). En el tumor C4-2-HI la concentración de RP fue de 7 fmoles/ 10^5 células en el grupo control y 4 fmoles/ 10^5 células en el tratado con asRPAB (40 % inhibición); la secuencia control scrRPAB no modificó el número de receptores (7 fmoles/ 10^5 células, 9 % de inhibición) (Figura 5-4A). En otro experimento, sobre el mismo tumor, el asRPB inhibió la unión del ligando un 24 % (25 fmoles/ 10^5 células en el grupo tratado y 33 fmoles en el grupo control) (Figura 5-4B). En el tumor 59-HI el tratamiento con asRPAB inhibió completamente la unión de la hormona y con

el asRPB la disminución fue del 50 %. La concentración de RP/10⁵ células fue 153 fmoles en el control, no detectable en el grupo tratado con asRPAB y 77 fmoles en el tratado con asRPB.

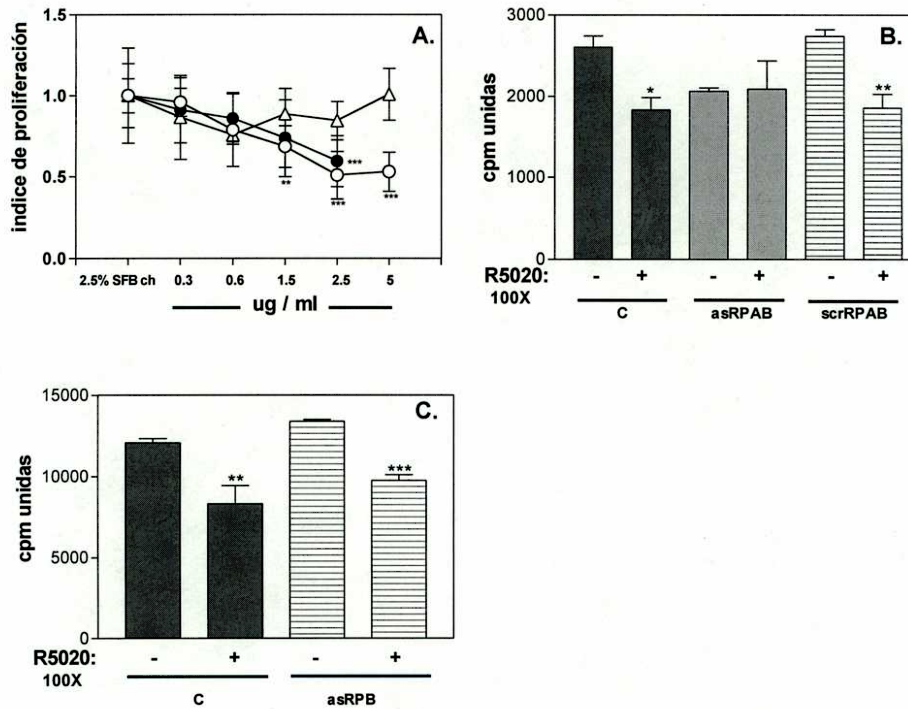


Figura 5-2: Efecto de asRP en cultivos primarios de un tumor PI-R. A. Se evaluó el efecto de los oligonucleótidos asRPAB (○); asRPB (●) y el control scrRPAB por incorporación de (³H)-timidina. El índice de proliferación se calculó como cpm experimental/cpm en el control no tratado (2.5 % SFBch). B y C. Medición de RP en célula entera. (△), todos en una concentración de 5 µg/ml. Las células se incubaron durante 3 hs a 37° C con (³H)-R5020 30 nM con o sin 3 µM de R5020 no radioactivo. Se lavó rigurosamente, las células se levantaron con tripsina y se midió la radioactividad incorporada. Se grafica la media de cpm unidades ± DS. Se calculó la diferencia entre cpm unidades en el grupo incubado sólo con (³H)-R5020 y el grupo con (³H)-R5020 + 100 veces exceso de R5020. La diferencia es la unión específica y en base a ese valor se calculó el número de receptores. *: p<0.01; **: p<0.05, ***: p<0.001. C es el control sin tratamiento incubado con 2.5 % SFBch. B. Control = 83 fmoles/10⁵ células; asRPAB = no detectable; scr RPAB = 79 fmoles / 10⁵ células. C. Control = 14 fmoles / 10⁵ células; asRPB = 13 fmoles / 10⁵ células.

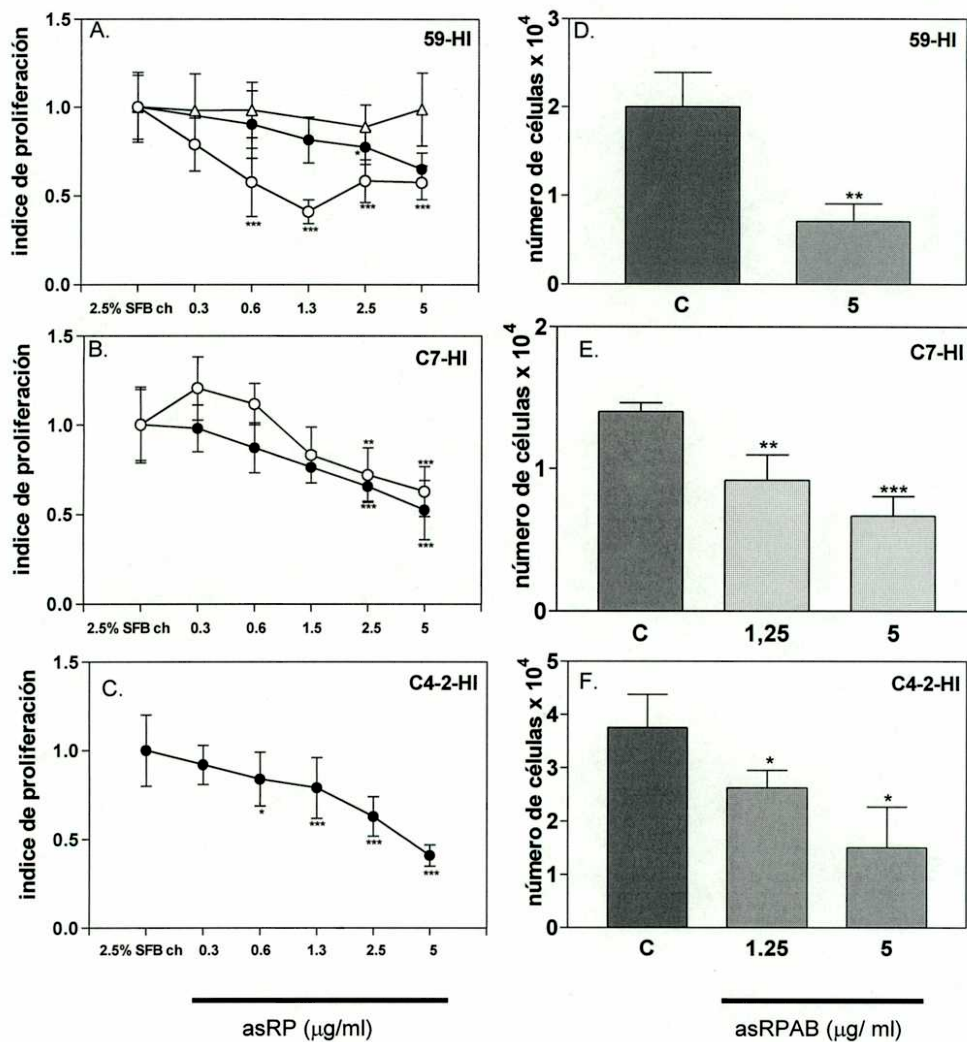


Figura 5-3: Efecto de asRP sobre la incorporación de (³H)-timidina y el crecimiento celular de cultivos primarios de tumores PI-NR. A-C. Incorporación de (³H)-timidina, asRPAB (○); asRPB (●) y el control scrRPAB (△). Se grafica media ± DS. El índice de proliferación se calculó como cpm experimental/cpm en el control no tratado (2.5 % SFBch). Se muestran resultados representativos de dos para 59-HI, cuatro para C7-HI y cuatro para C4-2-HI. D-F. La proliferación celular se evaluó por recuento de células para concentraciones elegidas. Las células se incubaron durante seis días con los oligonucleótidos. Se grafica la media de octuplicados ± ES. C: control 2.5 % SFBch. *: p<0.01; **: p<0.05; ***: p<0.001.

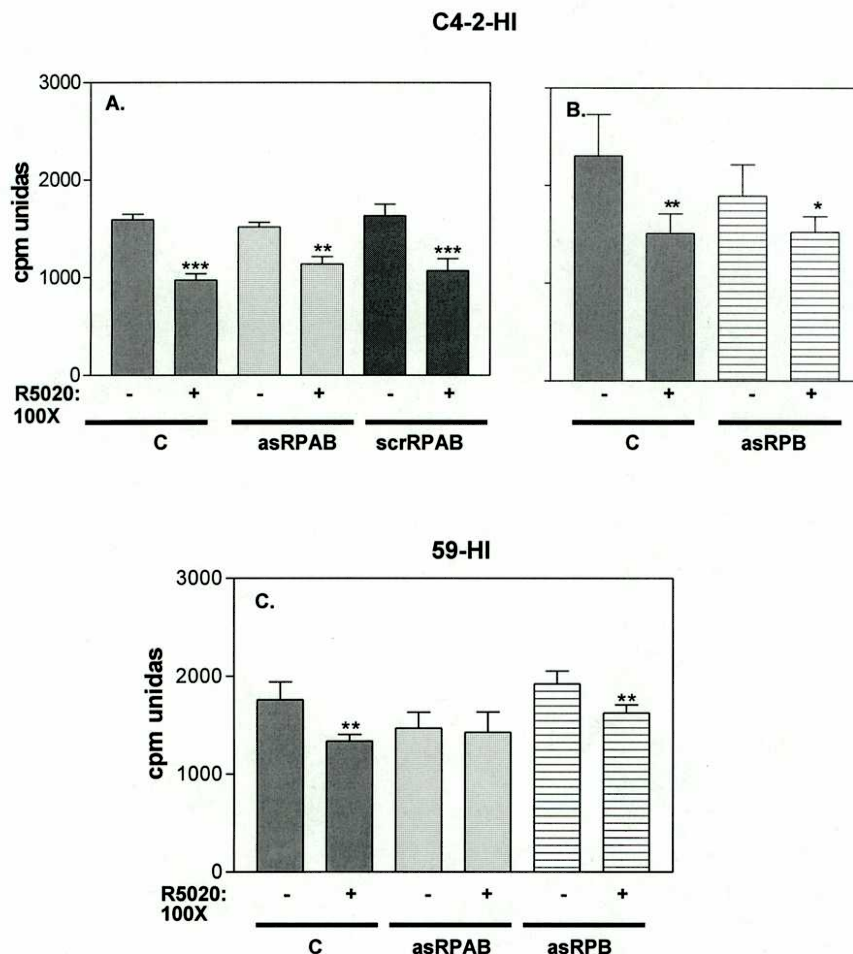


Figura 5-4: Efecto de asRP sobre el número de RP evaluados por técnica de unión del ligando a punto único de saturación en cultivos primarios de un tumor PI-NR. La diferencia entre cpm medias \pm DS de los grupos incubados en presencia o ausencia de hormona no radioactiva indica la unión específica. A. Tumor C4-2-HI tratado con asRPAB o el control scrRPAB. B C4-2-HI con asRPB. C. Tumor 59-HI tratado con asRPAB o asRPB. La concentración de RP se indica como fmoles / 10^5 células y fue: para el tumor C4-2-HI (A): C = 7, asRPAB = 4 (40 % inhibición) y scrRPAB = 7; (B): C = 33 y asRPB = 25 (24 % inhibición); para 59-HI C = 153, asRPAB = no detectable y asRPB = 76 (50 % inhibición). C: control 2.5 % SFBch. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.05$. ***: $p < 0.001$.

II. RESUMEN

Los resultados obtenidos, si bien son preliminares y deben ser analizados con cautela son prometedores e involucrarían al RP en el crecimiento tumoral progestágeno-independiente de tumores que no regresionan con antiprogestágenos.

PARTE IV



**DISCUSIÓN
CONCLUSIONES**

En este trabajo de Tesis caracterizamos patrones de respuesta a los progestágenos, las hormonas tróficas, y a los antiprogestágenos, hormonas inhibitorias, en carcinomas mamarios murinos ductales inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA), y correlacionamos estos patrones de comportamiento con la expresión de RP y su funcionalidad.

En el laboratorio ya se había establecido que los tumores PD podían adquirir la capacidad de crecer en forma autónoma, lo que denominamos crecimiento progestágeno-independiente. Habíamos demostrado que los RP estaban involucrados en el crecimiento tumoral ya que los mismos regresionaban con tratamiento con antiprogestágenos *in vivo*, e *in vitro* el tratamiento con asRP inhibía la proliferación celular. Los tumores PI-R serían los más representativos del cáncer de mama humano; crecen sin el aporte exógeno de hormonas pero pueden todavía responder a una terapia endocrina.

En este trabajo de Tesis evaluamos la respuesta a antiprogestágenos de variantes progestágeno-independientes. De los nueve tumores evaluados, seis respondieron al tratamiento y se denominaron PI-R mientras que los tres restantes no respondieron y se clasificaron como PI-NR.

Esta respuesta diferencial de los tumores nos llevó a investigar posibles diferencias a nivel de los RP que pudieran explicar la resistencia hormonal. Cuando estudiamos la respuesta a hormonas *in vitro* en cultivos primarios, los tumores PI-R conservaron la sensibilidad a MPA, aunque mostraron una respuesta proliferativa mucho menor que los PD, y se inhibieron tanto con E₂ como con antiprogestágenos. Curiosamente, esta respuesta inhibitoria no parece ser tan drástica como los efectos observados *in vivo*, lo que sugiere la participación de mecanismos sistémicos o una interacción con el estroma tumoral. Los efectos inhibitorios de la proliferación *in vivo* como *in vitro* de antiprogestágenos en cáncer de mama han sido documentados en otros modelos experimentales (190). *In vitro*, los tumores PI-NR no respondieron al MPA y fueron insensibles a los antiprogestágenos y al E₂. Curiosamente, los tumores PI-NR también son menos sensibles a los efectos inhibitorios de los estrógenos *in vivo*.

La respuesta hormonal *in vitro* de los tumores PD ya había sido estudiada en trabajos previos del laboratorio donde se demostró que los progestágenos tienen un efecto proliferativo muy fuerte y que el E₂ y los antiprogestágenos inhiben la proliferación celular (40;45). De todas maneras evaluamos en un tumor PD un rango muy amplio de concentraciones de MPA, y observamos una curva estimuladora bifásica, con dos picos, uno a concentraciones muy bajas, del orden fM y otro en el rango nM.

La falta de respuesta hormonal de los tumores PI-NR tanto *in vivo* como *in vitro*, nos sugirió que en estos podría existir una selección de células sin receptores hormonales o con defectos en los mismos que no pudieran reconocer el ligando. Se abordaron estudios de unión del radioligando a punto único de saturación y se determinó la cantidad de receptores nucleares y citosólicos en tumores creciendo en animales en distintos estadios del ciclo estral, y en animales tratados con MPA.

Tanto en los tumores PD como en los PI-R se encontró alta expresión de RP, detectándose mayor cantidad en la fracción citosólica mientras que en los PI-NR el ligando se unió en el 48 % de las muestras estudiadas y en estos casos, su distribución fue principalmente nuclear. En los tres tipos de tumores hubo mayor expresión de RP en las muestras obtenidas de ratones en estro, lo que sugiere su regulación hormonal. El MPA reguló negativamente a los RP en todos los tumores excepto en los PI-NR. Estos datos sugieren que en los tumores PI-NR los RP pueden ser regulados por E_2 pero no por progestágenos.

La localización principalmente nuclear del RP en los tumores PI-NR indicaría una unión fuerte al ADN, sugiriendo una activación constitutiva. Este tipo de regulación de los niveles de receptor (unión del ligando) en los compartimentos celulares se describió para el RE, donde su activación por mecanismos alternativos, como por ejemplo PKC, podría afectar negativamente la unión de E_2 en el citosol (116). Hasta el momento, no se han demostrado mecanismos similares para el RP, pero dado que puede ser fosforilado por PKC (191), las modificaciones en esta vía podrían ser una explicación para que en estos tumores haya una mayor unión del ligando en la fracción nuclear.

Para investigar si la insensibilidad a antiprogestágenos se debía a una falta de capacidad de los RP de unirse a las hormonas antagonistas, se decidió analizarlos exhaustivamente con estudios de Scatchard y por ensayos de competencia. No se pudieron realizar curvas de saturación en los extractos de los tumores PI-NR. Estos resultados podrían indicar que el ligando se une a otro receptor en forma inespecífica y con menor afinidad o que existen interferencias con otras proteínas; también podrían tratarse de modificaciones intrínsecas del RP que interfieran con la unión al ligando. En un estudio realizado en 37 tumores mamarios humanos se informó que 8 tumores que no unían E_2 sí lo hacían en presencia de ATP, demostrando que la fosforilación *in vitro* de los mismos cambiaba su estado de inactivo a activo (192).

La falta de resultados positivos en los tumores PI-NR nos llevó a repetir controles con los tumores PI-R, aunque estos estudios se habían realizado en años anteriores (51). Curiosamente en las condiciones

ensayadas la unión del radioligando al RP en curvas de saturación y competencia revelaron dos sitios de unión tanto en los tumores PD como en los PI-R: el sitio de alta afinidad y baja capacidad (K_d : 43 ± 9 pM) que no se había reportado previamente, y el sitio clásico de menor afinidad y alta capacidad (51). Los dos sitios también se encontraron en útero normal.

El sitio de mayor afinidad fue muy difícil de ver por la relativamente baja sensibilidad del ensayo. Hasta el momento desconocemos la naturaleza y localización subcelular de este sitio que une progestágenos con alta afinidad. No hemos encontrado en la literatura referencias a sitios de unión de Pg con Kd en el mismo orden. Si tenemos en cuenta la curva bifásica de estimulación de la proliferación celular que indujo el MPA en células, y los Kd observados de estos 2 sitios, se podría pensar que el MPA ejerce su efecto proliferativo mediante dos mecanismos que podrían estar mediados por estos dos sitios, uno de ellos correspondería al clásico receptor nuclear. Con estrógenos, se han descrito efectos proliferativos no genómicos con muy bajas concentraciones. Estos se efectuarían a través de la activación de MAPK y se postula que el 5 % del RE total correspondería a un RE de membrana (114) (193). Nuestros resultados podrían indicar la existencia de mecanismos similares para el RP.

Distintos trabajos han descrito efectos no genómicos de la Pg en concentraciones altas (10 nM-100 μ M), a través de sitios distintos al receptor nuclear clásico. Existen dos líneas de pensamiento en relación a la naturaleza de estos sitios, algunos investigadores postulan que se trataría del mismo RP nuclear o de una isoforma similar y recientemente se ha clonado el RP de membrana (mRP) de ovocitos de *Xenopus laevis* (98) (99), el cual conserva actividad transcripcional y alta homología con el RP humano (93 % en el DBD y 80 % en el LBD) (98). Por otro lado, algunos investigadores afirman que se trataría de proteínas distintas al RP conocido, y en mamíferos existen numerosas evidencias que apoyan a esta hipótesis. Por ejemplo, en membranas de cerebro de ratón se describieron cuatro proteínas entre 29-64 kDa (94). En hepatocitos de rata se describieron dos sitios de unión en membranas con K_d 9.5 y 50.7 nM (95). En microsomas de hígado porcino se comunicó la existencia de dos sitios de 11 y 286 nM (194), correspondientes a polipéptidos de 28 y 56 kDa que en condiciones no desnaturizantes forman parte de complejos en membrana de 200 kDa (96). Pero en este caso la secuencia de estas proteínas no conserva una identidad significativa con el RP nuclear ni con otra proteína de función conocida (195).

Con respecto a los efectos proliferativos que observamos a concentraciones tan bajas de hormona, no tenemos conocimiento hasta el momento de trabajos que demuestren resultados similares. Sin embargo, se han reportado distintos efectos fisiológicos en concentraciones bajas para testosterona (196) y aldosterona (197). En células de la granulosa, Pg (93;198), E₂ (199;200) y andrógenos (201) en concentraciones de 0.1 nM, provocan un rápido aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular con la consecuente activación de protein quinasas y cascada de transducción de señales. Estos efectos estarían mediados por una proteína G (202).

Para caracterizar la expresión de las isoformas del RP se estudiaron por *Western blot* los tres tipos de tumores. Este trabajo es el primero en el que se estudia la expresión diferencial de isoformas del RP en tumores de mama de ratón. En tumores de mama humanos, dos estudios sobre la distribución de isoformas del RP (133;134) sugieren que un exceso de RP_A se asocia con un comportamiento más agresivo. Ambas isoformas se expresan en los carcinomas mamarios de nuestro modelo experimental, tanto PD como PI-R, siendo la isoforma PR_A predominante. Hemos observado además la presencia de una banda de 78 kDa en un alto porcentaje de las muestras procesadas (40 % de las PD y 66 % de las PI). El hecho de que la hayamos observado con los tres anticuerpos utilizados y de que esté negativamente regulada por MPA, sugiere que se trata de una proteína relacionada con el RP. La misma no ha sido descrita anteriormente en tejidos de ratón.

En un estudio sobre 202 tumores de mama humanos que expresaban RP se encontró una proteína similar, de 78 kDa en el 25.7 % de las muestras de evaluadas, sugiriéndose que correspondería a una forma truncada de RP_A (133). Yeates *et al* (135) descartaron la posibilidad de que fuera un producto de clivaje proteolítico y demostraron por *photoaffinity labeling* que es capaz de unir al agonista R5020. Estudios de ARNm demostraron que su peso molecular es compatible con variantes donde se ha saltado la inclusión del exón 4 ($\Delta 4$), 6 ($\Delta 6$) o 5-6 ($\Delta 5-6$), que también son detectadas en el cáncer de mama (136). Sin embargo, no se ha observado una correlación entre la expresión de estos ARNm truncados y la proteína de 78 kDa (135).

En un trabajo recientemente publicado (203), en el cual se estudia la expresión de RP en tumores mamarios de perro, se puede observar la presencia de una banda similar en los *Western blot*. Curiosamente, los autores no hacen mención alguna de esta banda en el texto. El hecho de que no haya sido descrita en tejidos normales y aparezca en cánceres de mama sugiere que podría utilizarse como marcador tumoral. En el caso de nuestro modelo experimental, su alta expresión parece estar relacionada con la capacidad de

responder favorablemente al tratamiento hormonal. Si bien en este trabajo de Tesis no hemos encarado el estudio de la identidad de la misma, pensamos que podría tratarse de una proteína de naturaleza similar a la descrita en tumores humanos; también y teniendo en cuenta que los RP tienen una fosforilación basal importante podría tratarse simplemente de una isoforma RP_A hipofosforilada. Las tres bandas correspondientes a RP_B , RP_A y la banda de 78 kDa están negativamente reguladas por MPA; siendo la regulación de la isoforma RP_B más notable en los tumores PI-R.

Los tumores PI-NR mostraron menor nivel de expresión de todas las isoformas y una expresión muy tenue o nula de la isoforma RP_B , con una proporción RP_A/RP_B mayor a cinco. A diferencia de los tumores respondedores, en estos tumores las isoformas no están reguladas por MPA. Estos resultados son concordantes con los observados anteriormente por unión del radioligando al receptor.

Con los resultados obtenidos por *Western blot* se podría predecir la capacidad de los tumores progestágeno-independientes de responder o no a antiprogestágenos. Los mismos fueron validados utilizando distintos anticuerpos. En especial se recurrió al anticuerpo no comercial cedido por la Dra. G Shyamala (Ab 1). Los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren que los anticuerpos de Neomarkers (Ab 7 y Ab 5) son también apropiados para su uso en *Western blot*.

En la glándula mamaria normal y en el útero de ratón la relación RP_A/RP_B es 3/1 (67), mientras que en la glándula mamaria humana Sartorius *et al* informaron que ambas isoformas se encuentran en concentraciones equimolares (127). En los tumores respondedores de nuestro modelo, la relación RP_A/RP_B es similar a la observada en el útero y glándula mamaria normal del ratón, donde el 25 % estuvo por encima de 1.3 y 75 % fue mayor que 2.5. En los tumores PI-R con MPA, en el 25 % de las muestras evaluadas, la proporción RP_A/RP_B estuvo por encima de dos y en el 75 % la relación alcanzó valores mayores a siete.

Las isoformas RP_A y RP_B fueron reguladas negativamente por MPA, lo cual está de acuerdo con la bibliografía en la cual se informa que los niveles de ambas isoformas disminuyen hasta aproximadamente 95 % a las 24 hs luego del tratamiento (188;125); la banda de 78 kDa también se reguló negativamente por progestágenos. En los tumores PD la proporción RP_A/RP_B no varió, indicando que el MPA regula en igual medida la expresión de ambas isoformas. El aumento de la proporción RP_A/RP_B en los tumores PI-R se debió a una disminución de los niveles de RP_B e indicaría que esta isoforma podría ser más importante en la regulación del crecimiento independiente de progestágenos. De hecho, se ha comunicado recientemente en

experimentos realizados en células T-47D, que existe una conversación cruzada entre las vías de RE y RP, donde RP_B sería la isoforma involucrada en la proliferación celular inducida por E₂ (116). De existir un mecanismo similar en los tumores PI-R, esto podría explicar una regulación diferencial de las dos isoformas.

El estudio del papel de las distintas isoformas de RP ha sido un tema de interés, y se ha sugerido que RP_A tiene un papel dominante negativo sobre la isoforma RP_B (78;125). En la glándula mamaria normal tanto de roedores como de humanos, la Pg promueve la proliferación del compartimiento epitelial (127) y una alteración en el balance de la expresión o funcionalidad de cualquiera de las dos isoformas podría tener consecuencias importantes en el desarrollo de la misma (73). Se ha demostrado recientemente que ratones transgénicos que sobreexpresan RP_A desarrollan hiperplasias ductales. Estudios de *DNA microarray* (137) han revelado que ambas isoformas regulan genes diferentes, donde los regulados por RP_A son genes asociados a proliferación y diferenciación celular. Todos estos datos sugieren que un desbalance en la proporción de isoformas podría favorecer la carcinogénesis mamaria (182).

Estudiamos la expresión de RP mediante otro abordaje, y para eso utilizamos el anticuerpo anti-RP_B humano (Ab 6) que también ha sido utilizado por la Dra. Shyamala en ratón (181), pero del cual el catálogo de la compañía refiere no haber sido probado en este animal. Los resultados fueron muy sorprendentes, ya que los tres tumores PI-NR mostraron una inmunoreactividad muy fuerte, con un duplete compatible con el PM de la isoforma RP_B y su variante fosforilada. Tanto en los tejidos controles como en los tumores PD y PI-R, la marca es menor, en particular en la banda de mayor PM. Estos resultados nos llevaron a postular la posible existencia de RP mutados en el dominio C-terminal, explicando así la pobre reactividad de algunos anticuerpos (Ab 1, Ab 7 y Ab 5) y la altísima reactividad del anticuerpo dirigido a esa región. Los estudios de SSCP realizados sobre ocho tumores (cuatro PI-R y cuatro PI-NR) no revelaron la existencia de mutaciones en el gen del RP, por lo que concluimos que la desigual inmunoreactividad se debería a diferencias en los determinantes antígenicos pero por modificaciones post-traduccionales sobre el RP.

Para confirmar la especificidad del anticuerpo Ab 6, se evaluó su reactividad en útero de ratón PRKO, detectándose las dos bandas, con un patrón similar al útero wt, aunque con menor intensidad que en los tumores. Se hizo un estudio con diversos tejidos controles por *Western blot* y se observó que estas dos bandas estaban altamente expresadas en corazón y en hígado, ninguna de ellas estuvo regulada ni por

tratamiento con E₂, ni por MPA. Por lo tanto, concluimos que se trata de proteínas probablemente relacionadas con RP pero que este anticuerpo no reconoce la isoforma RP_b en tejidos de ratón. El hecho de que estén altamente expresadas en los tumores resistentes a la terapia hormonal y no en los otros tumores sugiere su posible uso como marcador de falta de respuesta hormonal en nuestro modelo.

La sensibilidad alterada a hormonas evaluada por unión del ligando y la pobre detección en *Western blot* de los tumores PI-NR nos llevaron a estudiar diferencias en los niveles de expresión de RP por inmunohistoquímica. En este caso se incluyó el anticuerpo PR C-20 que ha sido usado en esta técnica para detectar RP en tejidos de ratón (123). En todos los tumores estudiados, independientemente de su categorización, se observó marcación nuclear específica en una proporción variable, pero en general mayor al 50 %, de las células neoplásicas. La diferencia entre resultados con *Western blot* e inmunohistoquímica es difícil de interpretar, teniendo en cuenta que se usaron varios anticuerpos diferentes. Podría ser que el umbral para detectar un positivo por inmunohistoquímica sea muy bajo y que la marcación se sature con bajo número de receptores. La posibilidad de que existan formas truncadas de menor peso molecular fue descartada, ya que por *Western blot* se estudiaron posibles bandas inmunoreactivas de hasta 10 kDa. Es posible por otra parte que modificaciones inducidas por la fijación en formalina y la inclusión en parafina alteraran la estructura o combinación de epitopes, incrementando la exposición de determinantes antigénicos específicos, con el consecuente aumento de su inmunoreactividad. La reactividad diferente de los anticuerpos en las dos técnicas también podría explicarse por cambios en los epitopes, producto de modificaciones post-traduccionales. Se han comunicado diversas modificaciones post-traduccionales en los receptores nucleares, tales como fosforilaciones (62), ubiquitinaciones (87;103), glicosilaciones (103) y sumoilizaciones (204). Estas modificaciones son covalentes y podrían estar involucradas en la reactividad diferencial de los anticuerpos, y por *Western blot* sólo se vería la fracción no modificada.

Se han comunicado estudios inmunohistoquímicos sobre tejidos de ratón con el anticuerpo de la Dra Shyamala y el PR C-20 (123;189), pero no hemos encontrado trabajos con los anticuerpos de Neomarkers. Estos sí se han utilizado en tejidos humanos donde aparentemente, el Ab 7 sólo reconocería la isoforma RP_A. Los autores sostienen que junto con el Ab 6, que reconoce sólo la RP_b, se dispondría de herramientas interesantes para estudiar la expresión y regulación de isoformas en tumores humanos (187). A pesar de que la presencia de marcación positiva con el Ab 7 en glándula mamaria de ratón PRKO invalidaría su utilidad, su

expresión por inmunohistoquímica fue regulada por hormonas en distintos tejidos. Esto sugiere que habría que asegurar la falta de epitopes relacionados con RP en el tejido PRKO antes de descalificar al anticuerpo.

Con el Ab 6 se obtuvieron resultados no compatibles con lo esperado si detectara a la isoforma RP₈. Se observó marcación nuclear específica epitelial con igual intensidad en todos los tumores estudiados y en los controles positivos. También se observó marca en el útero y en la glándula mamaria del ratón PRKO y en distintos tejidos controles. Su patrón de expresión no coincidió con el observado para Ab 7, ni con lo reportado en la bibliografía referido a la regulación hormonal (187).

Se decidió evaluar la expresión de ARN de RP en un tumor representativo PI-R y en uno PI-NR, en colaboración con la Dra. Shyamala. Teníamos evidencias por los resultados de SSCP (que se llevaron a cabo generando un cADN a partir de ARN con una batería de *primers* superpuestos) de que en los tumores PI-NR el gen de RP se transcribía, pero no sabíamos si en niveles comparables a los de los tumores PI-R. Los resultados obtenidos a partir del ensayo de protección a RNasa indicarían que no hay una disminución en la expresión del gen. Estos resultados favorecerían la hipótesis de que la reactividad diferencial de los anticuerpos sería el producto de modificaciones post-traduccionales sobre la proteína. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, donde no se veían cambios importantes a nivel de expresión de RP, sugerimos que habría modificaciones post-traduccionales que alterarían la unión del ligando al receptor y la inmunodetección por *Western blot*.

Se decidió evaluar la funcionalidad de los RP en los tumores PI-NR. En trabajos anteriores se demostró que el bFGF estimula el crecimiento de células PD, activando al RP de forma ligando independiente. Con antiprogéstágenos y con oligonucleótidos antisentido del RP se inhibió la proliferación celular inducida por este factor de crecimiento (45), sugiriéndose por primera vez una conversación cruzada entre factores de crecimiento y este receptor. Se había demostrado que la activación de RP por ligando aumentaba la sensibilidad a factores de crecimiento (205). Posteriormente otros trabajos (206) confirmaron nuestra hipótesis usando heregulina en lugar de bFGF.

Todos estos datos sugerían que un RP que podría estar activado por alguna otra vía no relacionada con su ligando natural, podría ser el responsable del crecimiento progéstágeno-independiente en nuestro modelo. El hecho que los tumores PI-R también regresen completamente por tratamiento con

antiprogestágenos y que los asRP inhiban la proliferación celular *in vitro*, sugiere que el RP es una proteína regulatoria clave en el crecimiento tumoral.

Estos resultados nos indujeron a explorar el efecto de los asRP en la proliferación de los tumores PI-NR. Podría suceder que los mecanismos que llevan a la falta de respuesta estuvieran relacionados con la activación de vías de señalización actuando por debajo del RP, en cuyo caso el bloqueo del RP no influiría en la proliferación, o por el contrario, que estos RP siguieran jugando un papel esencial debido a que alteraciones intrínsecas del receptor inducirían su activación.

El tratamiento con asRP produjo una significativa disminución de la proliferación celular, evaluada tanto por incorporación de ³H-timidina como por recuento celular en los tres tumores PI-NR. Esta inhibición estuvo asociada a una inhibición significativa de la unión del ligando *in vivo* sobre la célula entera, avalando el uso de los asRP en este sistema. Dado que, en este contexto, la técnica de *Western blot* no era adecuada para evaluar RP, se prefirió estudiar el efecto de los asRP sobre la funcionalidad del RP por unión del radioligando al receptor a punto único de saturación. La disminución significativa en la unión del ligando también avala el hecho que hayamos denominado como "receptores" a estas proteínas que unen el ligando pero que en las cuales no se pudo investigar su Kd.

La secuencia de asRP elegida está dirigida a bloquear ambas isoformas, ya que involucra el sitio de iniciación de traducción de RP_A, y había sido utilizado con éxito en estudios *in vivo* realizados por otros investigadores (184). Nosotros diseñamos la secuencia del asRP_B, dirigido exclusivamente a bloquear la isoforma RP_B. Si bien los resultados en cuanto a la disminución de la proliferación fueron similares con ambos asRP, aún no hemos demostrado que carezca de efecto sobre la expresión de RP_A. El hecho que el asRP_B sea menos efectivo en bloquear la unión del ligando sugiere que esta isoforma sería indispensable para mediar la proliferación celular. En este momento se están realizando experimentos en el laboratorio para confirmar la especificidad del bloqueo.

La técnica de antisentido se basa en que oligonucleótidos que atravesarían las membranas celular y nuclear, inhibirían principalmente la traducción de la secuencia blanco. También podrían actuar formando una triple hélice afectando así la expresión del gen. Como control de que el efecto observado es específico, ya que debido a la carga negativa es común que estas secuencias se peguen a otras proteínas y en especial a las de la matriz extracelular, se usan las secuencias sentido o secuencias de nucleótidos reordenados al azar

(scrambled). En nuestro trabajo decidimos usar como control de especificidad, además del oligonucleótido control scrRPAB, una línea celular de glándula mamaria normal de ratón, que no expresa RP (NMuMg). Se eligieron las concentraciones que no producen inhibición de crecimiento en las células control y que están dentro del orden utilizado por otros autores para oligonucleótidos antisentido no modificados (207;208). El tratamiento inhibió la proliferación celular en forma específica sugiriendo que estos RP tienen un papel activo en el crecimiento hormono-independiente.

La inhibición de la unión del ligando en los cultivos tratados con las secuencias antisentido fue de 100-25 %. Estas observaciones concuerdan con lo informado por otros autores. En células MCF-7 se observó que secuencias antisentido del gen de RE inhibieron la unión de E_2 en un 30-40 % (209). En células H-59 de carcinoma murino, aún transfectando un vector con el cADN en orientación antisentido, lo cual implicaría mayor eficiencia, la inhibición superó el 75 % (210). El tratamiento con el oligonucleótido control no produjo disminución significativa en el número de sitios receptores.

Los resultados descritos en este trabajo son importantes piezas adicionales que contribuyen a clarificar algunos aspectos de nuestro modelo experimental. En la Figura 6-1 se hipotetizan posibles mecanismos regulatorios en las distintas situaciones exploradas. En el crecimiento progestágeno-dependiente, los progestágenos, MPA o Pg, son necesarios para estimular el crecimiento, ya sea por su efecto estimulador clásico, como ligandos del RP, o porque poseen acciones permisivas o agonistas de otros mecanismos estimuladores, como factores de crecimiento. En la transición a la hormono-independencia, el RP podría ser activado por otros mecanismos, no relacionados con el ligando. Estos tumores regresionan con tratamiento con antiprogestágenos (PI-R). Finalmente, existen tumores que no responden al tratamiento (PI-NR) pero cuyo crecimiento se inhibe al bloquear el RP. Esta situación es compatible con la hipótesis que postula la existencia de receptores alterados, activados en forma permanente. Los altos niveles de factores de crecimiento tales como IGF II (211) y Heregulina (HER) (212), bajos niveles de factores inhibitorios como $TGF\beta_1$ (213), altos niveles de expresión de receptores de factores de crecimiento (R-IGF I) (211) encontrados en tumores PD creciendo con MPA, o en tumores progestágeno-independientes, serían característicos del estado proliferativo mediado por RP y constituirían en sí mismos la causa de la adquisición de hormono-independencia.

Resumiendo, en este trabajo de tesis se estudió la expresión del RP en carcinomas mamarios de distinta respuesta hormonal. Los estudios de unión del radioligando al receptor nos llevaron a descubrir un sitio de alta afinidad y baja capacidad, que no se había descrito anteriormente y que también se encuentra en útero. Estos resultados nos llevarán a abrir una nueva línea de trabajo para poder investigar de qué proteína se trata, si tiene identidad con el RP nuclear, cuál es su localización subcelular y si se encuentra relacionado con posibles efectos no genómicos de la Pg en células mamarias.

Demostramos por primera vez en carcinomas mamarios murinos la expresión de las isoformas clásicas del RP, presentes en el tejido normal, y encontramos una nueva banda inmunoreactiva de menor peso molecular, que había sido previamente descrita en tumores mamarios humanos y caninos. Desconocemos si se trata de una forma truncada y/o si tiene alguna función biológica. El uso del anticuerpo Ab 6, que se usa en tejidos humanos para detectar RP_b, también abrió nuevos interrogantes. En nuestro modelo, la/s proteína/s reconocidas por este anticuerpo no parecen ser RP_b, y hasta el momento ignoramos su identidad.

Los estudios con técnicas inmunohistoquímicas, junto con los estudios a nivel de ARN e indirectamente los de asRP, nos llevan a pensar que los tumores PI-NR siguen expresando RP y que habría alteraciones no genómicas relacionadas con su actividad. El uso de técnicas asRP *in vivo* confirmará definitivamente la participación de estos RP en el crecimiento tumoral. Desde el punto de vista clínico, nuestros estudios han aportado datos que, de ser extrapolables, podrían ser muy útiles. Hemos demostrado que por estudios de *Western blot*, junto con los de unión del radioligando al receptor y con inmunohistoquímica se podría predecir la respuesta a la terapia y que aquellos tumores resistentes a la terapia endocrina aún podrían regularse modulando la expresión de sus receptores hormonales.

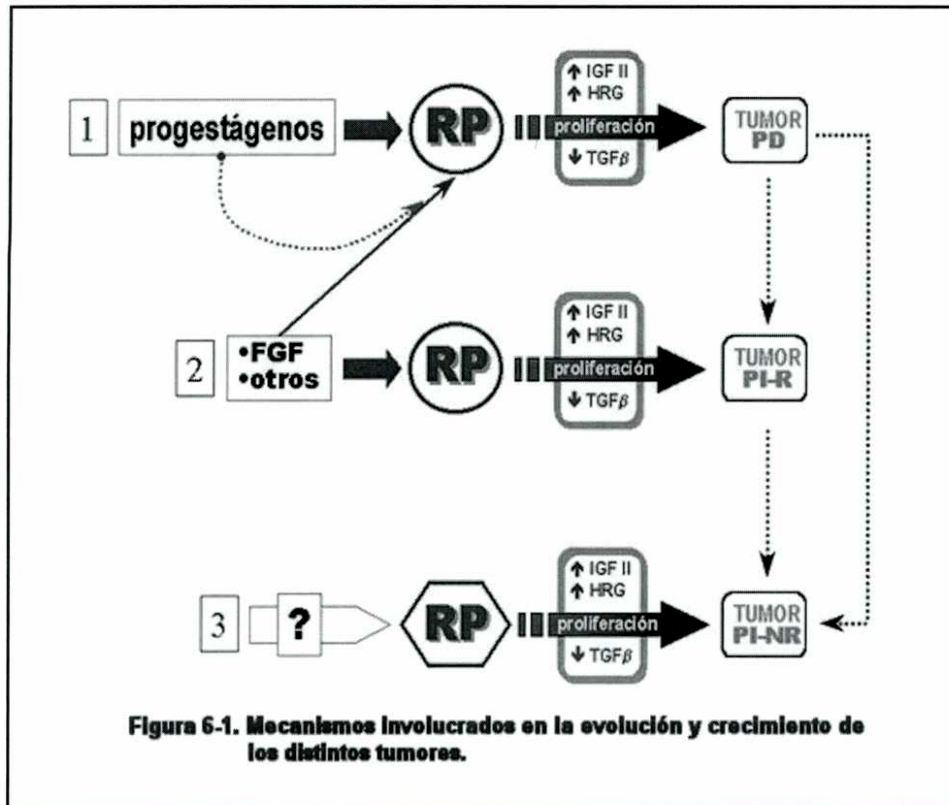


Figura 6-1. Mecanismos involucrados en la evolución y crecimiento de los distintos tumores.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los carcinomas mamarios murinos con distinta respuesta a antiprogestágenos muestran una expresión diferente de RP al evaluarlos por técnicas de unión del ligando y de *Western Blot*, no así por inmunohistoquímica o estudios de ARN. Esto sugiere cambios intrínsecos en el receptor que alteran su funcionalidad. Aún así estos RP estarían involucrados en la proliferación celular. Nuestros resultados sugieren que el diseño de terapias tendientes a bloquear la vía del RP en tumores resistentes al tratamiento endocrino sería un abordaje apropiado para inhibir su crecimiento.

CONCLUSIONES PARCIALES

Pudimos caracterizar la respuesta *in vivo* e *in vitro* a antiprogestágenos de los tumores progestágeno-independientes y en base a la misma clasificarlos en respondedores (PI-R) y no respondedores (PI-NR).

El comportamiento de los carcinomas de mama sugiere que la adquisición de un fenotipo hormono-independiente y la capacidad de responder a una terapia hormonal son eventos independientes.

En todos los tumores respondedores a antiprogestágenos la expresión de isoformas del RP es similar. Sin embargo, la regulación negativa por progestágenos se ejerce preferencialmente sobre la isoforma RP_B en los tumores PI-R, y esto podría estar relacionado con sus características biológicas.

Los tumores PD y PI-R expresan las isoformas RP_A y RP_B y con una proporción comparable a la de los tejidos murinos normales. La banda de 78kDa, presente en un alto porcentaje de muestras de estos tumores, pero ausente en el tejido normal sugiere su posible aplicación como marcador tumoral.

En los carcinomas mamarios no respondedores, estudiados por *Western blot* con el anticuerpo monoclonal Ab 6, se detectaron dos bandas con fuerte intensidad. La identidad de las mismas es aún desconocida, pero dado que también se expresan en útero PRKO no se trataría de RP_B y su variante fosforilada, aunque poseen inmunoreactividad cruzada con la misma. Su alta expresión en tumores PI-NR, pero no en PI-R también sugiere su uso como marcador en la predicción de la respuesta hormonal.

El sitio de unión de alta afinidad del RP, 100 veces mayor que la del RP nuclear clásico y las respuestas proliferativas a progestágenos en concentraciones comparables a este Kd, podrían estar asociados a la existencia de vías estimulatorias no genómicas para los progestágenos en células mamarias, tal como ya ha sido descrito para el RE.

El estudio de los patrones de expresión de receptores por *Western Blot* y unión del ligando, pero no por inmunohistoquímica o protección a RNasa, permite en nuestro modelo experimental, predecir la respuesta de un tumor a la terapia endocrina. Nuestros resultados sugieren que la validez de la expresión de RP como factor pronóstico en la clínica, debe estar basada en el uso de técnicas complementarias.

En todos los tumores resistentes a antiprogestágenos, el bloqueo del RP por asRP inhibe la proliferación celular *in vitro*. Esto sugiere que los RP podrían estar activados en forma ligando-independiente y que la falta de respuesta a hormonas podría estar dada por modificaciones intrínsecas a la molécula que interfieran en la unión al ligando (agonista/antagonista).

Los estudios a nivel de ARN demostraron que, la pobre detección RP por *Western blot* sería el producto de alteraciones a nivel post-transcripcional (corte y procesamiento alternativo) o post-traduccionales. Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica indican que una alteración post-traduccionales sería la causa más probable.



Lic. Luisa Alejandra Helguero



Dr. Alfredo A. Molinolo

Director de Tesis

PARTE V



BIBLIOGRAFÍA

1. **Franks LM, Teich NM** 1997 Introduction to Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press, 3rd. edn
2. **Majno G, Joris I** 1996 Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology. Blackwell Science Inc, 1st edition edn
3. **Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA** 2000 Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 50:7-33
4. **Lacey JV, Jr., Devesa SS, Brinton LA** 2002 Recent trends in breast cancer incidence and mortality. Environ Mol Mutagen 39:82-88
5. **Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK** 2000 The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. Cancer 88:2398-2424
6. **Phillips KA, Glendon G, Knight JA** 1999 Putting the risk of breast cancer in perspective. N Engl J Med 340:141-144
7. **Ustaran J, Bianco M, Meiss R, Rascovan S** 1988 Epidemiología descriptiva del cáncer de mama. Prensa Médica 75:73-84
8. **Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W** 1992 Breast cancer (1). N Engl J Med 327:319-328
9. **Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W** 1994 A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266:66-71
10. **Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH** 1996 Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. Nat Genet 12:191-194
11. **Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw-Boris A, Deng CX** 1999 Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. Nat Genet 22:37-43
12. **Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D** 1994 Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science 265:2088-2090
13. **Schwab M, Claas A, Savelyeva L** 2002 BRCA2: a genetic risk factor for breast cancer. Cancer Lett 175:1-8

14. **Hollingsworth RE, Lee WH** 1991 Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *J Natl Cancer Inst* 83:91-96
15. **Eccles SA** 2001 The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:393-406
16. **Harries M, Smith I** 2002 The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer* 9:75-85
17. **Palmer K, Sharan N, Emtage P, Gaudie J, Muller WJ, Wan Y** 2002 Intratumoral administration of an adenovirus expressing a kinase dead form of ErbB-2 inhibits tumor growth. *Gene Ther* 9:898-905
18. **Gasco M, Shami S, Crook T** 2002 The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 4:70-76
19. **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ** 2000 Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310
20. **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC** 1991 p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53
21. **Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L** 1995 p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 13:821-830
22. **Liao DJ, Dickson RB** 2000 c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 7:143-164
23. **Clark GJ, Der CJ** 1995 Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 35:133-144
24. **Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G** 1994 Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54:1812-1817
25. **Thomas DB** 2000 Rapporteur's report - Epidemiology. *Breast Cancer Res Treat* 18:531-534
26. **Korach KS, McLachlan JA** 1995 Techniques for detection of estrogenicity. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7:5-8
27. **Maggiolini M, Bonfiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, Ando S** 2001 Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 60:595-602
28. **Messina M, Barnes S, Setchell KD** 1997 Phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet* 350:971-972

29. **Parkin DM, Whelan S.L., Ferlay J, Raymond L, Young J** 1997 Cancer incidence in five continents. IARC Sci Publ 7:1-1240
30. **Vorherr H, Messer RH** 1978 Breast cancer: potentially predisposing and protecting factors. Role of pregnancy, lactation, and endocrine status. Am J Obstet Gynecol 130:335-358
31. **Pike MC, Henderson BE, Krailo MD, Duke A, Roy S** 1983 Breast cancer in young women and use of oral contraceptives: possible modifying effect of formulation and age at use. Lancet 2:926-930
32. **Russo J, Russo IH** 1995 Hormonally induced differentiation: a novel approach to breast cancer prevention. J Cell Biochem Suppl 22:58-64
33. **Frank DW, Kirton KT, Murchison TE, Quinlan WJ, Coleman ME, Gilbertson TJ, Feenstra ES, Kimball FA** 1979 Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate or progesterone for four years. Fertil Steril 31:340-346
34. **Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL** 1999 Robbins Pathologic Basis of Disease .W B Saunders Co, 6th edition edn
35. **Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R** 2000 Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. JAMA 283:485-491
36. **Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC** 2000 Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. J Natl Cancer Inst 92:328-332
37. **Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens C, Rosner B, Speizer FE** 1995 The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. N Engl J Med 332:1589-1593
38. **Magnusson C, Baron JA, Correia N, Bergstrom R, Adami HO, Persson I** 1999 Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy. Int J Cancer 81:339-344
39. **Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, Singh HR, Olson LK, Gatewood O, Bassett LW, Wasilauskas C, Bush T, Barrett-Connor E** 1999 Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Investigators. Ann Intern Med 130:262-269
40. **Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Charreau EH, Pasqualini CD, Lanari C** 1995 Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. Breast Cancer Res Treat 35:173-186

41. **Kordon E, Lanari C, Meiss R, Charreau E, Pasqualini CD** 1990 Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced in vivo by medroxyprogesterone acetate. *Breast Cancer Res Treat* 17:33-43
42. **Kordon E, Lanari C, Molinolo AA, Elizalde PV, Charreau EH, Pasqualini CD** 1991 Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int J Cancer* 49:900-905
43. **Kordon EC, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH, Pazos P, Dran G, Lanari C** 1993 Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between progestin dependence and morphology. *Breast Cancer Res Treat* 28:29-39
44. **Kordon EC, Guerra F, Molinolo AA, Charreau EH, Pasqualini CD, Pazos P, Dran G, Lanari C** 1994 Effect of sialoadenectomy on medroxyprogesterone-acetate-induced mammary carcinogenesis in BALB/c mice. Correlation between histology and epidermal-growth-factor receptor content. *Int J Cancer* 59:196-203
45. **Lamb C, Simian M, Molinolo A, Pazos P, Lanari C** 1999 Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70:133-142
46. **Lamb CA, Helguero L, Fabris V, Colombo L, Molinolo A, Lanari C** 2002 Differential effects of raloxifene, tamoxifen and ICI 182,780 on a murine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* Accepted for publication:
47. **Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD, Charreau EH** 1989 Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int J Cancer* 43:845-850
48. **Lanari C, Montecchia MF, Pazos P, Simian M, Vanzulli S, Lamb C, Molinolo AA** 1997 Progestin-induced mammary adenocarcinomas in BALB/c mice. Progression from hormone-dependent to autonomous tumors. *Medicina (B Aires)* 57:55-69
49. **Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD** 1986 Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *J Natl Cancer Inst* 77:157-164
50. **Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD** 1987 Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 79:1341-1350

51. Montecchia MF, Lamb C, Molinolo AA, Luthy IA, Pazos P, Charreau E, Vanzulli S, Lanari C 1999 Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68:11-21
52. Pazos P, Lanari C, Meiss R, Charreau EH, Pasqualini CD 1992 Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and medroxyprogesterone acetate (MPA) in BALB/c mice. *Breast Cancer Res Treat* 20:133-138
53. Pazos P, Lanari C, Charreau EH, Molinolo AA 1998 Promoter effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) in N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induced mammary tumors in BALB/c mice. *Carcinogenesis* 19:529-531
54. Aldaz CM, Liao QY, Paladugu A, Rehm S, Wang H 1996 Allelotypic and cytogenetic characterization of chemically induced mouse mammary tumors: high frequency of chromosome 4 loss of heterozygosity at advanced stages of progression. *Mol Carcinog* 17:126-133
55. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD 2002 Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA* 288:872-881
56. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R 2000 Estrogen-progestin replacement and risk of breast cancer. *JAMA* 284:691-694
57. Bissell MJ, Weaver VM, Lelievre SA, Wang F, Petersen OW, Schmeichel KL 1999 Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res* 59:1757-1763s
58. Wellings SR 1980 Development of human breast cancer. *Adv Cancer Res* 31:287-314
59. Elston CW, Ellis IO 1991 Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-410
60. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Addo FK, Murphy B, Ingle JN, Perez EA 2002 Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 94:855-857
61. Tsai MJ, O'Malley BW 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-486
62. Weigel NL 1996 Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319:657-667

63. **Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Perrot-Appianat M, Milgrom E** 1994 Cytoplasmic-nuclear trafficking of progesterone receptor. In vivo study of the mechanism of action of antiprogestins. *Biochem Pharmacol* 47:21-24
64. **Tang Y, DeFranco DB** 1996 ATP-dependent release of glucocorticoid receptors from the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* 16:1989-2001
65. **Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P** 1988 The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333:185-188
66. **Bocquel MT, Kumar V, Stricker C, Chambon P, Gronemeyer H** 1989 The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* 17:2581-2595
67. **Schneider W, Ramachandran C, Satyaswaroop PG, Shyamala G** 1991 Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton 'A' form. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38:285-291
68. **Horwitz KB, Tung L, Takimoto GS** 1996 Novel mechanisms of antiprogestin action. *Acta Oncol* 35:129-140
69. **Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E** 1986 Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9045-9049
70. **Ilenchuk TT, Walters MR** 1987 Rat uterine progesterone receptor analyzed by [³H]R5020 photoaffinity labeling: evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 120:1449-1456
71. **Conneely OM, Kettelberger DM, Tsai MJ, Schrader WT, O'Malley BW** 1989 The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J Biol Chem* 264:14062-14064
72. **Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garnier JM, Horwitz KB, Chambon P, Gronemeyer H** 1990 Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem* 265:12163-12167
73. **Shyamala G, Yang X, Cardiff RD, Dale E** 2000 Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3044-3049

74. **Wei LL, Norris BM, Baker CJ** 1997 An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62:287-297
75. **Liu Z, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 2001 Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12426-12431
76. **Olefsky JM** 2001 Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276:36863-36864
77. **Prendergast P, Pan Z, Edwards DP** 1996 Progesterone receptor-induced bending of its target DNA: distinct effects of the A and B receptor forms. *Mol Endocrinol* 10:393-407
78. **Hovland AR, Powell RL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB** 1998 An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 273:5455-5460
79. **Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB** 1994 A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8:1347-1360
80. **Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP** 1997 Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272:32889-32900
81. **Abdel-Hafiz HA, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB** 2002 The inhibitory function (IF) in human progesterone receptor N-termini binds small ubiquitin-like modifier (SUMO-1) protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem*
82. **Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW** 1990 Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11:201-220
83. **Denner LA, Weigel NL, Schrader WT, O'Malley BW** 1989 Hormone-dependent regulation of chicken progesterone receptor deoxyribonucleic acid binding and phosphorylation. *Endocrinology* 125:3051-3058
84. **Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L** 1996 Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 10:1167-1177

85. **Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK, Edwards DP** 1993 The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4441-4445
86. **Mani SK, Mitchell A, O'Malley BW** 2001 Progesterone receptor and dopamine receptors are required in Delta 9-tetrahydrocannabinol modulation of sexual receptivity in female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1249-1254
87. **Shen T, Horwitz KB, Lange CA** 2001 Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 21:6122-6131
88. **Sartorius CA, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB** 1993 Antagonist-occupied human progesterone receptors bound to DNA are functionally switched to transcriptional agonists by cAMP. *J Biol Chem* 268:9262-9266
89. **Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW** 2000 Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275:4475-4483
90. **Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, Martini PG, McInerney EM, Delage-Mourroux R, Weis K, Katzenellenbogen JA** 2000 Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res* 55:163-193
91. **Zorumski CF, Mennerick S, Isenberg KE, Covey DF** 2000 Potential clinical uses of neuroactive steroids. *Curr Opin Investig Drugs* 1:360-369
92. **Sabeur K, Edwards DP, Meizel S** 1996 Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 54:993-1001
93. **Machelon V, Nome F, Grosse B, Lieberherr M** 1996 Progesterone triggers rapid transmembrane calcium influx and/or calcium mobilization from endoplasmic reticulum, via a pertussis-insensitive G-protein in granulosa cells in relation to luteinization process. *J Cell Biochem* 61:619-628
94. **Bukusoglu C, Krieger NR** 1994 Photoaffinity labeling with progesterone-11 alpha-hemisuccinate- (2-[125I]iodohistamine) identifies four protein bands in mouse brain membranes. *J Neurochem* 63:1434-1438

95. Trueba M, Rodriguez P, Vallejo AI, Marino A, Sancho MJ, Macarulla JM 1990 Binding of progesterone to specific sites in isolated hepatic cells and purified plasma membrane fraction. *Exp Clin Endocrinol* 95:169-180
96. Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M 1996 Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* 239:726-731
97. Maller JL 2001 The elusive progesterone receptor in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8-10
98. Tian J, Kim S, Heilig E, Ruderman JV 2000 Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14358-14363
99. Bayaa M, Booth RA, Sheng Y, Liu XJ 2000 The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12607-12612
100. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870
101. Koike S, Sakai M, Muramatsu M 1987 Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 15:2499-2513
102. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930
103. LeClercq G 2002 Molecular forms of the estrogen receptor in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:259-272
104. Gustafsson JA 1999 Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163:379-383
105. Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA 2000 Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:337-342
106. Clarke R, Brüner N 1996 Acquired estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer. Estrogen receptor driven phenotypes?. *Trends Endocrinol Metabol* 7:291-301
107. Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, McInerney EM 1997 William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 44:23-38

108. Poola I, Speirs V 2001 Expression of alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs is increased in breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78:459-469
109. Zhang QX, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Borg A 1996 Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:251-260
110. Fasco MJ, Keyomarsi K, Arcaro KF, Gierthy JF 2000 Expression of an estrogen receptor alpha variant protein in cell lines and tumors. *Mol Cell Endocrinol* 162:167-180
111. Murphy LC, Dotzlaw H, Wong MS, Miller T, Murphy LJ 1991 Mechanisms involved in the evolution of progesterin resistance in human breast cancer cells. *Cancer Res* 51:2051-2057
112. Diaz-Chico BN, Ogasawara Y, Chamness GC, Salman M, McGuire WL 1988 A 46-kDa antigen associated with estrogen receptor in human breast cancer. *J Steroid Biochem* 30:315-320
113. Monje P, Boland R 1999 Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol Cell Endocrinol* 147:75-84
114. Powell CE, Soto AM, Sonnenschein C 2001 Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen-target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:97-108
115. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER 1999 Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13:307-319
116. Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F 1998 Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17:2008-2018
117. Shyamala G, Louie SG, Camarillo IG, Talamantes F 1999 The progesterone receptor and its isoforms in mammary development. *Mol Genet Metab* 68:182-90
118. Daniel CW, Smith GH 1999 The mammary gland: a model for development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4:3-8
119. Russo J, Russo IH 1980 Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. II. Pregnancy interruption as a risk factor in tumor incidence. *Am J Pathol* 100:497-512
120. *The Mammary Gland: Development, Regulation, and Function* 1987 Plenum Pub Corp, New York

121. **Bocchinfuso WP, Korach KS** 1997 Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:323-334
122. **Lydton JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW** 1995 Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266-2278
123. **Silberstein GB, Van Horn K, Shyamala G, Daniel CW** 1996 Progesterone receptors in the mouse mammary duct: distribution and developmental regulation. *Cell Growth Differ* 7:945-952
124. **Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP, O'Malley BW** 1992 The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* 69:703-713
125. **Jacobsen BM, Richer JK, Schittone SA, Horwitz KB** 2002 New Human Breast Cancer Cells to Study Progesterone Receptor Isoform Ratio Effects and Ligand-independent Gene Regulation. *J Biol Chem* 277:27793-27800
126. **Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP** 1994 The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 14:8356-8364
127. **Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB** 1994 New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B- receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Res* 54:3868-3877
128. **Lanari C, Luthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, Sanjuan N, Merani S, Molinolo AA** 2001 Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res* 61:293-302
129. **Henderson BE, Ross RK, Pike MC** 1993 Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science* 259:633-638
130. **Clarke CL, Sutherland RL** 1990 Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev* 11:266-301
131. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans - Hormonal Contraception and Post-menopausal Hormonal Therapy** 1999IARC Scientific Publications, World Health Organization, Lyon, France.

132. Lydon JP, Ge G, Kittrell FS, Medina D, O'Malley BW 1999 Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function. *Cancer Res* 59:4276-4284
133. Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL 1995 Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 55:5063-5068
134. Bamberger AM, Milde-Langosch K, Schulte HM, Loning T 2000 Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm Res* 54:32-37
135. Yeates C, Hunt SM, Balleine RL, Clarke CL 1998 Characterization of a truncated progesterone receptor protein in breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4600-467
136. Richer JK, Lange CA, Wierman AM, Brooks KM, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB 1998 Progesterone receptor variants found in breast cells repress transcription by wild-type receptors. *Breast Cancer Res Treat* 48:231-241
137. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB 2002 Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277:5209-5218
138. Jordan VC 1976 Antiestrogenic and antitumor properties of tamoxifen in laboratory animals. *Cancer Treat Rep* 60:1409-1419
139. Tonetti DA, Jordan VC 1997 Targeted antiestrogens. *Prog Clin Biol Res* 396:245-255
140. Herrmann W, Wyss R, Riondel A, Philibert D, Teutsch G, Sakiz E, Baulieu EE 1982 The effects of an antiprogestone steroid in women: interruption of the menstrual cycle and of early pregnancy. *C R Seances Acad Sci III* 294:933-938
141. Horwitz KB 1992 The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocr Rev* 13:146-163
142. Muss HB 1992 Endocrine therapy for advanced breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat* 21:15-26
143. Klijn JG, de Jong FH, Bakker GH, Lamberts SW, Rodenburg CJ, Alexieva-Figusch J 1989 Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer Res* 49:2851-2856
144. Jonat W, First clinical results of antiprogestational treatment with onapristone.

145. **Perrault D, Eisenhauer EA, Pritchard KI, Panasci L, Norris B, Vandenberg T, Fisher B** 1996 Phase II study of the progesterone antagonist mifepristone in patients with untreated metastatic breast carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study. *J Clin Oncol* 14:2709-2712
146. **Robertson JF, Willsher PC, Winterbottom L, Blamey RW, Thorpe S** 1999 Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *Eur J Cancer* 35:214-218
147. **Klijin JG, Setyono-Han B, Foekens JA** 2000 Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65:825-830
148. **Michna H, Schneider MR, Nishino Y, el Etreby MF** 1989 Antitumor activity of the antiprogestins ZK 98.299 and RU 38.486 in hormone dependent rat and mouse mammary tumors: mechanistic studies. *Breast Cancer Res Treat* 14:275-288
149. **Michna H, Gehring S, Kuhnel W, Nishino Y, Schneider MR** 1992 The antitumor potency of progesterone antagonists is due to their differentiation potential. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:203-210
150. **Schneider MR, Michna H, Nishino Y, el Etreby MF** 1990 Antitumor activity and mechanism of action of different antiprogestins in experimental breast cancer models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:783-787
151. **Vollmer G, Michna H, Ebert K, Knuppen R** 1992 Down-regulation of tenascin expression by antiprogestins during terminal differentiation of rat mammary tumors. *Cancer Res* 52:4642-4648
152. **Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stumpp H, Elger W** 2000 Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* 65:741-751
153. **Edwards DP, Weigel NL, Nordeen SK, Beck CA** 1993 Modulators of cellular protein phosphorylation alter the trans-activation function of human progesterone receptor and the biological activity of progesterone antagonists. *Breast Cancer Res Treat* 27:41-56
154. **Meyer ME, Pornon A, Ji JW, Bocquel MT, Chambon P, Gronemeyer H** 1990 Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J* 9:3923-3932

155. **Ballare C, Bravo AI, Laucella S, Sorin I, Cerdeiro R, Loza J, Sousa MF, Guman N, Mordoh J** 1989 DNA synthesis in estrogen receptor-positive human breast cancer takes place preferentially in estrogen receptor-negative cells. *Cancer* 64:842-848
156. **Schmitt FC** 1995 Multistep progression from an oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 31A:2049-2052
157. **Fuqua SA, Fitzgerald SD, Allred DC, Elledge RM, Nawaz Z, McDonnell DP, O'Malley BW, Greene GL, McGuire WL** 1992 Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res* 52:483-486
158. **Wolf DM, Jordan VC** 1993 William L. McGuire Memorial Symposium. Drug resistance to tamoxifen during breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat* 27:27-40
159. **Thompson TA, Haag JD, Lindstrom MJ, Griep AE, Lohse JK, Gould MN** 2002 Decreased susceptibility to NMU-induced mammary carcinogenesis in transgenic rats carrying multiple copies of a rat ras gene driven by the rat Harvey ras promoter. *Oncogene* 21:2797-2804
160. **Graham JD, Clarke CL** 1997 Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519
161. **Musgrove EA, Sutherland RL** 1994 Cell cycle control by steroid hormones. *Semin Cancer Biol* 5:381-389
162. **Musgrove EA, Hunter LJ, Lee CS, Swarbrick A, Hui R, Sutherland RL** 2001 Cyclin D1 overexpression induces progestin resistance in T-47D breast cancer cells despite p27(Kip1) association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* 276:47675-47683
163. **Darbre PD, Daly RJ** 1990 Transition of human breast cancer cells from an oestrogen responsive to unresponsive state. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:753-763
164. **Arteaga CL, Carty-Dugger T, Moses HL, Hurd SD, Pietenpol JA** 1993 Transforming growth factor beta 1 can induce estrogen-independent tumorigenicity of human breast cancer cells in athymic mice. *Cell Growth Differ* 4:193-201
165. **Vignon F, Bouton MM, Rochefort H** 1987 Antiestrogens inhibit the mitogenic effect of growth factors on breast cancer cells in the total absence of estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 146:1502-1508

166. **Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H** 1995 Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494
167. **Krusekopf S, Chauchereau A, Milgrom E, Henderson D, Cato AC** 1991 Co-operation of progestational steroids with epidermal growth factor in activation of gene expression in mammary tumor cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:239-245
168. **Mani SK, Allen JM, Lydon JP, Mulac-Jericevic B, Blaustein JD, DeMayo FJ, Conneely O, O'Malley BW** 1996 Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice. *Mol Endocrinol* 10:1728-1737
169. **Clarke R** 1997 Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. *Breast Cancer Res Treat* 46:117-133
170. **Callahan R** 1996 MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 39:33-44
171. **Javier R, Shenk T** 1996 Mammary tumors induced by human adenovirus type 9: a role for the viral early region 4 gene. *Breast Cancer Res Treat* 39:57-67
172. **Fluck MM, Haslam SZ** 1996 Mammary tumors induced by polyomavirus. *Breast Cancer Res Treat* 39:45-56
173. **Clarke R** 1996 Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 39:69-86
174. **Amundadottir LT, Merlino G, Dickson RB** 1996 Transgenic mouse models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 39:119-135
175. **Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD** 1986 Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 33:215-223
176. **Lanari C, Molinolo A** 2002 Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res* In press:
177. **Rosai J** 1989 *Breast. Acherman's Surgical Pathology.*The C. V. Mosby Company, St. Louis, Missouri:1193-1267

178. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL** 1951 Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
179. **Laemmli UK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
180. **Clarke CL, Zaino RJ, Feil PD, Miller JV, Steck ME, Ohlsson-Wilhelm BM, Satyaswaroop PG** 1987 Monoclonal antibodies to human progesterone receptor: characterization by biochemical and immunohistochemical techniques. *Endocrinology* 121:1123-1132
181. **Shyamala G, Schneider W, Schott D** 1990 Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology* 126:2882-2889
182. **Shyamala G, Yang X, Silberstein G, Barcellos-Hoff MH, Dale E** 1998 Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:696-701
183. **Pandis N, Heim S, Bardi G, Limon J, Mandahl N, Mitelman F** 1992 Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer [published erratum appears in *Genes Chromosomes Cancer* 1992 Nov;5(4):410]. *Genes Chromosomes Cancer* 5:14-20
184. **Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW, Clark JH** 1994 Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 135:1409-1414
185. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
186. **Schott DR, Shyamala G, Schneider W, Parry G** 1991 Molecular cloning, sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor. *Biochemistry* 30:7014-7020
187. **Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL** 1999 Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2963-2971
188. **Feil PD, Clarke CL, Satyaswaroop PG** 1988 Progesterin-mediated changes in progesterone receptor forms in the normal human endometrium. *Endocrinology* 123:2506-2513
189. **Shyamala G, Barcellos-Hoff MH, Toft D, Yang X** 1997 In situ localization of progesterone receptors in normal mouse mammary glands: absence of receptors in the connective and adipose stroma and a heterogeneous distribution in the epithelium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63:251-259

190. **Michna H, Nishino Y, Neef G, McGuire WL, Schneider MR** 1992 Progesterone antagonists: tumor-inhibiting potential and mechanism of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:339-348
191. **Boyle DM, van der Walt LA** 1988 Enhanced phosphorylation of progesterone receptor by protein kinase C in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem* 30:239-244
192. **Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Pagano M, Abbondanza C, Auricchio F** 1996 A 67 kDa non-hormone binding estradiol receptor is present in human mammary cancers. *Int J Cancer* 65:574-583
193. **Marquez DC, Pietras RJ** 2001 Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene* 20:5420-5430
194. **Falkenstein E, Eisen C, Schmieding K, Krautkramer M, Stein C, Losel R, Wehling M** 2001 Chemical modification and structural analysis of the progesterone membrane binding protein from porcine liver membranes. *Mol Cell Biochem* 218:71-79
195. **Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M** 1996 Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229:86-89
196. **Lieberherr M, Grosse B, Kachkache M, Balsan S** 1993 Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *J Bone Miner Res* 8:1365-1376
197. **Christ M, Wehling M** 1999 Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids* 64:35-41
198. **Lieberherr M, Grosse B, Machelon V** 1999 Phospholipase C-beta and ovarian sex steroids in pig granulosa cells. *J Cell Biochem* 74:50-60
199. **Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL** 1992 A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 131:1305-1312
200. **Tesarik J, Mendoza C** 1995 Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1438-1443
201. **Machelon V, Nome F, Tesarik J** 1998 Nongenomic effects of androstenedione on human granulosa luteinizing cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83:263-269

202. **Falkenstein E, Heck M, Gerdes D, Grube D, Christ M, Weigel M, Buddhikot M, Meizel S, Wehling M** 1999 Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca²⁺-fluxes in sperm. *Endocrinology* 140:5999-6002
203. **Lantinga-van Leeuwen IS, van Garderen E, Rutteman GR, Mol JA** 2000 Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75:219-228
204. **Abdel-Hafiz H, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB** 2002 The Inhibitory Function in Human Progesterone Receptor N Termini Binds SUMO-1 Protein to Regulate Autoinhibition and Transrepression. *J Biol Chem* 277:33950-33956
205. **Horwitz KB** 1993 Mechanisms of hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 26:119-130
206. **Elizalde P, Labriola L, Salatino M, Movsichoff F, Proietti C, Pecci A, Coso O, Kornblihtt A, Charreau E**, Heregulin Regulates the Progesterone Receptor (Pr) Transcriptional Activity by a Mechanism That Requires a Functional erbB-2 and Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) Activation. New Orleans,
207. **Pietrzkowski Z, Sell C, Lammers R, Ullrich A, Baserga R** 1992 Roles of insulinlike growth factor 1 (IGF-1) and the IGF-1 receptor in epidermal growth factor-stimulated growth of 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 12:3883-3889
208. **Resnicoff M, Burgaud JL, Rotman HL, Abraham D, Baserga R** 1995 Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* 55:3739-3741
209. **Taylor AH, Pringle JH, Bell SC, Al Azzawi F** 2001 Specific inhibition of estrogen receptor alpha function by antisense oligodeoxyribonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11:219-231
210. **Long L, Rubin R, Baserga R, Brodt P** 1995 Loss of the metastatic phenotype in murine carcinoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 55:1006-1009
211. **Elizalde PV, Lanari C, Molinolo AA, Guerra FK, Balana ME, Simian M, Iribarren AM, Charreau EH** 1998 Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:305-317

212. **Balana ME, Lupu R, Labriola L, Charreau EH, Elizalde PV** 1999 Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 18:6370-6379
213. **Elizalde PV, Guerra FK, Gravano M, Lanari C, Lippman ME, Charreau EH, Lupu R** 1995 Correlation of TGF-beta 1 expression with medroxyprogesterone acetate responsiveness in mouse mammary adenocarcinomas. *Cancer Invest* 13:173-180