



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

Interacciones Epitelio-Estroma y el Fenotipo Angiogénico del Cáncer de Mama

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica*

Gabriela Inés Rozenberg

*Directores de Tesis: **Dr. Juan Carlos Calvo**
Dra. Valerie M. Weaver*

*Lugar de Trabajo: Department of Pathology, University of
Pennsylvania, School of Medicine.*

Buenos Aires, Argentina, 2005

*Dedico esta Tesis a mi mamá
Reina y a mi papá Néstor, porque
los quiero con toda mi alma y
porque es gracias a ustedes que soy
quien soy.*

Interacciones Epitelio-Estroma y el Fenotipo Angiogénico del Cáncer de Mama

El cáncer de mama es la enfermedad neoplásica más comúnmente diagnosticada entre las mujeres; y el desarrollo de nuevos programas de screening ha llevado a que el carcinoma ductal in situ (DCIS) sea actualmente considerado una ‘epidemia’. Debido a la falta de modelos de pre-malignidad in vitro, aún no existen criterios que sirvan para identificar las lesiones con alto riesgo de transformarse en malignas, por lo tanto, la mayoría de los DCISs son tratados de la misma manera, resultando a veces en sobretratamiento. A pesar de que la mayoría de los cánceres de mama son de origen epitelial, claramente la tumorigénesis es un proceso complejo que involucra varios tipos celulares y factores humorales y un medio en constante evolución, el cual no puede ser completa o fácilmente modelado en cultivo utilizando solo células epiteliales. De hecho, el cáncer de mama se caracteriza por perturbaciones en las interacciones epitelio- estroma. Las integrinas, los principales receptores para estas interacciones, han sido implicadas en varios aspectos de la progresión tumoral, incluyendo supervivencia de las células tumorales, inducción y activación de enzimas degradativas de la matriz, migración y adhesión en sitios de metástasis. En esta Tesis utilizamos un modelo de progresión tumoral mamaria humana: la serie celular HMT3522 (S1, S2, y T4-2), para estudiar el rol de las interacciones epitelio- estroma en el desarrollo del cáncer de mama y la angiogénesis. Como primer paso establecimos un modelo de pre-malignidad in vitro, por medio del clonado de tres poblaciones premalignas (S3-A, S3-B y S3-C) a partir del

cultivo heterogéneo de células S2. Demostramos que las células S3-C poseían el fenotipo más pobremente diferenciado entre la serie celular S3, haciendo de éstas los candidatos más plausibles para ser utilizadas como un modelo de DCIS in vitro. Demostramos también que, de manera similar a lo que ocurre en los cánceres de mama in vivo, mientras que las células tumorales T4-2 expresaban la integrina $\alpha 5\beta 1$ y su ligando fibronectina, las células S1 y S3 no expresaban este receptor. Más aún, demostramos que la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células pre-malignas S3-C y no-malignas S1 indujo su transformación maligna, y esto se encontró relacionado a la expresión del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo 1: VEGFR-1 (flt-1), el cual participaría en un loop de supervivencia autocrino. Finalmente identificamos una asociación recíproca entre la polaridad tisular, la señalización vía integrina $\alpha 5\beta 1$ -EGFR-uPAR, la expresión de factores angiogénicos y la dormición tumoral. Esto sugiere que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría ser crítica para la transformación maligna, en otras palabras, su expresión sería incompatible con la morfogénesis normal. Estos datos en su conjunto implican que no existiría un único factor controlando el estado tumoral, sino que se trataría de varios factores interconectados que se regularían mutuamente de manera constata. Creemos que estos resultados son prometedores, ya que implicarían que la dormición tumoral podría ser inducida y mantenida por diferentes medios, aportando más opciones de tratamientos para combatir el cáncer.

Palabras clave: cáncer de mama, angiogénesis, dormición tumoral, integrinas, matriz extracelular, polaridad tisular.

Stromal- Epithelial Interactions and the Angiogenic Phenotype of Breast Cancer

Breast cancer is the most common neoplastic disease diagnosed in women; and the development of new screening programmes has led to the fact that DCIS is now considered to be an ‘epidemic’. Due to the lack of in vitro models of pre-malignancy there are still no defining criteria for identifying high risk lesions, thus, most DCISs are treated in the same way, resulting sometimes in over treatment. Although most breast cancers are of epithelial origin, clearly tumorigenesis is a complex process involving many cell types and humoral factors and a constantly evolving milieu which cannot be easily and fully modeled in culture using only epithelial cells. In fact, breast cancer is characterized by perturbations in stromal-epithelial interactions. Integrins, the main receptors for such interactions, have been implicated in several aspects of tumor progression, including tumor cell survival, induction and activation of matrix-degrading enzymes, migration, and anchorage at sites of metastasis. And expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin on breast cancer cells is thought to be associated with differences in metastatic behavior. In this Thesis we used a human mammary tumor progression model: the HMT3522 cell series (S1, S2, and T4-2), to study the role of stromal-epithelial interactions in breast cancer development and angiogenesis. We first established a premalignant in vitro model, by enriching for premalignant populations in the heterogeneous S2 cultures. We clonally purified three cell populations: S3-A, S3-B and S3-C, and showed that S3-C cells had the most poorly differentiated phenotype among

the S3 series, making these cells a likely candidate for further studies of premalignant to malignant transition. We also found that, similar to breast cancers in vivo, while tumor T4-2 cells expressed $\alpha 5\beta 1$ integrin and its ligand fibronectin, S1 and S3 cells did not express this receptor. We further showed that ectopic expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin by the pre-malignant S3-C and non-malignant S1 cells could induce their malignant transformation, and that this was linked to the induced expression of the vascular endothelial growth factor receptor 1: VEGFR-1 (flt-1), which participated in an autocrine survival loop. We finally identified a reciprocal link between tissue polarity, $\alpha 5\beta 1$ integrin-EGFR-uPAR signaling, expression of pro-angiogenic factors and tumor dormancy. This suggests $\alpha 5\beta 1$ integrin may be critical during malignant transformation, i.e., its expression would be incompatible with normal morphogenesis. Put together, these data imply that there is probably not just one factor that controls the state of a tumor, but that there are interconnected factors that regulate each other. These are promising results, since they imply that tumor dormancy could be achieved and maintained by various means, giving the cancer patient more chances to win over the tumor.

Key words: Breast cancer, angiogenesis, tumor dormancy, integrins extracellular matrix, tissue polarity.

AGRADECIMIENTOS

Debo empezar por agradecer al Dr. Juan Carlos Calvo (a.k.a. JCC) por apoyarme desde el inicio, todo a lo largo y hasta el final de este largo viaje que fue mi Doctorado. Sin tu ayuda y tu paciencia me hubiera sido imposible lograr todo esto: Sos un científico increíble y una persona ejemplar. Mil gracias por todo!

Esto es seguido de cerca por un enorme agradecimiento a la Dra. Valerie Weaver, por abrirme la puerta de su laboratorio, su vida y hasta su casa, y por enseñarme todo lo que pudo acerca de la ciencia y de la vida: Tu energía es impresionante. Espero poder llevarme un de ella poco cuando me vaya.

No sería justo si no le agradeciera al Dr. Gabriel Bertolesi, quien me empujó para que comenzara mi Doctorado en el laboratorio de Juan Carlos, por todo lo que hizo por mi como Co-Director de mi Tesis de Licenciatura y por considerarme siempre una par: Sos un científico excepcional y vas a ser siempre un modelo para mí. Gracias a la Dra. María Adela Jasnís, por darme mi primera oportunidad en la ciencia: Todo lo que aprendí de vos me sirvió para lograr llegar a donde estoy hoy. Te voy a estar siempre agradecida.

Tengo que agradecer inmensamente al Dr. Jon Lakins por toda su ayuda: Sin él habría estado completamente perdida en el “Molecular Biology World of *Cloneland*”. Gracias Jon!

Gracias a la Dra. Silvia Moreno y a la Comisión de Doctorado, por permitirme darme el lujo de salir de Buenos Aires para completar mi Tesis y por su ayuda desde allá.

Mi vida en Philly no habría sido tan fácil como fue desde el comienzo si no hubiera sido por la adorable Nas, el divino Dhaval, la dulce Mona y la divertida Penney: Todos ustedes fueron increíbles conmigo desde el principio, ayudándome con mi vida y mi ciencia. Los voy a extrañar.

Por supuesto no me olvidé del resto de los “Weaverites”: Julie, quien me ayudó tanto con esos “*Eternal Westerns of the Spotless Gel*”; Kandice, la chica más buena de todo Texas (y tal vez de todos los EEUU); Matt, el buenmozo del lab; Jen, con su mano firme y sus chistes serios; Mawse, con su loco pero dulce ser; Manunya, con todas sus historias alocadas de cuando era un “freshman” y solía emborracharse y... ok, también con todas sus charlas científicas; Laura, mi compatriota, quien me dió una sonrisa y una mano amiga cada día desde que se unió al laboratorio (lamentablemente tan tarde); y finalmente Christina y Kate, nuestras últimas y refrescantes adquisiciones. Tampoco me olvidé de todas las “chicas de Juan Carlos”: Carlita, Mariana, Marcela, Cynthia, Eleonora, Paula y por supuesto Lucrecia, las extrañé todos estos años lejos del lab. Gracias a Alisha y Gigi por su ayuda con los co-cultivos y el confocal, respectivamente, y por ser tan copadas. Gracias a la Dra. Carolyn Mies, por su ayuda con el análisis de las muestras tumorales. Gracias a toda la gente del IME, por hacer cada día en el lab tan divertido, y por no quejarse de mis sesiones de canto y baile en el cuarto de cultivo. Gracias al Departamento de Defensa de los EEUU, por darme el apoyo económico para llevar a cabo este trabajo.

Quiero agradecer a mi familia (quienes estarán siempre en primer lugar): me dieron tanto amor que me mantuvo cuerda aún cuando pensé que estaba por volverme loca. Mamá, gracias por aguantar la distancia como pudiste, llorando poquito poquito y haciendo lo posible para ayudarme desde lejos. Papá y Marta, por atender siempre el teléfono, aunque supieran que se venía una repetición de lo mismo, y por llevarme a la playa cuando realmente necesitaba un “escape”. Maru, Ale, Jony, Pablo, Sebas, hermanos, hermanastro y cuñado de mi vida, cada día que pasa los quiero más, y cada día me siento más orgullosa de sus éxitos, espero que empiecen a copiar a Jony y vengan a visitarme pronto. Abuelas Rebeca y Blanca, son una tan dulce y la otra tan “avanzada para su época” que el tiempo compartido con ustedes es siempre un placer. Perdónenme por haberme venido tan lejos, pero recuerden siempre que mi corazón esta allá. Abuelos Lobo y Roberto, gracias por cuidarme y ayudarme desde arriba.

Gracias a mis amigos del alma, Lau, Sol, Sebas, Juan, que estuvieron siempre en el teléfono, el mail o el chat, y esperándome a mi retorno con las más lindas sonrisas y todos los mimos.

Finalmente tengo que agradecer a mi familia de Philly por siempre estar ahí cuando los necesité, por hacerme reír, por darme de comer, por compartir, por aguantar a mi “crazy self”: Martin y Sole (papis), Fede y Caro (tíos), Francesca y Nayla (hermanas), Andrea, Cristina y Valeria (mejores amigos, quienes nos abandonaron por más dulces aires italianos), y a la extensión de la familia: Nicolas, Ryan, Massi y Marco, Nati, Marce, Dieguito y Julian, Paulita, y mis recién descubiertos tesoros: Scott y Oscar, los “tipos” más dulces del mundo...

... en suma: Los voy a recordar siempre, y siempre tendrán un lugar en mi corazón (y en mi casa, donde sea que termine).

Y como soy tan rara, tengo que terminar agradeciéndome a mí misma, por sobrevivir toda la ansiedad que este Doctorado y esta nueva vida generaron en mi, y por continuar creyendo, aún en los momentos en que pensé que no había nada más en qué creer. Gracias Mariana, por ayudarme a descubrir los instrumentos para mi triunfo. Voy a extrañar nuestras charlas.

INTRODUCCION

LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es una glándula sudorípara modificada derivada del cordón epitelial mamario del embrión (Figura 1). Este es el único órgano que no se encuentra completamente desarrollado en el momento del nacimiento; ningún otro órgano atraviesa por cambios tan dramáticos en tamaño, forma y función durante la vida adulta como los que ocurren durante el desarrollo de la mama durante el crecimiento, la pubertad, el embarazo, la lactancia y la involución (Ronnov-Jessen et al., 1996; Russo & Russo, 1987).

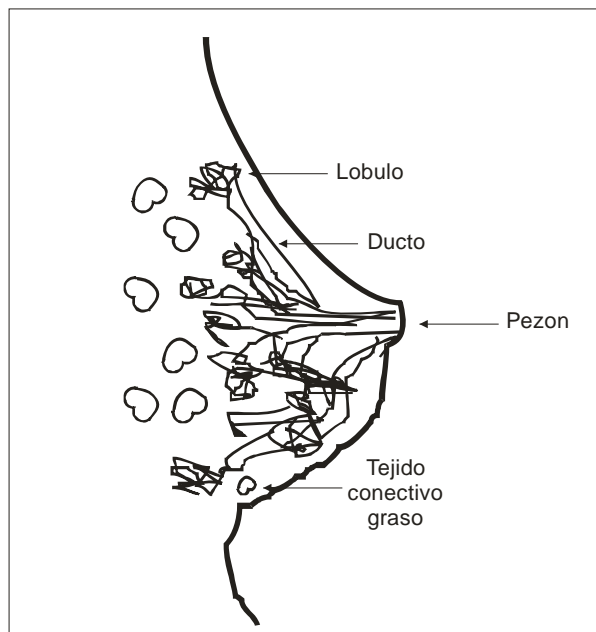


Figura 1. Representación de una mama adulta humana

La glándula mamaria se desarrolla a través de un complejo proceso de interacciones entre dos tejidos embriológicamente diferentes pero profundamente

interconectados: el epitelio y el estroma o mesénquima. Durante el desarrollo de la glándula mamaria se diferencian dos mesénquimas (Sakakura et al., 1982). El primero es un mesénquima mamario denso, compuesto por varias capas de fibroblastos adheridas inmediatamente al epitelio. El segundo es el tejido precursor de la almohadilla grasa mamaria, que aparece separado posteriormente al epitelio mamario y es esencial para la morfogénesis de la glándula mamaria en el estado embrional. El estroma mamario constituye más del 80% del volumen de la mama, y se encuentra compuesto por fibroblastos, células endoteliales (ECs), células de músculo liso, adipocitos, células inflamatorias, células nerviosas y por una red macromolecular de proteoglicanos y glicoproteínas llamada conjuntamente matriz extracelular (ECM) (Wiseman & Werb, 2002).

El desarrollo de la mama se ve afectado por toda influencia ya sea endocrinológica, dietaria o ambiental (Fata et al., 2004). Por lo tanto, el desarrollo normal de la mama depende de una combinación de hormonas mamotróficas sistémicas, factores solubles como las citoquinas, factores de crecimiento y morfógenos, así como interacciones locales célula- célula e interacciones entre célula y medioambiente.

Una gran variedad de factores de crecimiento parecen mediar las interacciones locales en la glándula mamaria; algunos de estos factores de crecimiento pertenecen a las familias del epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor β (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF), y las familias de genes *Wnt* (discutido en Dickson, 1996;

Fata et al., 2004; Osborne, 1996). Estos factores de crecimiento modulan el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria in vitro, mientras que su expresión diferencial en la mama en desarrollo sugiere su rol conjunto con hormonas sistémicas durante el desarrollo glandular normal. Las alteraciones hormonales sistémicas se combinan a su vez con efectos celulares locales para promover la involución de la glándula mamaria luego de la lactancia. Dos reguladores endócrinos del crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria que se encuentran bien caracterizados son el estrógeno y la progesterona (Fendrick et al., 1998). Ambas hormonas actúan a través de sus receptores nucleares para modular la transcripción de genes blanco.

El desarrollo de la glándula mamaria ocurre en dos fases morfogénicas distintas: la fase de desarrollo y la fase de diferenciación o fase de maduración lobular. La primera fase comienza con el desarrollo de un árbol mamario rudimentario a partir de la epidermis embrionaria, y finaliza luego de la pubertad con un elegante sistema arborado de ductos. Esta primera fase incluye los estadios tempranos de la morfogénesis de la glándula, desde la formación del epitelio del pezón hasta la formación de los lóbulos. En la formación de los lóbulos, la diferenciación y el desarrollo ocurren casi simultáneamente. En la segunda fase, que comienza con el embarazo, se desarrollan, dentro de este marco, lóbulos acinares secretores de leche. Todavía no se encuentra en claro cómo células en diferentes estados de desarrollo son más o menos sensibles a estímulos apoptóticos y a factores de crecimiento, pero existe clara evidencia que indica que el estroma en cada uno de estos estadios varía en composición y organización

(Howeedy et al., 1990; Weaver et al., 1996; Wiseman & Werb, 2002) (Daniel & Silberstein, 1987).

En la mama inmadura, los ductos y alvéolos se encuentran alineados por un epitelio bicapa que consiste en un estrato cuboide basal y un estrato superior aplanado. En presencia de estrógenos en la pubertad y subsiguientemente, este epitelio prolifera, haciéndose multi-estratificado. La mama púber en desarrollo esta compuesta por “botones terminales” (terminal end buds, TEBs), estructuras celulares en crecimiento y desarrollo con forma de diamante. Los TEBs forman ramas, brotes y pequeños ductillos, los “botones alveolares” (*alveolar buds*). Los “botones alveolares” se diferencian luego en las estructuras terminales de la mama llamadas acinos o ductillos (Russo & Russo, 1987).

Los lóbulos se desarrollan durante los primeros años luego de la menarca. Los “botones alveolares” se agrupan alrededor de un ducto terminal y forman los lóbulos tipo I (vírgenes), compuestos de aproximadamente 11 “botones alveolares” alineados por 2 capas de epitelio. La diferenciación completa de la glándula mamaria procede a lo largo de la pubertad, dura varios años, y puede no llegar a completarse si es interrumpida por embarazos (Russo et al., 2001).

Existen cuatro tipos de lóbulos (Figura 2): los de tipo I son la primera generación de lóbulos que se desarrollan justo después de la menarca. La transición a los tipos II y III

resulta del crecimiento continuo de nuevos “botones alveolares” (los cuales a partir de este momento son llamados ductillos) y aumentan en número a 47 y 80, respectivamente. El aumento en número resulta en un aumento concomitante del tamaño de los lóbulos y en una disminución del tamaño de cada estructura individual. Durante el embarazo, la mama alcanza su máximo desarrollo; esto ocurre en dos fases dominantes características de los estadios temprano y tardío del embarazo. El estadio temprano es un estado de crecimiento, y consiste en la proliferación de elementos distales del árbol ductal, resultando en la formación de nuevos ductillos que en este estadio pueden ser llamados acinos, dando lugar así a los lóbulos de tipo IV a partir de lóbulos de tipo III. En la mitad del embarazo los lóbulos crecen aun más en tamaño y número y rodean el ducto del cual su rama central es ahora tan gruesa que no se reconocen en él el ducto jefe, el ducto terminal, o el ducto terminal intralobular. La transición entre los ductos terminales y el acino en desarrollo es gradual, haciendo difícil la distinción histológica entre estos, ya que ambos poseen características de secreción tempranas. La estructura final del árbol ductal se encuentra esencialmente establecida hacia el final de la primera mitad del embarazo; los cambios que ocurren durante la segunda etapa del embarazo son básicamente una continuación y acentuación de la actividad secretoria. El acino secretor formado durante el embarazo es un crecimiento terminal que marca el final de la diferenciación glandular. Todo este proceso requiere la proliferación celular activa que permita la adquisición de la masa celular necesaria para la función de secreción de leche. En ausencia de embarazo, el número y tamaño de los lóbulos disminuye y solo se encuentran estructuras ductales y lóbulos de tipo I y II. Por último, la involución de la

glándula mamaria comienza en la mujer premenopáusia como una consecuencia de la disminución de la función ovárica. Aparecen cambios regresivos tanto en las estructuras epiteliales como en el estroma. Los ductos y las ramas se mantienen, pero los lóbulos se achican y colapsan, aunque pueden persistir algunas estructuras de tipo acinares. Los lóbulos mamarios y los acinos, las últimas estructuras que aparecen con la maduración sexual, son los primeros en regresar (Russo & Russo, 1987).

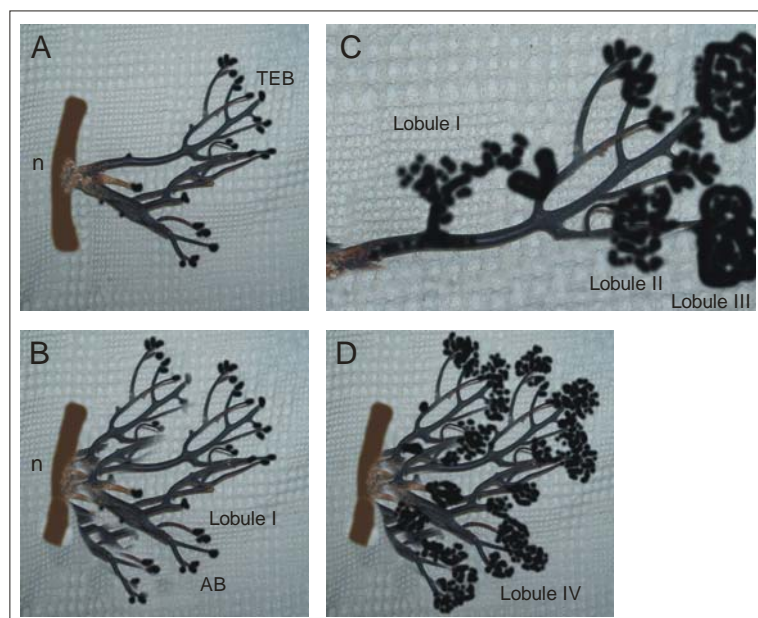


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo de la glándula mamaria.

A. Glándula virgen púber, los ductos crecen y se dividen finalizando en los “botones terminales” (TEBs); n: nipple (pezón). B. Luego de la primera menstruación, aparecen los lóbulos de tipo I, compuestos de “botones alveolares” (AB). C. Mama de una mujer adulta nulípara, en la que pueden encontrarse 3 tipos de lóbulos (I, II y III). D. Mama en lactancia, mostrando el desarrollo completo de la glándula mamaria a lóbulos tipo IV.

Durante las distintas fases de su desarrollo, la glándula mamaria exhibe diversas estructuras que responden diferencialmente a factores de crecimiento y estímulos apoptóticos. Una pregunta que surge de este hecho es: ¿podría la diferente arquitectura u organización tisular ser responsable de esta respuesta diferencial a claves del ambiente? ¿Y podrían los cambios en la composición del estroma que acompañan las diferentes fases del desarrollo de la mama ser responsables de los cambios en los componentes epiteliales de la glándula que llevan a la formación de diferentes estructuras?

INTERACCIONES EPITELIO-ESTROMA EN LA MAMA NORMAL

A lo largo de los repetidos ciclos de embarazo, lactancia e involución que atraviesa la glándula mamaria, la interacción de las células mamarias epiteliales (MECs) con la ECM que las rodea, en particular la ECM especializada conocida como membrana basal (BM) contribuye a las señales requeridas para su proliferación, diferenciación y supervivencia (Fata et al., 2004; Ronnov-Jessen et al., 1996).

El estroma posee una influencia crucial durante la fase ductal de la morfogénesis organotípica de las ramificaciones. Cada vez resulta mas evidente que la subversión de señales recíprocas entre el parénquima y el estroma son aspectos importantes de la progresión tumoral. De hecho, mas del 90% de los carcinomas mamarios humanos son de origen ductal (Silberstein, 2001). Interacciones recíprocas entre el epitelio y el mesénquima median aspectos cruciales del desarrollo embrionario y dirigen la

organogénesis coordinada, la correcta orientación espacial y la expresión diferencial de actividad funcional consistentes con las demandas fisiológicas. El equivalente al

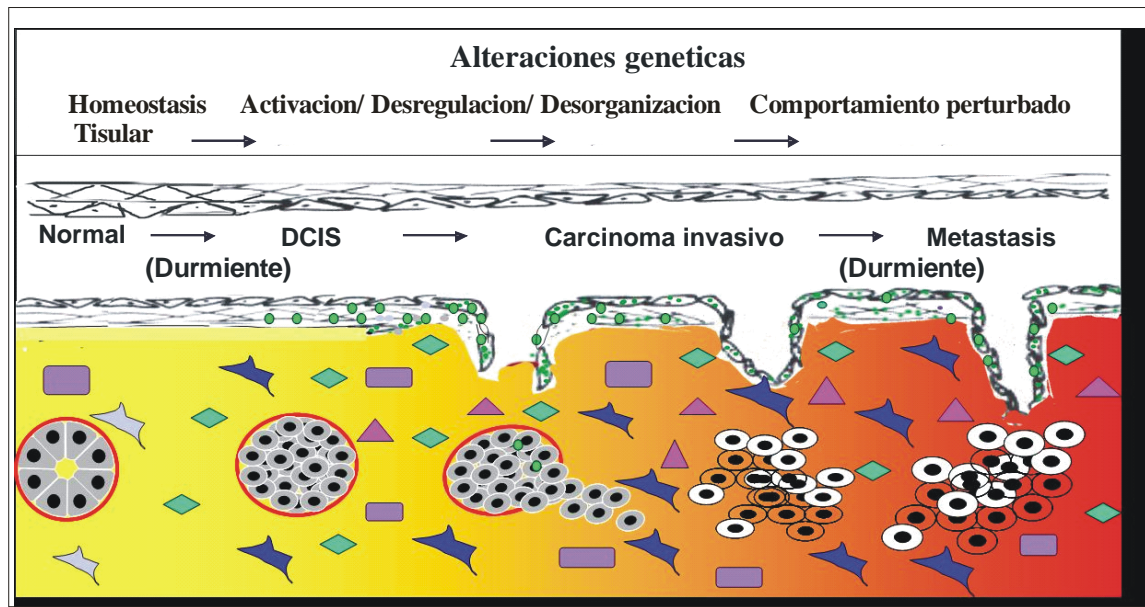


Figura 3. Interacciones epitelio-estroma durante la transformación de una glándula mamaria normal a un carcinoma ductal in situ a un tumor de mama invasivo.

Esquema representando un acino mamario normal (esferoide gris) polarizado correctamente y rodeado por una BM (roja), el cual gradualmente se transforma en una lesión premaligna (observar como el lumen se encuentra ahora lleno de células, pero aun se conserva una BM intacta) y luego en un tumor invasivo (el cual ha degradado la BM e invadido el estroma), que puede finalmente dar lugar a metástasis. Los cambios estromales incluyen cambios en la composición de la ECM (representados aquí por cambios en el color del fondo de la figura), concentración de citoquinas y factores de crecimiento (rectángulos violeta y diamantes verdes) y un aumento en el número de células estromales (fibroblastos [formas grises que luego pasan a ser azules, representando el estado activado de estos], células inmunes [triángulos rosados]. Durante el estadio de DCIS puede observarse ya el switch angiogénico). Figura de Ch. Chatterjee, no publicada.

mesénquima en el organismo adulto es el estroma, o sea, el tejido conectivo laxo que se encuentra separado del compartimiento epitelial por una BM intacta. En los carcinomas, la organización celular cambia dramáticamente, y el estroma es modificado extensivamente. La BM es penetrada en un proceso de degradación y/o síntesis disminuida, y el contacto directo entre las células tumorales y el estroma subyacente coincide con y generalmente precede a la neovascularización, el influjo de células inflamatorias, y la remodelación extensiva de la ECM (Ronnov-Jessen et al., 1996) (Figura 3).

Consistentemente con la noción de que la estructura tisular ejerce una influencia fundamental sobre la respuesta de las células a claves del ambiente tales como la ECM (Zahir et al., 2003), ratones transgénicos para diferentes proteínas mutantes de metaloproteinasas de matriz [matrix metalloproteinase (MMP)] poseen diversos defectos en el desarrollo de la mama (Simian et al., 2001; Sternlicht et al., 2000; Sympson et al., 1994; Thomasset et al., 1998; Wiseman et al., 2003). Y el mismo es el caso para los ratones knock out para el plasminógeno (Pg) o el inhibidor del activador del Pg (PAI), en los cuales la morfología mamaria se encuentra significativamente alterada (Bajou et al., 2001; Bajou et al., 1998; Lund et al., 2000).

INTEGRINAS Y ECM EN LA MAMA NORMAL

Una gran cantidad de trabajos de investigación indican que la morfogénesis de la glándula mamaria depende en parte de la ECM, de receptores de la ECM, como las integrinas y otros receptores, y de enzimas degradatorias de la ECM, incluyendo las MMPs y sus inhibidores, los inhibidores de tejido de las MMPs [tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)] (discutido en Fata et al., 2004).

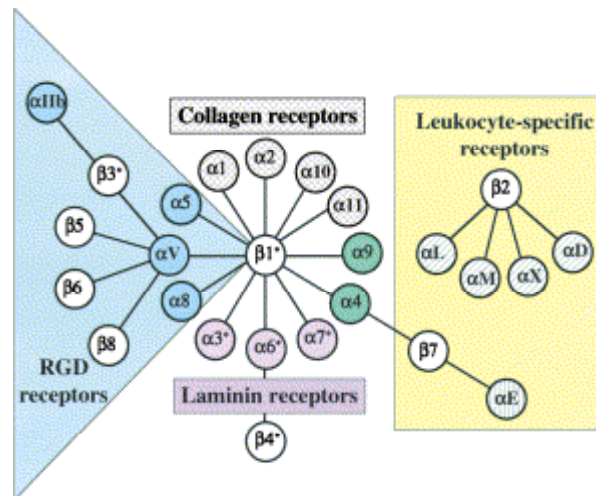


Figura 4. Las integrinas son heterodímeros alfa beta que reconocen diferentes ligandos en la ECM

Representación esquemática de las distintas subunidades que componen las diferentes integrinas y sus interacciones con diferentes ligandos. Existen 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta que se combinan entre sí para formar 24 receptores integrina. Diferentes integrinas pueden reconocer el mismo ligando y a su vez una única integrina puede ser capaz de unir diferentes ligandos. Figura de Hynes, 2000

Las integrinas pertenecen a una gran familia de receptores de la superficie celular que median la adhesión a la ECM y ciertas interacciones célula-célula (Hynes, 2002). Son heterodímeros compuestos por una subunidad alfa (α) y una subunidad beta (β). Se ha determinado que existen 8 subunidades β y 18 subunidades α , las cuales se ensamblan

Estos receptores pueden señalar a través de la membrana en cualquiera de dos direcciones: de adentro hacia afuera (inside-out) o de afuera hacia adentro (outside-in) (Qin et al., 2004), donde las interacciones con la ECM son reguladas desde el interior de la célula, o donde la unión a la ECM origina señales que serán transmitidas hacia el interior de la célula, respectivamente. La unión de las integrinas a los ligandos de la ECM es seguida por el reclutamiento por el dominio citoplasmático de la integrina de varias moléculas señalizadoras y adaptadoras, y de la iniciación de cascadas de señalización que controlaran la forma, polaridad, motilidad, proliferación, supervivencia/apoptosis y diferenciación celular (Danen et al., 1998; Lafrenie & Yamada, 1996; Lafrenie & Yamada, 1998). Las integrinas y sus componentes asociados del citoesqueleto poseen un papel clave en la eficiente transducción de señal a través de la vía del receptor tirosina kinasa (RTK)/Ras/MAP kinasa así como varias otras vías de señalización incluyendo PKC, PI3K y Rho GTPasas. Las vías de señalización intracelulares estimuladas por las integrinas están acopladas a aquellas activadas por factores de crecimiento solubles (Figura 6; de Liotta & Kohn, 2001)

Por lo tanto, las respuestas celulares a los factores de crecimiento dependen de adhesiones mediadas por las integrinas. De hecho, las integrinas pueden modular la habilidad de una vía de responder a factores de crecimiento exógenos, y puede también estimular directamente elementos de esta cascada de señalización. La activación de las integrinas puede aumentar la eficiencia de la activación de los RTKs y, en algunos casos, puede desencadenar la activación de RTKs aun en ausencia de factores de crecimiento

(discutido en Bill et al., 2004; Hynes, 2002; Yamada & Even-Ram, 2002). Posiblemente diferentes integrinas posean roles específicos en la modulación de los procesos de señalización. Por ejemplo, la sobre expresión de la integrina $\alpha 5$ pero no de la $\alpha 2$ en

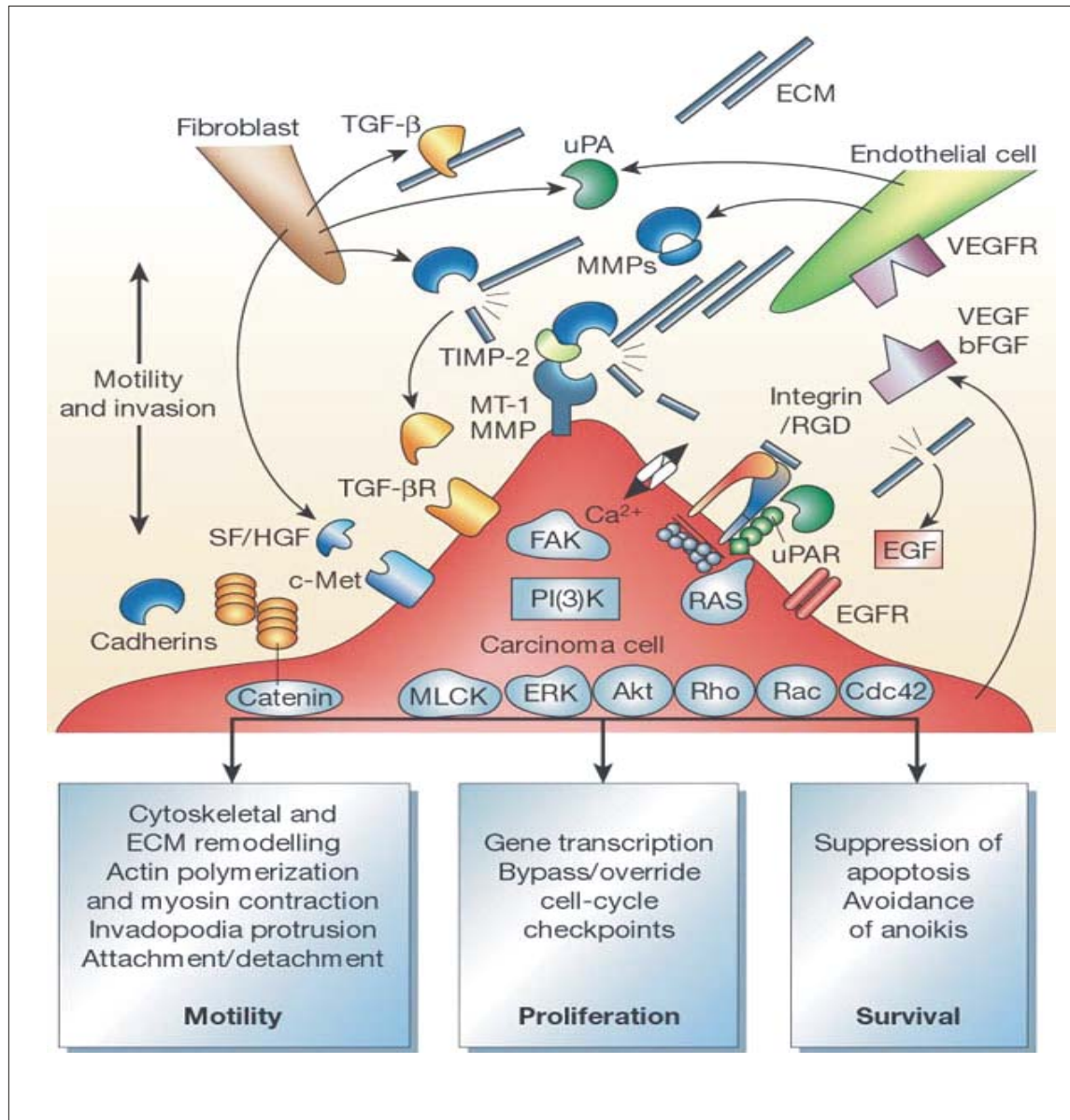


Figura 6. Las interacciones entre integrinas y otros receptores activan diferentes vías de señalización

Esquema representando los distintos receptores presentes en la superficie celular, junto con sus ligandos y sus respectivas posibles interacciones, así como las principales moléculas de las vías de señalización activadas por estos y finalmente los efectos observables en la célula. Figura de Liotta & Kohn, 2001).

células epiteliales de intestino de rata las protege contra la apoptosis, y esto estaría mediado a través de la activación de la vía PI3K/Akt dependiente de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (discutido en Miyamoto et al., 1998).

También existe un “crosstalk” entre receptores hormonales e integrinas, y varios estudios sugieren que las interacciones célula- ECM ejercen un impacto significativo en el control hormonal del desarrollo de la glándula mamaria (Haslam & Woodward, 2001). De hecho, hormonas como el estrógeno pueden afectar las interacciones célula- ECM a través de la modulación de la expresión de diferentes integrinas, mientras que las proteínas de la ECM pueden controlar las respuestas celulares al estrógeno por medio de la regulación de la expresión de su receptor.

La mayoría de las integrinas se unen a proteínas de la ECM, como colágenos, fibronectina (FN), y LMs. Algunas de ellas también interactúan con receptores celulares como VCAM-1 (vascular cell adhesión molecule-1) e ICAM (intercellular cell adhesión molecule) y cadherinas. Varias integrinas pueden compartir entre sí el mismo ligando, pero a su vez, diferentes ligandos pueden ser reconocidos por una misma integrina. A pesar de esta aparente redundancia, estudios genéticos revelaron que varias integrinas

poseen funciones únicas e irremplazables (discutido en Hynes, 2002 y en Sheppard, 2000).

La expresión de genes de la leche por la glándula mamaria requiere de las señales coordinadas de hormonas y BM, y las integrinas $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$ y $\alpha6\beta4$, junto con el distroglicano (Muschler et al., 2002) están involucradas en el control de la diferenciación terminal de MECs (Edwards & Streuli, 1995; Hovey et al., 2002; Neville et al., 2002; Streuli et al., 1991; discutido en Fata et al., 2004; Taddei et al., 2003). También existe evidencia que sugiere que las interacciones célula- ECM mediadas por las integrinas podrían incrementar la diferenciación de las MECs facilitando el establecimiento de uniones de tipo gap, adherens y tight.

A pesar de que estudios inmunohistológicos tempranos con tejido mamario humano y murino concluyeron que las integrinas $\alpha2$, $\alpha3$, $\alpha6$, $\beta1$ y $\beta4$ se encontraban presentes en el parénquima mamario normal, con las células mioepiteliales siendo teñidas más consistentemente que las células luminales (Koukoulis et al., 1991), datos más recientes sugieren lo contrario (Fendrick et al., 1998). El mismo fue el caso de la expresión de la integrina $\alpha5\beta1$, la cual se consideraba limitada al estroma mamario, hasta que estudios recientes demostraron su presencia en la superficie basal de las células mioepiteliales (Haslam & Woodward, 2001). Más aún, los niveles de la integrina $\alpha5\beta1$ aumentan significativamente durante la pubertad y la maduración sexual, y disminuyen durante la última etapa del embarazo y la lactancia, sugiriendo el control hormonal de su

expresión. De hecho, los períodos de activa proliferación y ramificación de la glándula mamaria normal, así como los cánceres de mama, donde la proliferación e invasión juegan papeles importantes, se correlacionan con altos niveles de integrina $\alpha 5\beta 1$ y de su ligando FN. Se ha postulado que la expresión local de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y de su sustrato en la glándula mamaria, podría regular la morfogénesis al convertir contactos célula-célula en adhesiones célula-ECM (Miyamoto et al., 1998). De hecho, la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αv parece encontrarse estrictamente regulada, siendo restringida a ciertos estadios del desarrollo y a regiones del árbol mamario, así como serían sobre-expresadas en el cáncer de mama (Koukoulis et al., 1993). Por lo tanto, nos interesó estudiar estas integrinas en particular, ya que los datos parecieran subrayar la importancia de las integrinas $\alpha 5$ y αv en el desarrollo de la mama normal así como en el cáncer de mama.

La expresión de las integrinas está controlada por la ECM y se encuentra rápidamente regulada en cultivos primarios, y la regulación de la expresión de integrinas durante la morfogénesis mamaria se encuentra controlada transcripcional y post-transcripcionalmente (Delcommenne & Streuli, 1995).

Prince y colaboradores (2002) demostraron que la integrina $\beta 1$ posee una función importante en el control de la supervivencia de las MECs in vivo, y su función se encuentra determinada no por su presencia o ausencia en la superficie celular (ya que esta integrina se encuentra en MECs en todos los estadios de desarrollo), sino por su nivel de

activación: los niveles de integrina $\beta 1$ unida a ligando disminuyen marcadamente al inicio de la involución, previo al pico de apoptosis (Prince et al., 2002).

La morfogénesis mamaria incluye la “invasión” epitelial del tejido adiposo, un proceso relacionado con la invasión por las células tumorales mamarias, aunque el primero es un proceso altamente regulado (Fata et al., 2004). No se encuentra claro cuales son las integrinas que se encontrarían involucradas en estos procesos, pero pareciera haber ciertas similitudes entre la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ tanto durante la “invasión” del tejido adiposo por MECs normales como durante la invasión de las células tumorales: la integrina $\alpha 5\beta 1$ se encuentra elevada en tumores de mama y durante la fase proliferativa del desarrollo normal de la mama, sugiriendo que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría ser necesaria para la invasión. Otra integrina que se sugirió posee una función en el desarrollo de la glándula mamaria es la integrina $\alpha 2$, ya que ratones deficientes en la integrina $\alpha 2$ poseen defectos importantes en el desarrollo mamario (Chen et al., 2002). Más aun, otras preguntas que aún se encuentran sin respuesta son: ¿cómo es que estas vías morfogenéticas se encuentran integradas en la glándula normal, y como es que se desregulan en la progresión del cáncer de mama? Pero los descubrimientos de White y colaboradores (2004) y Weaver et al (1997), que muestran que la integrina $\beta 1$ es esencial para la formación de tumores mamarios y para la expresión del fenotipo maligno, respectivamente, apoyarían la idea de que las integrinas poseen un rol fundamental en la integración de diversas vías morfogenéticas que controlan el desarrollo mamario (Weaver

et al., 1997; White et al., 2004). Mientras que las glándulas mamarias puberales de ratones knock out condicionales para la integrina $\beta 1$ no presentaron ninguna clase de defectos en el desarrollo, ratones deficientes en la expresión de la integrina $\beta 1$ en su tejido mamario no desarrollaron tumores inducidos por la expresión transgénica de MMTV/ PyV MT (White et al., 2004). Más aún, en otro modelo de ratones deficientes en integrina $\beta 1$, Li et al (2005) encontraron que esta integrina sería fundamental para la proliferación de las MECs (Li et al., 2005). Consistentemente, la inhibición de la función de la integrina $\beta 1$ fue suficiente para revertir el fenotipo maligno de células humanas de tumor de mama en cultivos 3D rBM y en ratones nude (Weaver et al., 1997). Esto sugiere que la integrina $\beta 1$ podría tener una función central en el control del desarrollo del cáncer de mama.

CANCER DE MAMA

El cáncer de mama es la neoplasia mas comúnmente diagnosticada en mujeres. Se ha postulado que el desarrollo del cáncer de mama es un proceso compuesto por múltiples etapas que sigue una secuencia definida de eventos cualitativamente diferentes, los cuales incluyen la progresión de hiperplasia ductal e hiperplasia ductal atípica, que representan los estadios iniciales del crecimiento neoplásico, al carcinoma in situ, el carcinoma invasivo y finalmente las metástasis (Figura 7). Tanto el cáncer de mama como las lesiones hiperplásicas de la mama se originan a partir de las células epiteliales de la TDLU (Russo & Russo, 2001).

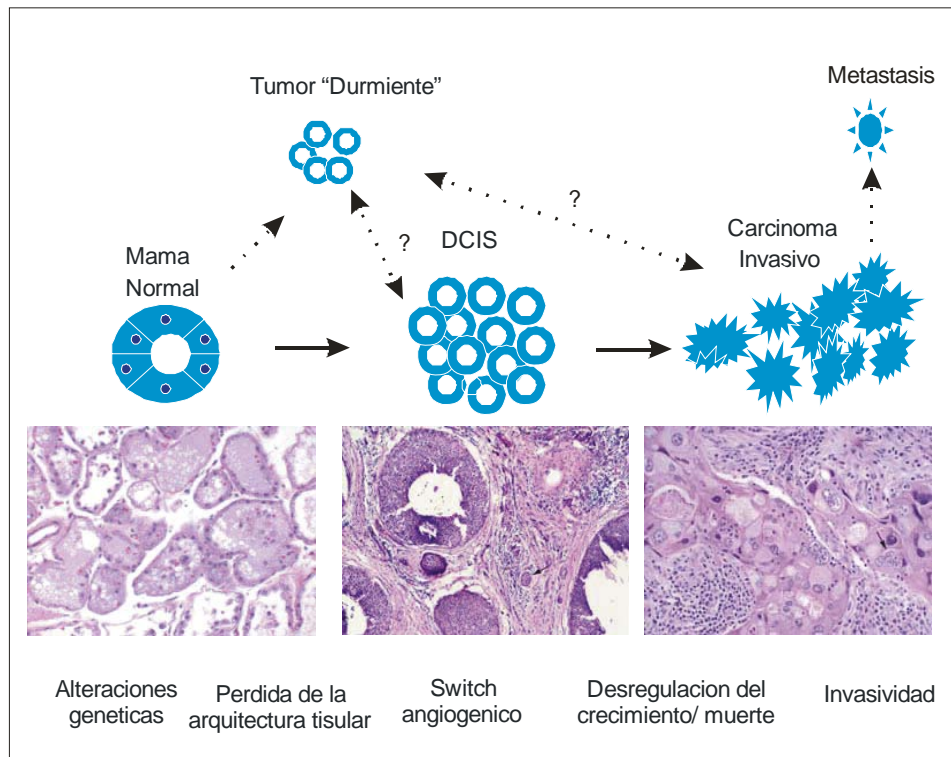


Figura 7. Progresión del cáncer de mama.

Fotomicrografías de secciones de tejido de una mama normal, un DCIS y un carcinoma invasivo teñidas con hematoxilina y eosina (obtenidas del Atlas Histológico del Cáncer de Mama on line). En la parte superior se representan los distintos estadios en forma de cartoon.

A pesar de que el desarrollo del cáncer podría proceder, como se indicó más arriba, en múltiples etapas que resultan en la transformación de las células epiteliales debido a múltiples hits (modelo genético; discutido en Hanahan & Weinberg, 2000 y Vogelstein & Kinzler, 2004), cada vez se hace más evidente que alteraciones genéticas discretas en células epiteliales no logran explicar el modelo de carcinogénesis en múltiples etapas, en el cual las células tumorales son capaces de expresar diferentes fenotipos durante las complejas fases del desarrollo y la progresión tumoral (Hanahan &

Weinberg, 2000; Liotta & Kohn, 2001; Mueller & Fusenig, 2004; Unger & Weaver, 2003). El modelo epigenético propone que el microambiente ejerce una inhibición inicial que controla el crecimiento tumoral y que es seguida por una aceleración de la progresión tumoral a través de interacciones complejas célula-matriz con el estroma (Kuperwasser et al., 2004; Maffini et al., 2004). Las interacciones con el estroma alteran los factores requeridos para la progresión premaligna y el crecimiento del cáncer primario así como para la invasión y metástasis. Estudios de desarrollo embrional sugirieron una función de las células estromales en la carcinogénesis; en estos, las interacciones instructivas y permisivas, junto con los factores genéticos, son requeridos para la programación y el mantenimiento de la estructura y función epiteliales. Las células epiteliales embrionales y las células mesenquimáticas instructivas interactúan en un diálogo molecular recíproco que asegura el correcto desarrollo y función del órgano. Se cree que las contrapartes adultas de estas interacciones epitelio- estroma proveen señales regulatorias que mantienen la homeostasis. La transformación maligna de las células epiteliales interfiere con dicha regulación homeostática, afectando el control de la arquitectura tisular, la adhesión, la proliferación y la muerte celular (Tlsty, 2001).

La progresión del cáncer de mama se encuentra definida por sus diferentes estadios patológicos, y el diagnóstico de una lesión como precursora o premaligna se basa en la asociación de características histológicas a nivel de arquitectura tisular y celular con el desarrollo de la enfermedad (Jensen et al., 1993; Page & Dupont, 1990; Page & Dupont, 1990; Weaver et al., 1997). Estas prácticas están basadas primariamente en la

asociación retrospectiva entre histología y datos de seguimiento a largo plazo, pero no permiten el examen riguroso de una conexión directa o el entendimiento de los marcadores moleculares causales de la transformación maligna. El carcinoma in situ es aceptado como una lesión premaligna, y la adquisición de la capacidad de invadir la BM es el criterio clave de la definición de malignidad (Allred & Medina, 2000; Allred & Mohsin, 2000). La conversión al fenotipo invasivo es algo distinto a las metástasis, pero es un pre-requisito obligado para el desarrollo metastático, y por lo tanto representa una etapa crucial en la progresión del cáncer.

El reciente interés en la comprensión de la composición molecular de la ECM, y la base molecular de los descubrimientos clásicos de que las células normales- en contraste con las células tumorales- dependen de anclaje para su crecimiento y supervivencia (Folkman & Moscona, 1978; Hannigan et al., 1996) ha apoyado el concepto de que la ECM y las integrinas serían reguladores centrales de la diferenciación, la apoptosis, y el cáncer (Boudreau, 1995; Boudreau et al., 1996; Weaver et al., 1996; Werb et al., 1996 y Weaver et al., 1997). La ECM es crucial para la regulación de estos procesos tanto en las células epiteliales como en las fibroblásticas.

Para convertirse en un tumor maligno, las células de un DCIS deben ser capaces de invadir el estroma subyacente. Consistentemente, el desarrollo del cáncer de mama a partir de un DCIS se caracteriza por perturbaciones en las interacciones epitelio-estroma, y los tumores mamarios y las líneas celulares malignas exhiben alteraciones

características en la expresión de integrinas al compararlas con las células de lesiones pre-malignas (Damjanovich et al., 1997; Gui et al., 1997; Morini et al., 2000; Pignatelli et al., 1992; Zutter et al., 1993; Zutter et al., 1998; discutido en Koukoulis et al., 1993; Koukoulis et al., 1991; Mercurio et al., 2001). Esto sugiere que las integrinas estarían cumpliendo una función importante en la transformación maligna de la mama.

INTEGRINAS Y ECM EN EL CÁNCER DE MAMA

Las integrinas han sido implicadas en varios aspectos de la progresión tumoral, incluyendo la supervivencia de las células tumorales, la inducción y activación de enzimas degradativas de la matriz, y la migración y anclaje en los sitios de metástasis. A su vez, la expresión de varias integrinas en las células tumorales mamarias ha sido asociada a las diferencias en su comportamiento metastático (Lee & Juliano, 2002) y (Lee & Juliano, 2004). Aún quedan varias preguntas sin responder, por ejemplo: ¿cuáles son los cambios que ocurren en la expresión de las integrinas durante el desarrollo del cáncer de mama? ¿Cuáles son las integrinas específicas que interactúan con distintos receptores de factores de crecimiento, así como con otros receptores implicados en la remodelación de la glándula mamaria y la formación del cáncer, incluyendo al receptor del activador del plasminógeno de tipo urokinasa (uPAR: urokinase- type plasminogen activator receptor)? ¿Qué factores regulan los cambios en la expresión, actividad y el cross-talk de las integrinas? ¿Cuál es el rol de los cambios en la expresión, actividad y el cross-talk de las integrinas durante el desarrollo normal y la transformación maligna?

Las integrinas y la ECM son fundamentales en la formación de metástasis. Las integrinas expresadas por las células tumorales y por las células normales del huésped pueden contribuir directamente al control y la progresión de la diseminación metastásica (Fidler, 1990) y (Fidler, 2002). Durante el desarrollo tumoral, los cambios en la expresión de distintas integrinas, así como el control de sus funciones y de las señales percibidas por las integrinas al unirse a su ligando, poseen un impacto profundo sobre la capacidad de las células tumorales de interactuar con su ambiente y podrían permitir que las células metastásicas pasen de un estado estacionario y sésil a un fenotipo migratorio e invasivo. Las integrinas están involucradas en cada uno de los pasos de la cascada metastásica y afectan la supervivencia de las células tumorales y su interacción con ambientes cambiantes en su tránsito desde el tumor primario hacia órganos distantes (Felding-Habermann, 2003). La expresión de integrinas en las células tumorales mamarias ha sido asociada a diferentes comportamientos metastáticos. En su trabajo, Bartsch y colaboradores (2003) mostraron que las integrinas $\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ pueden estar involucradas en la adhesión y migración de células tumorales mamarias hacia vitronectina y FN, ambas proteínas importantes en las metástasis (Bartsch et al., 2003). En las lesiones metastáticas, la expresión de la integrina αv aumenta la adhesión al hueso (Pecher et al., 2002).

En tejidos involucrados en enfermedades inflamatorias, el $IFN\gamma$ y el $TGF\beta$ podrían inducir la producción local de FN y TN (Damsky et al., 1992; Takizawa et al., 1995).

Vitolo y colaboradores (2000) demostraron que la integrina $\alpha 5\beta 1$ se encontraba ausente en la supraglotis normal, pero presente en el carcinoma de supraglotis; y el estroma de tumores de supraglotis primarios y metastáticos expresaba TN y FN (Vitolo et al., 2000). Estos autores sugirieron que la expresión tumoral de TGF β 1 podría ayudar al crecimiento y la progresión tumoral vía una regulación negativa de los procesos inmunes y vía aumento de la expresión de las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, y TN, que favorecerían la infiltración local y las metástasis.

Jiang (1992) y otros compararon el patrón de expresión de integrinas en epitelio respiratorio normal, metaplásico y canceroso y encontraron que los dos primeros no expresaban la integrina $\alpha 5$, mientras que la mayoría de los carcinomas in situ e invasivos y todos los tumores metastáticos expresaban esta integrina (Jiang & Chuong, 1992; Vitolo et al., 1992). Tani y colaboradores (2003) encontraron que células CHO que expresaban diferentes niveles de la integrina $\alpha 5\beta 1$ poseían diferente habilidad para formar tumores primarios y metastatizar a distintos órganos. Sus experimentos demostraron que en las células tumorales existe un nivel de integrina $\alpha 5$ apropiado que lleva a la formación de metástasis: en este caso, las células que expresaban los mayores niveles de integrina $\alpha 5\beta 1$ eran las más potentemente metastásicas en riñón (Tani et al., 2003).

Von Schlippe et al (2000) observaron que líneas celulares de carcinoma de mama aumentaban su migración vía la integrina αv debido a una regulación negativa de E-cadherina, todo esto sin modificar los niveles de expresión de integrinas (von Schlippe et al., 2000). Estos autores demostraron que las integrinas $\alpha v(\beta x)$ suprimen la morfogénesis dependiente de E-cadherina endógena, ya que anticuerpos bloqueantes de función contra la integrina αv indujeron la formación de esferoides en líneas celulares de cáncer de mama expresando E-cadherina fuertemente asociada al citoesqueleto. Esto sirve de evidencia para demostrar que existe un crosstalk entre cadherinas e integrinas, y sugiere que interacciones particulares entre E-cadherina e integrina αv podrían cumplir una función fundamental en la invasión tumoral y las metástasis.

Se ha demostrado que los cánceres primarios de mama, colon, piel y próstata sobre expresan heterodímeros de integrinas compuestos por una subunidad $\beta 1$ y que estas integrinas exhiben cambios en su señalización (Cress et al., 1995; Fujita et al., 1995; Leppa et al., 1995; Mortarini et al., 1995; Shaw et al., 1996), y la sobre expresión de la integrina $\beta 1$ también ha sido asociada al aumento de la agresividad del tumor, de su capacidad invasiva y de su potencial metastático (Friedrichs et al., 1995).

También existe evidencia que sugiere que otras integrinas tendrían funciones importantes en el crecimiento tumoral y las metástasis, por ejemplo: los receptores de LM, las integrinas $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$ promueven la supervivencia celular y la migración de

células de carcinoma de mama, las cuales generalmente expresan altos niveles de integrina $\alpha6\beta4$ pero no forman hemidesmosomas (los cuales anclan la célula y perturban la migración) (discutido en Taddei et al., 2003). Por ejemplo, la integrina $\alpha6\beta4$ puede asociarse con microfilamentos de actina en las protrusiones invasivas de la membrana y sirve para estimular la motilidad. De manera similar, la activación de la integrina $\alpha v\beta3$ en la superficie de las células tumorales mamarias promueve fuertemente las metástasis gracias a que sostiene la adhesión celular durante el flujo sanguíneo y se correlaciona con la producción de MMP-9 madura y la estimulación de la migración de células de cáncer de mama humano. Se ha sugerido que la integrina $\alpha v\beta3$ estaría involucrada en el desarrollo de las metástasis en hueso y que esta integrina aceleraría la formación de lesiones osteolíticas, mientras que las células tumorales que expresan $\alpha v\beta3$ integrina se adhieren al hueso y muestran una elevada capacidad para invadir el hueso (Taddei et al., 2003).

La transición epitelio-mesénquima (EMT) forma parte del proceso normal de morfogénesis y se encuentra involucrado en la progresión tumoral, y en particular, es considerada un regulador clave de las metástasis tumorales (Thiery, 2002). Consistentemente, la EMT se caracteriza por la disrupción de contactos célula-célula, adhesión de la BM, y la adquisición de un fenotipo motil y scattering celular. La EMT podría llegar a ser inducida por exposición de la célula a factores de crecimiento tipo TGF- β y a ciertos componentes de la BM, en particular colágeno y LM 5. Por lo tanto, las integrinas podrían estar jugando un rol dual en la EMT, proveyendo a la célula de

conexiones mecánicas con el sustrato y participando en la inducción y activación de MMPs y uPAR. También existe evidencia que sugiere que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría regular la expresión y función del TGF- β R tipo II, planteando la posibilidad de que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría tener un papel en la modulación de la EMT (Wang et al., 1999)

INTEGRINA ALFA 5 BETA 1

La integrina $\alpha 5\beta 1$ es el clásico receptor de FN (Figura 5), y cada vez mas evidencia sugiere que la emergencia de la expresión de esta integrina se correlaciona con la progresión tumoral (Jia et al., 2004; Maschler et al., 2005). Esta familia de integrinas cumple una función fundamental en complejos eventos biológicos como la diferenciación, el desarrollo, la cicatrización de heridas, y en la alteración de las propiedades adhesivas e invasivas de las células tumorales (Jin & Varner, 2004). Esto no es sorprendente, ya que el estroma reactivo que rodea a los tumores en desarrollo expresa niveles elevados de FN (Ioachim et al., 2002). Las líneas celulares tumorales, así como las células epiteliales de tumores primarios también producen grandes cantidades de FN, por lo que es razonable esperar que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ también aumente en células transformadas incluyendo células tumorales de mama. La FN y las integrinas cumplen una función crucial en una variedad de procesos morfogénéticos, en los que median la adhesión celular, la supervivencia, la migración, y la transducción de señal. Inducen la organización transmembrana de moléculas de señalización y del citoesqueleto en complejos multimoleculares de más de 30 proteínas (Dedhar, 1995; Lafrenie &

Yamada, 1998; Miyamoto et al., 1998). La organización de estos complejos es un proceso sinérgico que depende de la agregación y ocupación de las integrinas, así como de la fosforilación de tirosinas. Integrinas como la $\alpha 5\beta 1$ también cooperan con receptores de factores de crecimiento para aumentar su señalización. La FN y las integrinas inducen varios efectos río abajo, incluyendo la estimulación de la actividad de factores de transcripción, la expresión de más de 30 genes (más de la mitad nuevos), y la expresión alterada de más de 100 proteínas. Así, FN e integrinas disparan una variedad de respuestas de señalización involucradas en la regulación de procesos cruciales para la morfogénesis normal, incluyendo la adhesión, la supervivencia y la migración celular, y la expresión de genes específicos (Miyamoto et al., 1998).

Debido a su rol crítico en la regulación del comportamiento migratorio y la supervivencia celular, no es sorprendente que los niveles de la integrina $\alpha 5\beta 1$ se encuentren generalmente elevados en los tumores. Por ejemplo, los gliomas malignos expresan altos niveles de la subunidad $\alpha 5$ integrina. Por lo tanto, ¿qué es lo que controla la expresión de integrinas en un tejido? A pesar de que el estudio de la regulación de las integrinas se encuentra en sus etapas iniciales, se han descubierto sitios de unión del factor de transcripción Ets1 en los promotores de varias integrinas, incluyendo el gen de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Más aún, se sabe que el Ets1 regula la expresión de genes asociados con la invasión tumoral, la angiogénesis, la adhesión celular y el desarrollo organotípico. La inhibición de la expresión de Ets1 inhibe la adhesión de las células de glioma y la migración sobre FN, y también bloquea la invasividad de tumores de mama y de próstata

(Delannoy-Courdent et al., 1998; Foos & Hauser, 2000; Kita et al., 2001). Por lo tanto, la regulación positiva de la expresión de la subunidad $\alpha 5$ integrina por Ets1 podría ser una vía por la cual los gliomas podrían hacerse invasivos y aumentar a su vez su adhesión celular y su fenotipo migratorio.

Los roles de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la cual ejerce efectos tanto facilitatorios como inhibitorios sobre la migración celular, podrían depender del tipo celular, y de los componentes de la ECM, ya que ha sido demostrado que dependiendo del tipo celular, diferentes integrinas pueden mediar distintos eventos de señalización. Por ejemplo, a pesar de que la integrina $\alpha 2\beta 1$ no es capaz de inducir la proliferación de algunos tipos de células, pareciera poseer una función fundamental sobre otros, como por ejemplo las MECs (Zutter et al., 1999). Usando geles de colágeno, Zutter y colaboradores (1999) mostraron que el dominio citoplasmático de la integrina $\alpha 2$, pero no el de la integrina $\alpha 1$, induce la morfogénesis de ramificación de las MECs (Zutter et al., 1999). Pero Stahl et al (1997) demostraron que, usando rBM, la integrina involucrada en la morfogénesis era el receptor de LM, la integrina $\alpha 6\beta 4$ (Stahl et al., 1997).

La importancia de la composición de la ECM ha sido remarcada por otros autores como Howlett et al (1995), quienes compararon los efectos de anticuerpos bloqueantes de la morfogénesis acinar de las MECs. Estos encontraron que cuando cultivaban las células en rBM, anticuerpos anti- $\beta 1$ o anti- $\alpha 3$ lograban inhibir la formación de acinos, pero cuando estas células eran cultivadas en geles de colágeno tipo I, la morfogénesis se

inhibía en cambio con anticuerpos anti- $\beta 1$ y anti- $\alpha 2$ (Howlett et al., 1995). A pesar de esto, en otras células tumorales derivadas de una de las líneas celulares normales utilizadas en su estudio (HMT-3522), anticuerpos (Abs) anti- integrina $\beta 1$ lograron ‘revertir’ el fenotipo tumoral e indujeron la formación de estructuras acinares en rBM (Figura 8; de Weaver et al., 1997). Se encontró que esto estaba ligado a la modulación negativa del EGFR en 3D (pero no en monocapa), y mediado por la vía FAK/MAPK (Wang et al., 1999; Weaver et al., 1997).

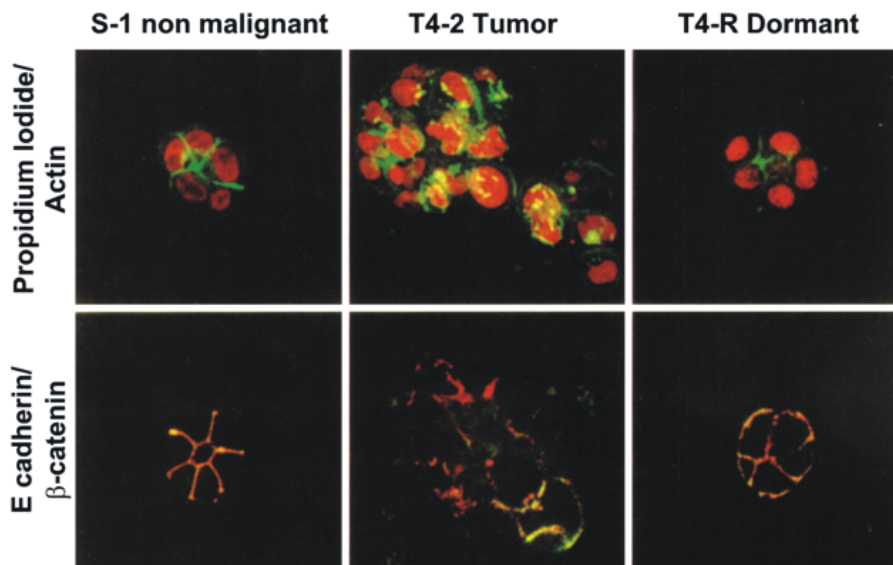


Figura 8. Reversión fenotípica de las células tumorales T4-2 a un estado durmiente alterando las interacciones epitelio-estroma

Inmunofluorescencia para diferentes marcadores de polaridad. Arriba: actina (verde) y núcleos teñidos con yoduro de propidio (rojo); abajo: E-cadherina (verde) y β -catenina (rojo). Cultivos 3D rBM (21 ds) de células no malignas S1, células tumorales T4-2, y células T4-2 co-incubadas con Abs bloqueantes de función de la integrina $\beta 1$ (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mostrando la reversión del fenotipo tumoral. Figura de Weaver et al, 1997.

ANGIOGENESIS

Un tumor no sobrevivirá luego de alcanzar un diámetro de 2 mm si no posee una red de capilares que lo provean de sangre; por otra parte las células tumorales necesitan entrar al torrente sanguíneo para metastatizar a nódulos linfáticos y sitios distantes en el cuerpo (Folkman, 1992; Folkman & Shing, 1992). Por lo tanto, la angiogénesis, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, es un paso esencial en la progresión tumoral, la invasión y la formación de metástasis. Una importante respuesta angiogénica se correlaciona con y es crítica para la morfogénesis, el desarrollo, y la diferenciación de la glándula mamaria (Djonov et al., 2001). Contrariamente, durante la involución de la glándula mamaria, el número de vasos sanguíneos disminuye, acompañando la muerte celular y sugiriendo que la angiogénesis también tendría un rol importante en la regulación de la muerte de las MECs in vivo.

Se cree que la neovascularización de una masa tumoral comienza con la síntesis y secreción de factores de crecimiento y otros factores angiogénicos por las células tumorales, incluyendo entre estos factores al vascular endothelial growth factor (VEGF), el basic fibroblast growth factor (bFGF), la interleuquina-8 (IL-8), así como otros factores que estimulan a las células endoteliales (ECs) de capilares vecinos. Estas ECs “activadas” degradan la BM de los vasos sanguíneos y penetran el tejido adyacente, comenzando a migrar hacia la fuente del factor angiogénico y proliferando para formar

una nueva red de capilares que proveerá al tumor en crecimiento de gases y nutrientes (Folkman, 1974) (Figura 9).

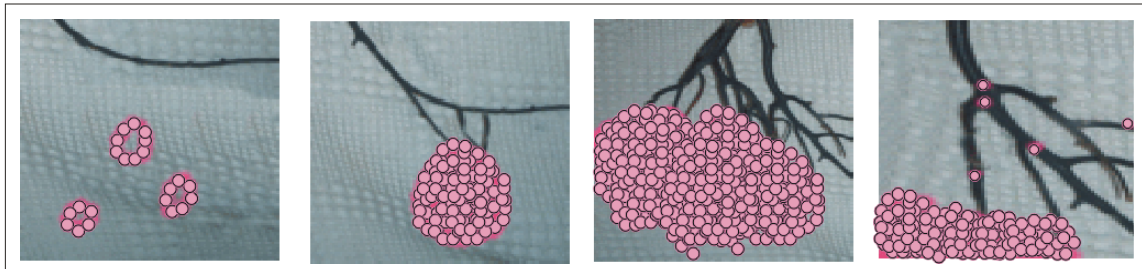


Figura 9. Switch angiogénico en la progresión maligna.

Representación del switch angiogénico observado en la transformación maligna, comenzando con una mama normal (primer panel, mostrando acinos normales y ausencia de angiogénesis), un DCIS (segundo panel, obsérvense los nuevos vasos sanguíneos que comienzan a crecer hacia la lesión premaligna), un tumor invasivo (tercer panel) y finalmente metástasis (cuarto panel, células metastáticas que intravasaron al torrente sanguíneo para extravasar en un nuevo órgano y dar lugar a las metástasis).

La migración y el arresto de las ECs durante el proceso angiogénico requieren de la regulación de la síntesis así como de la degradación de la ECM, y de la adhesión a ésta de las ECs. Más aún, la transición de un carcinoma invasivo a partir de una mama normal es precedida por o concomitante con la activación del estroma local. La desorganización y disrupción del estroma periglandular y de la arquitectura de la mama es concomitante con un switch angiogénico local que precede la transformación maligna franca durante la transformación de un carcinoma in situ a uno invasivo.

Existe suficiente evidencia que sugiere que las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ serían fundamentales para la supervivencia de las ECs y para la formación de vasos sanguíneos

(Brooks, 1994; Hynes, 1992). De hecho, pareciera que la integrina $\alpha 5\beta 1$ y su ligando FN serían necesarios para la correcta formación de la vasculatura durante el desarrollo (George et al., 1993; Muschler & Horwitz, 1991; Yang et al., 1993). Las ECs de los carcinomas humanos de mama y colon muestran una regulación positiva de la integrina $\alpha 5\beta 1$, y la ECM que rodea los vasos sanguíneos del tumor expresa FN; mientras que los vasos sanguíneos de la contraparte normal de estos tejidos son negativos o poseen baja expresión de FN. La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y de la FN se encuentra coordinadamente regulada en varios de los mismos vasos sanguíneos del tumor, sugiriendo la posibilidad de que exista una interacción funcional entre ambas moléculas. Más aún, anticuerpos tanto contra FN como contra la integrina $\alpha 5\beta 1$ inhiben la angiogénesis (Kim et al., 2000).

Distintos factores de crecimiento pueden inducir diversas vías angiogénicas y/o usar distintas integrinas. La interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN puede inducir la regulación positiva de factores de crecimiento angiogénicos como bFGF, TNF- α y IL-8 (Klein et al., 2002; Yancopoulos et al., 2000). El VEGF también induce la regulación positiva de la expresión de FN en la ECM que rodea los vasos sanguíneos, pero no afecta la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Kazi et al., 2004). A su vez, las interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN pueden cooperar con el VEGFR para inducir angiogénesis (Zhang et al., 2005). Abs bloqueantes de la integrina $\alpha 5\beta 1$ inhiben la angiogénesis inducida por TNF- α o IL-8, pero no afectan la angiogénesis inducida por VEGF (Kim et al., 2000). Por lo tanto, los

roles funcionales de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y de la FN en la angiogénesis parecieran ser una consecuencia directa de su capacidad de inducir la expresión de factores de crecimiento.

Tanto la integrina $\alpha v\beta 3$, como la integrina $\alpha 5\beta 1$, pueden servir como receptores de FN cuando ambas integrinas son expresadas. La expresión de estas dos integrinas se encuentra regulada por factores de crecimiento similares. Las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ poseen funciones importantes en la angiogénesis inducida por bFGF, TNF- α , IL-8 y por el tumor, pero no así en la angiogénesis inducida por VEGF (la cual depende de la integrina $\alpha v\beta 5$) (Park et al., 2001). Antagonistas de las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ inducen la apoptosis de ECs in vitro e in vivo interrumpiendo la transducción de señal. Brooks et al (1995) encontraron que la aplicación intravenosa de Abs bloqueante de la integrina $\alpha v\beta 3$ reducía el crecimiento y la invasividad de tumores humanos, y esto pareciera deberse a la perturbación de la angiogénesis inducida por el tumor, sin tener efectos aparentes sobre el tejido normal subyacente (Brooks, 1995).

Algunos estudios sugieren que existe un cross-talk entre las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ (Ly et al., 2003). Por lo tanto, es posible que una integrina regule la acción de la otra a través de mecanismos de transducción de señal durante la angiogénesis.

El VEGF promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos y mantiene su integridad. Un mecanismo fundamental por el cual el VEGF actúa sobre las ECs es la

activación de señales anti-apoptóticas o de supervivencia o en dichas células. De hecho, se encontró que esta molécula proangiogénica serviría de factor de crecimiento para ECs de la retina. Y en las HUVECs, el VEGF inhibe la apoptosis vía activación de la vía de señalización PI3K/Akt (Zachary, 2001).

En un trabajo muy detallado, Ian Zachary (2001) explica los efectos a largo plazo del VEGF sobre la supervivencia celular, y postula que estos se encontrarían mediados probablemente a través de la regulación positiva de componentes de la maquinaria celular anti-apoptótica, como Bcl2 y A1 (los cuales inhiben la activación de caspasas río arriba), y algunos miembros de la familia de los IAP (inhibidores de apoptosis) (Zachary, 2001). La FAK, una molécula kinasa de tirosina no receptora, posee una función clave en la señalización dependiente de integrinas y se encuentra implicada en el mantenimiento de señales de supervivencia en varios tipos de células adherentes incluyendo ECs. Por otro lado, el VEGF promueve la fosforilación en tirosina y la asociación de FAK y paxilina en las adhesiones focales en HUVECs. El cross-talk entre el sistema de integrinas y el VEGFR es de importancia en ECs adherentes a vitronectina (ligando para la integrina $\alpha v \beta 3$); y otras integrinas (Kim et al., 2000; Senger et al., 1997) han sido implicadas en la angiogénesis dependiente de VEGF. El VEGF induce la actividad de la vía MAPK/ERK, la cual poseería un rol central en la estimulación de la proliferación de las ECs. La respuesta mitogénica inducida por VEGF también podría involucrar el cross-talk entre las vías ERK y JNK (Zachary, 2001).

Existe evidencia que prueba que los efectos anti-angiogénicos de la endostatina y otros fragmentos de la ECM involucrarían interacciones con integrinas específicas (Wickstrom et al., 2004). En ECs en cultivo e in vivo, integrinas específicas pueden coordinar su acción con la de factores de crecimiento (Yamada & Even-Ram, 2002). Por ejemplo, el VEGF promueve la adhesión y migración de ECs en cultivo vía las integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ y $\alpha(x)\beta 1$ (Park et al., 2001); y las integrinas que poseen una subunidad $\beta 1$ se encuentran implicadas en la angiogénesis inducida por factores de crecimiento. Antagonistas de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ o $\alpha 2\beta 1$ bloquean la angiogénesis inducida por VEGF, mientras que la migración de ECs y la angiogénesis mediadas por la integrina $\alpha v\beta 3$ dependen del estado de unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la FN.

Existen estudios clínicos que correlacionan el grado de angiogénesis (número de neovasos intratumorales) con la incidencia metastásica (Weidner et al., 1992; Weidner et al., 1991). Coincidentemente con la angiogénesis se ve un aumento de la expresión de FN alrededor de los vasos sanguíneos, y esta se co-localiza con la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$; y viceversa, la integrina $\alpha 5\beta 1$ y el estroma reactivo estimulan la angiogénesis tumoral. Esto sugiere que las interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ -FN serían críticas para la estimulación de la angiogénesis.

INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$, SUPERVIVENCIA TUMORAL Y METASTASIS

Una característica de los carcinomas invasivos es la pérdida de arquitectura tisular normal, donde las células dejan de formar parte de la estructura normal y adquieren la habilidad de migrar, invadir el estroma subyacente e intravasarse a capilares vecinos, sobrevivir durante su circulación en el torrente sanguíneo, extravasarse e invadir el estroma en su destino final en el nuevo órgano, donde darán lugar a focos metastáticos (Fidler, 1990; Meyer & Hart, 1998) (Figura 10; adaptada de Condeelis & Segall, 2003)

La supervivencia de las células metastáticas en el nuevo ambiente depende también de la resistencia apoptótica (Wong et al., 2001; Zahir et al., 2003). Las integrinas se encuentran involucradas en todos los pasos de la cascada metastática y afectan la supervivencia de las células tumorales y su interacción con ambientes cambiantes en su tránsito desde el tumor primario hasta sitios distantes en el cuerpo (Felding-Habermann, 2003).

Se cree que la expresión de integrinas en células de cáncer de mama se encuentra asociada con diferentes comportamientos metastáticos. Jiang et al (1992) compararon los patrones de expresión de integrinas en el epitelio respiratorio normal, metaplásico y canceroso. Los dos primeros eran negativos para la expresión de $\alpha 5$ integrina, pero esta integrina se encontraba expresada en la mayoría de los carcinomas in situ e invasivos y en todos los tumores metastáticos (Jiang & Chuong, 1992; Vitolo et al., 1992).

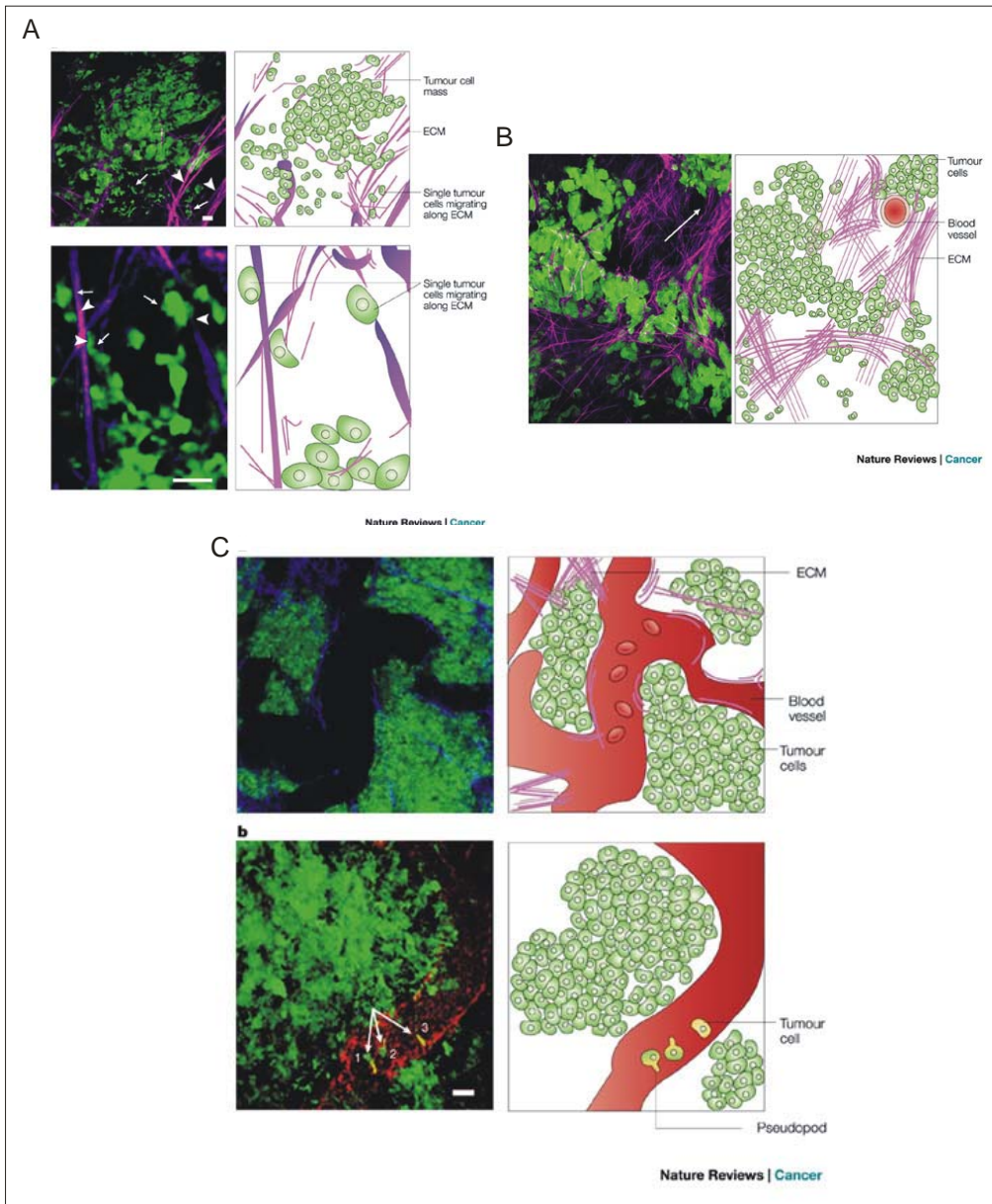


Figura 10. In vivo imaging de células metastásicas

Células metastásicas escapando del tumor primario visualizadas in vivo [A], migrando hacia los vasos sanguíneos vecinos [B], y finalmente viajando dentro de los neovasos [C] luego de su intravasación. Figura adaptada de Condeelis y Segall, 2003.

Tani et al (2003) demostraron que células CHO que expresaban diferentes niveles de integrina $\alpha 5\beta 1$ variaban en su habilidad de formar tumores primarios y metastatizar a diferentes órganos. Las células con altos niveles de expresión de esta integrina no daban lugar a tumores primarios y mostraban reducida capacidad proliferativa in vitro y e in vivo. Estos autores encontraron que los niveles de expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ afectaban específicamente las metástasis al riñón sin afectar las metástasis al pulmón. Las metástasis renales podían ser inhibidas por la administración intravenosa de péptidos RGDs (arginina-glicina-ácido aspártico) (los cuales no afectaban las metástasis a otros órganos). Esto sugeriría que las células tumorales con bajos niveles de integrina $\alpha 5\beta 1$ podrían crecer rápidamente en los sitios primarios, favoreciendo la formación de metástasis, pero una vez en el sitio de metástasis, niveles mayores de integrina $\alpha 5\beta 1$ facilitarían la adhesión a FN, permitiendo a estas células metastáticas crecer y sobrevivir (Tani et al., 2003).

Varios factores se encuentran involucrados en la supervivencia de las células metastáticas, incluyendo el escape de la vigilancia inmunológica, la sobre expresión de factores de crecimiento y/o sus receptores, la regulación positiva de vías de señalización que regula la proliferación y el escape de la apoptosis como PI3K/AKT y las cascadas de señalización autónomas dependientes de la ECM (Zahir et al., 2003), y la vía MEK/ERK respectivamente, y la inducción de la angiogénesis a través de la regulación positiva de moléculas proangiogénicas o la regulación negativa de moléculas antiangiogénicas.

En células adherentes normales, la adhesión a la ECM dependiente de integrinas es esencial para la supervivencia celular y para la activación de MAP Kinasas, y la inducción de la respuesta proliferativa debida a la estimulación con factores de crecimiento ocurre solo en presencia de interacciones entre la célula y su ECM, un fenómeno conocido como 'dependencia de anclaje' (Meredith et al., 1993; Stupack, 2005). Cuando estas señales ECM- integrina están ausentes, las MECs normales entran en un proceso de muerte celular inducido por la falta de adhesión, llamado anoikis (Frisch & Screaton, 2001). Cánceres primarios y metastáticos de mama, colon, piel y próstata muestran sobre expresión de y señalización alterada a través de heterodímeros de integrina que poseen la subunidad $\beta 1$ (Cress et al., 1995); (Fujita et al., 1995; Leppa et al., 1995; Mortarini et al., 1995; Shaw et al., 1996); y la sobre expresión de la integrina $\beta 1$ ha sido asociada con la agresividad del tumor, su invasividad y su potencial metastático (Friedrichs et al., 1995). Más aún, Fujita et al (1992) demostraron que podían inhibir la invasión y metástasis de células de carcinoma gástrico con anticuerpos inhibitorios de la integrina $\beta 1$ (Fujita et al., 1992).

El compromiso de la integrina $\beta 1$, la activación del EGFR y la activación de ERK MAP Kinasas son necesarios para bloquear la expresión de Bim (una molécula pro-apoptótica inducida en MECs luego de la pérdida de adhesión mediada por integrinas) en células epiteliales, hecho que ilustra cómo las integrinas disparan señales de crecimiento en concierto con receptores de factores de crecimiento (Reginato et al., 2003). La sobre expresión estable de la forma activa del EGFR inhibe la desadhesión celular inducida por

la expresión de Bim y lleva a la activación de ERK, previniendo la apoptosis. La sobre expresión del EGFR podría así permitir a las células escapar de la anoikis y e inducir la pérdida de la dependencia de anclaje para su crecimiento y supervivencia (Wang et al., 2004).

A pesar de que las células transformadas pueden superar la dependencia de anclaje para la progresión del ciclo celular y la supervivencia, varios estudios presentaron evidencias de que la señalización vía integrinas podría contribuir con el crecimiento tumoral. De hecho, nosotros y otros autores hemos mostrado que la arquitectura tisular regula la sensibilidad hacia estímulos apoptóticos exógenos vía mecanismos que involucran señalización asociada a integrinas (Zahir et al., 2003). Esto sugeriría que esta “independencia de anclaje” estaría basada realmente en la capacidad que poseen las células transformadas de depositar una BM a la cual adherirse, activando así cascadas de señalización antiapoptóticas y de supervivencia.

Las células metastásicas de cáncer de mama logran crecer en diferentes órganos mimetizando los mecanismos de atracción a quemoquinas utilizados por las células inmunes. Algunas líneas humanas de cáncer de mama metastático sobre expresan receptores de quemoquinas y por lo tanto logran apuntar a órganos blanco que expresen el correspondiente ligando quemoquina. De esta manera, los órganos blanco más comunes para el establecimiento de metástasis de cáncer de mama son la medula ósea, los nódulos linfáticos, el hígado y los pulmones. Más aún, varios de los factores que

regulan el crecimiento del hueso también regulan el desarrollo mamario, y ambos comparten varias de sus características estromales, haciendo del hueso el lugar óptimo para el crecimiento de células mamarias (Wiseman & Werb, 2002).

La proliferación y supervivencia de MECs se encuentra controlada por interacciones recíprocas entre el EGFR y las integrinas, y la inhibición tanto de la integrina $\beta 4$, como de la integrina $\beta 1$ o el EGFR en MECs tumorales creciendo en 3D rBM reprime el fenotipo maligno e induce a las células a entrar en un estado de dormición. Resultados similares se obtienen bloqueando la PI3K o MAPKs (Liu et al., 2004; Wang et al., 1998; Weaver et al., 1997). Otra cuestión fundamental a ser considerada en estos estudios es la capacidad que poseen al menos ciertas integrinas de inducir la expresión de factores de supervivencia y/o migración-invasión autócrinos, como fue demostrado para la integrina $\alpha 6\beta 4$ y el VEGF. El VEGF es un factor angiogénico fundamental, pero también es un factor autócrino esencial para la supervivencia de células metastáticas de carcinomas mamarios in vitro (Bachelder et al., 2001; Chung et al., 2002). El VEGF derivado del tumor (y el estroma) es necesario para el crecimiento expansivo del tumor y para la supervivencia de fibroblastos transformados con Ras. La pérdida de expresión de VEGF por el tumor causa un aumento dramático en la apoptosis de las células tumorales, así como la disminución de la densidad y la permeabilidad vasculares (**Grunstein et al., 1999**).

VEGF Y SUS RECEPTORES COMO UN MECANISMO DE SUPERVIVENCIA AUTOCRINO

Dejando de lado su capacidad angiogénica, el VEGF puede influir en la supervivencia de las células tumorales mamarias a través de su interacción con su receptor, VEGFR, en la superficie de las células tumorales. El VEGF producido por las células de carcinoma mamario es esencial para su invasión, a través de la expresión del receptor de quemoquinas CXCR4, el cual permite la migración de estas células hacia el SDF-1, una molécula presente en el estroma tumoral y en tejidos como los nódulos linfáticos y los pulmones, principales blancos de los tumores invasivos de mama (Bachelder et al., 2002).

La familia de proteínas del VEGF es un grupo de factores angiogénicos que regulan el crecimiento de las ECs (Wulfig et al., 2005). Existen cuatro isoformas fundamentales del VEGF (A, B, C y D). El VEGF-A se considera el regulador de angiogénesis y vasculogénesis más crucial, y su expresión ha sido demostrada en células tumorales de varios cánceres humanos, incluyendo el cáncer de mama. Han sido identificados tres receptores de tirosina kinasa fundamentales: VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1 en ratón y KDR en humanos) y VEGFR-3 (flt-4). El KDR se considera el principal mediador de la angiogénesis. Al principio se creía que la expresión de flt-1 y KDR era exclusiva de las ECs, pero en la última década estos receptores fueron detectados en varios tipos celulares no endoteliales, como células de carcinoma mamario,

de melanoma y células de carcinoma de ovario, sugiriendo un rol fisiológico y autócrino para el VEGF en las células tumorales, independiente de su función en la angiogénesis (Boocock, 1995; Graeven et al., 1999; Speirs & Atkin, 1999). Se ha reportado que la sobre expresión de flt-1 potencia la supervivencia en células tumorales mamarias, mientras que la expresión de KDR se encuentra asociada a un mal pronóstico (Zhukova et al., 2003). Pero en otro trabajo se encontró que flt-1 estaría relacionado con un mayor riesgo de recurrencia local y metastásica en pacientes con cáncer de mama.

Otra categoría de activadores angiogénicos evaluados en carcinomas humanos de mama es la familia del FGF. Los FGFs son moléculas de señalización importantes para la angiogénesis, el crecimiento y la progresión tumoral (Kern & Lippman, 1996; Mason, 1994). Entre los FGFs, el bFGF es el más activo factor de crecimiento del endotelio, y varios estudios demostraron su expresión en cánceres de mama. A pesar de estos hechos, la relevancia clínica de la expresión del bFGF en células de cáncer de mama es todavía poco clara, ya que existen resultados conflictivos en la literatura (Colomer et al., 1997; Smith et al., 1999).

A pesar de que la angiogénesis (y la expresión de VEGF) mostraron estar presentes ya en el estadio precanceroso de DCIS, Wulfing et al (2005) demostraron que mientras que las células mamarias normales y los DCIS puros no expresaban flt-1, ambos tipos celulares expresaban KDR y flt-4. Interesantemente, opuesto a lo observado para el DCIS puro, DCISs que presentaban un carcinoma invasivo coexistente mostraban

elevada expresión de flt-1, y esto era independiente del grado nuclear del tumor. Finalmente, mientras que el bFGF-R1 fue encontrado tanto en células normales como en células de DCIS, en este caso la expresión de bFGF fue positiva solo en las células normales (Wulfig et al., 2005). Esto coincide con los descubrimientos de Teo et al (2002), quienes describen diferente densidad y fenotipo vasculares en DCISs puros versus DCISs asociados con un carcinoma invasivo, con los últimos mostrando grandes números de vasos CD34+ y CD141+ y menor tinción para el FVIII (Teo et al., 2002). Finalmente, la expresión de flt-1 también se encontró en carcinomas invasivos de mama (Kranz et al., 1999) así como en sarcomas uterinos (Arita et al., 2005) encontraron expresión de fosfo-flt-1 solo en células tumorales) y en células de carcinoma pancreático (Wey et al., 2005). En el caso de las células de carcinoma pancreático, la estimulación con VEGF llevo a la señalización vía MAPK, la migración y la invasión, lo que podía ser inhibido con un anticuerpo neutralizante de flt-1 (Wey et al., 2005). Todos estos resultados apoyan la idea de que el VEGF, a través de su receptor flt-1, puede ejercer un efecto autócrino sobre las células tumorales, y que este efecto es independiente de su rol en la angiogénesis tumoral.

DORMICIÓN TUMORAL

A pesar de que en los últimos años se han hecho algunos avances, la mayoría de las muertes por cáncer se deben a metástasis que son resistentes a las terapias convencionales (Fidler, 1990) y que son detectadas años luego del tratamiento del tumor

primario, sugiriendo que estas células tumorales se encontraban en un estado de dormición. La dormición tumoral no se asocia únicamente a las lesiones metastáticas, sino que también se encuentra en tejidos primarios (Tlsty, 2001; Udagawa et al., 2002), y este hecho ha sido documentado por el descubrimiento generalmente azaroso de cánceres primarios ocultos durante autopsias de individuos que no murieron de cáncer. En el caso del cáncer de mama, éste ha sido detectado en el 30% de las mujeres sometidas a autopsia. La dormición tumoral y la enfermedad metastásica son procesos altamente selectivos regulados por un gran número de mecanismos diversos, y la dormición tumoral podría constituir un aumento del riesgo de la emergencia de la enfermedad maligna. Por lo tanto, el entendimiento de cuales son los factores que inducen y mantienen la dormición tumoral es un paso crítico para la identificación de pacientes de alto riesgo y para el desarrollo de tratamientos que logren prevenir la recurrencia del tumor.

Básicamente, la dormición tumoral es una condición en la cual las células tumorales persisten en el huésped por un largo período de tiempo, pero no proliferan. Una de las ideas fundamentales acerca de cómo se logra la dormición tumoral plantea que existe un equilibrio entre crecimiento y muerte debido a un aumento de la apoptosis gracias a la vigilancia inmunológica (Dosne Pasqualini, 1996). Se sabe que la primera barrera contra el crecimiento tumoral es el sistema inmune, el cual se encuentra en un estado de alerta constante, controlando el estatus antigénico del huésped. Desafortunadamente, debido a que las células tumorales derivan de células normales del huésped, logran escapar de esta vigilancia inmunológica y crecer. Pero en las primeras

etapas del desarrollo tumoral, se considera que las células tumorales y las células inmunes se encuentran en un estado de equilibrio: la dormición tumoral. Se han desarrollado modelos matemáticos tratando de explicar cómo el sistema inmune del huésped podría controlar el crecimiento o la dormición tumoral. Page y Uhr (2005) demostraron cómo en casos en los que se mantiene la dormición tumoral, el tamaño del tumor se encuentra determinado por la fuerza de la respuesta inmune y el estatus proliferativo de las células tumorales (Page & Uhr, 2005). El trabajo de Schirmacher (2001) también acentúa la importancia de la inmunidad mediada por las células del huésped en el control del número de células que se encuentran proliferando activamente en el tumor durmiente (Schirmacher, 2001).

De manera alternativa, la dormición tumoral puede ser el resultado de la falta de crecimiento de las células tumorales per se, o de un balance entre crecimiento y muerte, el cual en varios casos ha sido asociado estrechamente a la expresión de uPAR y su interacción con distintas moléculas de señalización (Aguirre Ghiso et al., 1999), (Yu et al., 1997). La dormición tumoral ha sido asociada a un déficit de uPAR, y los niveles de uPAR aumentan en el cáncer (Hildenbrand et al., 1999). Más aún, se ha demostrado que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ -uPAR a través del EGFR es necesaria para el crecimiento tumoral in vivo, y que la interferencia con la función de cualquiera de estos receptores puede inducir dormición tumoral (Liu et al., 2002) en células de hepatocarcinoma. Por lo tanto, la modulación de estas interacciones podría ejercer un efecto sobre el control de la dormición tumoral.

Una hipótesis diferente propone al switch angiogénico como el regulador crítico de la dormición tumoral. Trabajos tempranos llevados a cabo por Judah Folkman y colaboradores (Gimbrone et al., 1972) mostraron que inhibiendo la angiogénesis se podía inducir la dormición tumoral. Existe suficiente evidencia consistente con la noción de que uno de los primeros pasos en la progresión tumoral sería el switch angiogénico, y demostrando que éste puede ocurrir tempranamente en el estadio precanceroso (Kitadai et al., 2004). Más aún, Udagawa y colaboradores (2002) encontraron que algunas líneas celulares tumorales, al ser inyectadas en ratones, generaban focos durmientes microscópicos que mantenían su masa constante gracias a un balance entre proliferación y apoptosis, y que estos tumores durmientes eran avasculares. Estos autores encontraron que el crecimiento in vivo de estos tumores podía ser inducido gracias a la expresión ectópica de Ras, el cual inducía la expresión de VEGF por las células tumorales y éste a su vez inducía una respuesta angiogénica que permitía el crecimiento tumoral (Udagawa et al., 2002). Diferentes moléculas angiogénicas son reguladas positivamente durante la progresión tumoral, y esto ha sido asociado a veces al ambiente hipóxico creado por las células tumorales que se encuentran proliferando rápidamente (Xu et al., 2004); y las vías de señalización MEK/ERK y PI3K/AKT han sido asociadas con la producción de VEGF y/o IL-8 por diferentes líneas celulares tumorales (Bancroft et al., 2002; Chelouche-Lev et al., 2004; Sparmann & Bar-Sagi, 2004).

Finalmente, una última hipótesis se basa en la noción de que el cáncer es una enfermedad de arquitectura tisular alterada. El switch angiogénico en tejidos primarios esta implicado en la transformación maligna y se encuentra asociado con la pérdida de la organización tisular; de hecho, los DCISs de alto grado ya presentan una importante inducción de angiogénesis. Por lo tanto, la dormición tumoral podría ser alcanzada si se colocara a las células tumorales en el contexto correcto. De hecho, un caso extremo ejemplificado por Mintz y colaboradores (1975) demostró que se podían generar ratones “normales” a partir de células malignas de teratocarcinoma, lo que asociaría el compromiso a la malignidad con una alteración organizacional durante el desarrollo (Mintz & Illmensee, 1975). Alt-Holland et al (2005) basaron su trabajo en la “Tissue organization field theory of carcinogenesis” (Teoría de la organización tisular como reguladora de la carcinogénesis) (Sonnenschein & Soto, 2000) y (Kenny & Bissell, 2003) y mostraron cómo es posible reprogramar células con potencial neoplásico para que normalicen su fenotipo cuando éstas se encuentran presentes en un microambiente tisular normal, a través de claves estructurales y de orientación que les sirven para dirigir su proliferación, diferenciación y apoptosis (Alt-Holland et al., 2005). Otros autores demostraron que la inactivación de ciertos oncogenes como MYC puede inducir la dormición tumoral in vivo gracias al desenmascaramiento de la capacidad pluripotencial de los tumores de diferenciarse para dar linajes celulares y estructuras tisulares normales (Shachaf et al., 2004). Más aún, las interacciones célula- ECM son críticas para la organización tisular. Así, factores o condiciones que promuevan la diferenciación tisular, como por ejemplo moléculas de adhesión celulares, como integrinas y cadherinas que

median la organización tisular y la diferenciación, inhibirán la expresión del fenotipo maligno. En trabajos anteriores demostramos que existe un cross-talk entre integrinas y receptores de factores de crecimiento, y que la inhibición de cualquiera de estas moléculas induce la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular (Wang et al., 1998). De manera similar, Vaccariello y colegas (1999) mostraron que el fenotipo maligno de los keratinocitos transformados por Ras podía ser normalizado a través de la promoción de interacciones célula- célula (Vaccariello et al., 1999).

La arquitectura tisular regula el crecimiento y la supervivencia celulares utilizando vías de señalización MEK/ERK y PI3K/AKT, sugiriendo que ambos podrían estar conectados. Dado que el switch angiogénico afecta la dormición tumoral vía efectos sobre VEGF, ERK y PI3K, en este trabajo estudiamos la hipótesis de que la arquitectura tisular podría inducir la dormición tumoral a través de la regulación de ERK y PI3K por las interacciones integrina- receptor de factor de crecimiento y de sus efectos en el crecimiento, supervivencia y angiogénesis, vía inducción de la expresión de IL-8 y VEGF.

MODELO EXPERIMENTAL

La transformación de un fenotipo premaligno en uno maligno es un paso crucial en la progresión del cáncer de mama humano. La determinación de las alteraciones moleculares necesarias para esta transición podría servir para detectar marcadores

clínicos útiles para la distinción entre lesiones benignas de aquellas con altas probabilidades de transformarse en malignas, así como para distinguir blancos moleculares funcionales para el tratamiento de estadios tempranos de cánceres de mama. En la actualidad no existen modelos ex vivo para estudiar los mecanismos moleculares de la transformación maligna como ocurre ‘espontáneamente’ in vivo. La comprensión de los procesos celulares y moleculares que llevan a la transformación de una célula normal requiere del análisis de poblaciones celulares puras de MECs representando estadios específicos de la progresión neoplásica.

Debido a que en los últimos años ha habido un crecimiento exponencial de los nuevos casos de DCISs, la comprensión del proceso evolutivo que atraviesa una lesión premaligna como el DCIS para dar lugar a un tumor invasivo y finalmente a focos metastáticos es fundamental para poder establecer un control sobre la progresión de la enfermedad.

Una observación importante es que el estroma que rodea a las lesiones premalignas como el DCIS (Unger & Weaver, 2003), el cual se supone es normal, no lo es. Ya en estos momentos este estroma muestra características de una herida, con transdiferenciación de fibroblastos, infiltración de células inmunes y de ECs, y con alteraciones importantes en la ECM, las cuales incluyen la expresión elevada de FN y TN, características de un estroma reactivo. Todo esto lleva a importantes cambios estructurales que modifican las propiedades mecánicas y bioquímicas del tejido (Ioachim

et al., 2002). Varios investigadores han demostrado que un estroma reactivo puede inducir el comportamiento maligno de MECs normales (Barcellos-Hoff & Ravani, 2000), (Sternlicht et al., 1999).

Otro fenómeno de la transformación maligna que ha sido bien documentado es que los cánceres expresan consistentemente diferentes tipos y niveles de integrinas. Durante la transformación maligna de la mama existe un aumento en los niveles estromales de FN y TN, y los tumores de mama muestran un aumento de la expresión de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta(x)$ (Akiyama et al., 1995; Gould et al., 1990; Koukoulis et al., 1993; Meyer et al., 1998; Oda et al., 1992; Pena et al., 1994).

Previamente Petersen et al (1992) desarrollaron un ensayo tridimensional en una matriz extracelular reconstituida rica en laminina (3D rBM) para modelar tanto la mama humana como los tumores mamarios (Petersen et al., 1992) y establecieron un modelo de progresión tumoral humano llamado HMT-3522 para estudiar la transformación de la mama in vitro en el contexto de una estructura tisular. La serie de MECs humanas HMT-3522 (S1, -S2, y -T4-2) fue originada a partir del cultivo primario de las MECs de un espécimen proveniente de una mamoplastía, crecido en un medio de cultivo definido; las células S1 se immortalizaron de manera espontánea, dependen de EGF para su crecimiento, y no son tumorigénicas (Briand, 1987; Briand, 1996) (Figura 11)

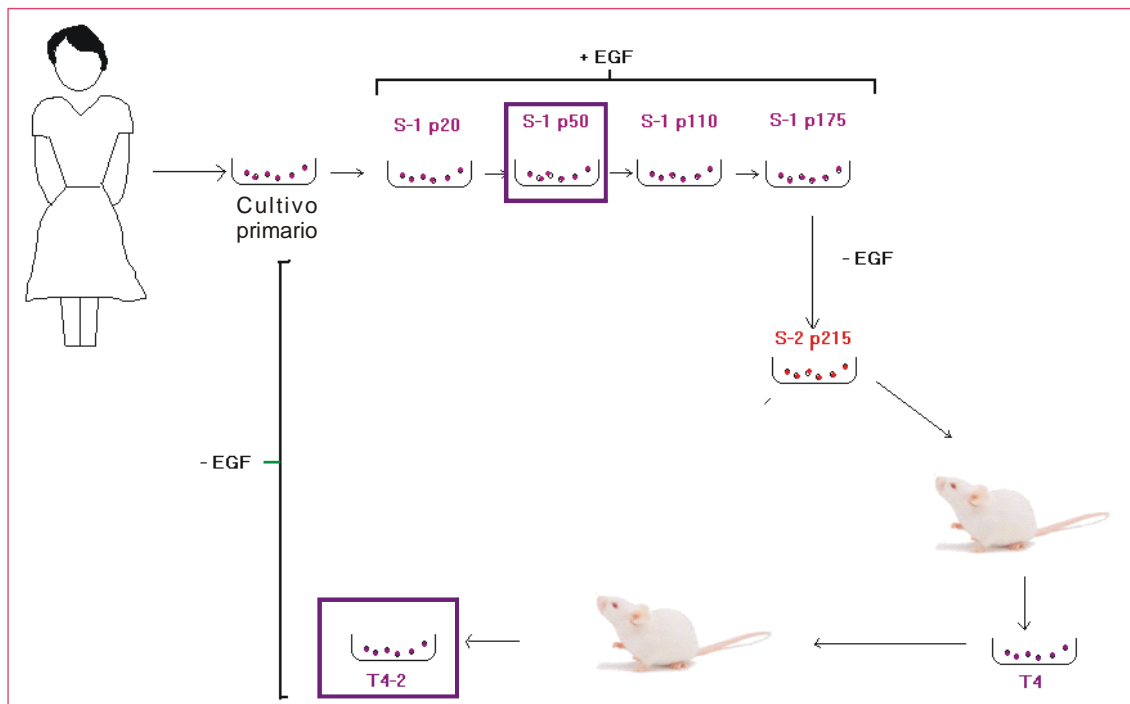


Figura 11. Esquema representando el desarrollo de la serie de progresión de cáncer de mama HMT-3522

Las células no malignas S1 fueron derivadas de un mamoplastía y cultivadas in vitro en medio definido en presencia de EGF (20 ng/ ml). Luego de varios años de cultivo y utilizando un medio sin EGF, estas células dieron origen a las células pre-malignas S2. Finalmente, luego de subsiguientes años de cultivo, las células S2 dieron lugar a un tumor al ser transplantadas a un ratón nude, y las células aisladas a partir de este tumor fueron re-inyectadas en un ratón nude para dar lugar a la línea celular tumoral T4-2.

Al ser cultivadas en 3D rBM, las células S1 generan acinos que están arrestados en su crecimiento y que expresan marcadores de diferenciación de forma polarizada, duplicando los patrones de expresión observados en las TDLUs in vivo (Petersen et al., 1992; Weaver et al., 1997). Las células S2 fueron derivadas de las S1 por cultivos

sucesivos y selección de células independientes de EGF para su crecimiento, y son esencialmente no tumorigénicas (Briand, 1996), aunque forman colonias desorganizadas en 3D rBM. Las células T4-2 son malignas, y fueron derivadas de las células S2 por cultivo continuo de células de un único y ocasional tumor producido por células S2 que dieron lugar a un tumor en un ratón nude, cultivadas in vitro y pasadas nuevamente por un ratón (Briand, 1996). En 3D rBM, las células S2 forman colonias desorganizadas de tamaños heterogéneos, mientras que las células T4-2 forman colonias grandes y desorganizadas que son mas homogéneas en tamaño y que han perdido la expresión polarizada de todos los marcadores de diferenciación examinados (Weaver et al., 1997). Las células T4-2 son tumorigénicas e invasivas también en xenoinjertos en la almohadilla de grasa mamaria vaciada de MECs (cleared mammary fat pad) de ratones nude, pero no metastatizan al pulmón, y sólo forman unos pocos tumores en cerebro al ser inyectadas de forma intra venosa (en cola) o intra cardiaca (resultados no publicados, colaboración con H. Kleinman, NIH).

Por lo tanto, el uso de la serie celular HMT3522 como un modelo de progresión de cáncer de mama y el co-cultivo de MECs con ECs en combinación con ensayos en 3D rBM y trasplantes de MECs in vivo en ratones nude, fueron otras de las maneras de estudiar las hipótesis propuestas en esta tesis utilizando un enfoque mas fisiológico que el plástico de cultivo celular.

Es de esperar que el trabajo presentado en esta tesis sea de utilidad en el estudio e identificación de los cambios moleculares que son causales de la transformación maligna, aportando herramientas nuevas y efectivas para la disección molecular del mecanismo utilizado por las células premalignas para convertirse en un cáncer de mama, así como para entender cómo se logra la dormición tumoral.

MATERIALES Y METODOS

Sustratos y anticuerpos

Los materiales usados para la realización de esta Tesis fueron los siguientes: matriz extracelular comercial EHC (MatrigelTM, Collaborative Research, Bedford, MA) para los ensayos con rBM; Vitrogen (Vitrogen 100, 3 mg/ml bovine skin collagen I, Celtrix Laboratories, Palo Alto, CA), para recubrir el fondo de las placas de cultivo; y Cellagen Solution AC-5, 0.5% (ICN Biomedical, Inc., Costa Mesa, CA o Collaborative Biomedical, Bedford, MA) para los co-cultivos en geles de colágeno 3D. Tissue-Tek OCT (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana), 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) y yoduro de propidio (PI) (Sigma, St. Louis, MO) y 5-bromo-2'-deoxy-uridina (BrdU) (Zymed-Lab, South San Francisco, CA), kit de ELISA para uPA (American Diagnostica, Stamford, CT) y kits para los ELISAs para VEGF, IL-8 y bFGF (R&D systems, Minneapolis, MN). Kit ECL (Amersham Pharmacia BioTech, Piscataway, NJ). Medio de cultivo DMEM-F12 para las MECs (Hyclone, Logan, UT) y medio de cultivo EGM-2 bullet kit para las ECs (Bio-Whitaker, Walkersville, MD). Insertos de cultivo celular (6.4 mm diámetro, 0.8 μ m diámetro de poros; Biocoat, BD Labware, Bedford, MA).

Los anticuerpos (Abs) utilizados fueron: Ab monoclonal (mAb) anti-BrdU (Zymed-Lab, South San Francisco, CA), Ab anti-colágeno IV, clon CIV 22; y PCNA, clon PC10 (de DAKO, Carpinteria, CA); Ab anti-laminina-5 específico para la cadena α 3, clon BM195 (regalo de M.P. Marinkovich, Stanford; (Rousselle et al., 1991); Ab anti integrina β 1, clones AIIB2 (bloqueante de función, regalo de C. Damsky, UCSF), y

TS2/16; Ab anti-integrina β 4, suero de conejo y clones 3E1, ASC-3 y ASC-8; Ab anti- α 1 integrina, clon FB12; Ab anti- α 2 integrina, clon 10G11; Ab anti- α 3 integrina, clon P15B; Ab anti- α 4 integrina, clon P1H4; Ab anti- α 5 integrina, clones SAM-1 y P1D6; Ab anti- α 6 integrina, clon GoH3; Ab anti- α v integrina, clon M9; Ab anti-fibronectina, clon 3E3; y Ab anti- E-cadherina, clon 36 (todos de Chemicon International, Temecula, CA); Ab anti-tenascina (300-3) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA); Ab anti-Ki-67, clon 35; y Ab anti- β -catenina, clon 14 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ) y antisuero de conejo (Sigma, St. Louis, MO); Ab anti- α -actina de músculo liso (SMA), clon 1A4 (Sigma, Street St. Louis, MO); Ab de conejo anti-citokeratina 18, clon RCK106; Ab anti-AKT y fosfo-ser472/473/474-AKT; Ab anti-ERK1, suero de conejo (de BD PharMingen, San Diego, CA), Ab anti-fosfoERK1/2 (Thr202/Tyr204), suero de conejo (New England BioLabs, Ipswich, MA); Ab anti-caspasa 3 activada, suero de conejo (Cell Signaling, Beverly, MA); Ab de conejo anti-Flt-1/VEGFR1 Ab-1 (RB-1527, NeoMarkers, Fremont, CA); Ab de conejo anti- uPAR No.339R y Ab de ratón anti- uPAR No.3936 (American Diagnostica, Greenwich, CT); Ab de conejo anti- macrófagos F4/80 (BM8, eBioscience, San Diego, CA); Ab anti-actina acoplado a isotiocianato de fluoresceina (FITC) o a Phalloidin, Abs secundarios conjugados a -Texas red, -AlexaFluor488 y -AlexaFluor555 (Molecular Probes, Carlsbad, CA), y no conjugados o conjugados a FITC y Texas red, e IgGs de ratón y rata no específicas (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine); y Abs secundarios anti- conejo, ratón y rata conjugados a HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Los inhibidores utilizados fueron: el inhibidor específico de tirosina kinasa de EGFR Tyrphostin AG 1478 (160 μ M en DMSO) (CalBiochem, San Diego, CA); el inhibidor de MEK1, PD98059 (50 μ M en DMSO); el inhibidor de PI3K, LY 294002 (50 μ M en etanol) (BIOMOL Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA); y el receptor de VEGF tipo 1 (Flt-1) humano recombinante (Oncogene, Cambridge, MA).

Cultivo celular en monocapa 2D

Las MECs HMT-3522 se crecieron en placas de cultivo recubiertas en vitrogen (0.06 μ g/ml en PBS) (Petersen et al., 1992; Weaver et al., 1997). En síntesis, las células se cultivaron en 5% CO₂, a 37°C en medio de cultivo DMEM F:12 suplementado con prolactina (0.15 IU/ml), insulina (250 ng/ml), hidrocortisona (1.4 μ M), selenato de sodio (2.6 ng/ml), β -estradiol (10^{-10} M) y apo-transferrina (10 μ g/ml), con o sin EGF (10ng/ml) *(EGF se agrega solo a los cultivos de células S1, las células S3 y T4-2 son independientes de EGF). Cuando los cultivos alcanzaban un 70-80 % de confluencia, las células se repicaban con tripsina (0.25%) y se replaqueaban en general a una dilución 1:20. En otros casos, las células se teñían con trypan blue y se contaba el número celular en un hemocitómetro bajo un microscopio de contraste de fase, para sembrar un número definido de células.

Las ECs humanas adultas de microvasculatura dérmica (Adult human dermal microvascular endothelial cells, HDMVECs) fueron un regalo del Dr. K. Gooch

(University of Pennsylvania), y las células iHUVeC 2A fueron un regalo de la Dra. Freedman. Estas células se crecieron en placas de cultivo recubiertas de colágeno tipo I (de cola de rata, Collaborative Biomedical, 50 µg/ml en 0.02 N Ácido acético) en medio de cultivo EGM-2 bullet kit (Bio-Whitaker) en 5% CO₂, a 37°C.

Cultivos celulares en 3D rBM

Para los cultivos en 3D rBM, las células crecidas en monocapa fueron tripsinizadas y contadas. El número deseado de células (ver mas abajo) se lavó por centrifugación (1000 rpm, 5 min.) y el pellet celular se mezcló con matrigel sobre hielo (con o sin la adición de Abs o proteínas de la ECM). La suspensión matrigel/células fue sembrada sobre una capa muy fina de rBM condicionada apropiadamente (polimerizados por 20 minutos, 37°C). Luego de la polimerización, se agregó el medio de cultivo apropiado, y éste se cambió cada dos días. El tamaño de las colonias alcanzado luego de 10-12 días en cultivo 3D fue medido en un microscopio de contraste de fase, utilizando una pieza ocular calibrada.

Cantidad de matrigel para cultivos celulares en 3D:

Tamaño del Well:	<u>1.5cm</u>	<u>35mm</u>	<u>60mm</u>
Capa inferior	75 µl	250 µl	500 µl
Capa superior	300 µl	1.5 ml	3 ml

Densidades de plaqueo en cultivos celulares en 3D:

Número de células T4-2/S3	0.15 x 10 ⁶	0.75 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶
---------------------------	------------------------	------------------------	-----------------------

Número de células S1	0.25 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁶
Cantidad de medio	500 µl	1.5 ml	3 ml

Reversión fenotípica en 3D rBM

La reversión fenotípica de las células T4-2 u otras células de la serie HMT-3522 utilizando mAb bloqueante de función anti-β1 integrina fue llevada a cabo como se describió previamente (Wang et al., 1998; Weaver et al., 1997). Brevemente, las células tumorales se embebieron en matrigel conteniendo mAb bloqueante de función anti-β1 integrina (AIIB2, 20 µg/ml) y se incubaron en condiciones regulares de cultivo 3D rBM. La reversión fenotípica utilizando el inhibidor de EGFR Tyrphostin se llevo a cabo agregando 200 nM de la droga al medio de cultivos 3D rBM, reemplazándolo por inhibidor nuevo cada vez que se cambiaba el medio de cultivo. El tamaño de las colonias alcanzado luego de 10-12 días en cultivo 3D fue medido en un microscopio de contraste de fase, utilizando una pieza ocular calibrada.

Ensayo de co-cultivo en 3D

Para estudiar la angiogénesis in vitro, se estableció un sistema de co-cultivo que permitiera el co-cultivo de esferoides de MECs con ECs invadiendo una BM. Esto se logró cultivando las MECs por 10-12 días en 3D rBM dentro de insertos de cultivo celular (6.4 mm diámetro, tamaño de poro 0.8 µm; Biocoat, BD Labware), los cuales

luego fueron transferidos a placas de 24 hoyos conteniendo HDMVECs (80% de confluencia) recubiertas por una capa acelular de colágeno tipo I (2.4 mg/ml, 1 mm de grosor de gel, Cellagen o Collaborative Biomedical). Los co-cultivos se suplementaron con el medio de cultivo de las ECs en el hoyo inferior y con el medio de cultivo de las MECs en el inserto, y la invasión de las HDMECs hacia arriba y dentro del gel de colágeno y su ensamblado de redes asemejando redes de capilares se analizaron visualmente luego de 2 días de co-cultivo. Las micrografías de geles de colágeno fijados y teñidos (2% paraformaldehído (PFA); 0.1% azul de toluidina) conteniendo ECs se obtuvieron utilizando un microscopio Zeiss, y se analizaron utilizando el software Scion Image, por medio de la “esqueletonización” de las imágenes, y de la obtención de la media y desviación estándar (SD) para cada muestra.

Clonado de poblaciones puras de células HMT-3522 premalignas

Las células S3-A, -B y -C fueron clonadas a partir de un cultivo de 20 días de células S2 en 3D rBM (mismas condiciones que las descritas previamente), por observación de los cultivos bajo microscopio de contraste de fase (en campana de cultivo estéril) y clonado de los esferoides de diferentes tamaños (pequeños, medianos y grandes) por medio de la disección con una aguja estéril. Cada uno de los esferoides fue disgregado y cultivado en monocapa en 2D, y luego cultivado en 3D rBM para confirmar que el fenotipo original era mantenido. En el caso de las células S3-C, noté que luego de algunos pasajes comenzaban a perder su homogeneidad, por lo que decidí re clonarlas (de

la misma forma que la explicada mas arriba). La mayoría de los experimentos del Capítulo 2 de esta Tesis fueron realizados con estas últimas células S3-C, pero los mismo resultados se obtuvieron cuando se usaron pasajes tempranos de las células S3-C clonadas originalmente.

Ensayo de proliferación celular

Para evaluar la tasa de proliferación de diferentes MECs en monocapa en 2D sembramos una baja densidad de células en 2D en 6 a 12 placas de cultivo, una por cada día del ensayo. Cada 24 hr, las células de una placa se tripsinizaron y se contaron, y los datos del número de células versus el número de días en cultivo se representaron en un gráfico para obtener la tasa de proliferación celular. Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

Para evaluar la tasa de proliferación de diferentes MECs en 3D rBM, establecimos cultivos paralelos en 3D rBM y cada uno de estos cultivos fue fijado y teñido a distintos tiempos ya fuera con un Ab anti-Ki-67 Ab o con un Ab anti-BrdU, en el caso de cultivos que habían sido preincubados con BrdU (10 μ M, 15-20 hr). El número de células o de colonias en proliferación (tinción positiva para BrdU o Ki-67) fue representado en gráficos para obtener la tasa de proliferación.

Inmunofluorescencia indirecta, adquisición y análisis de imágenes

En el caso de los cultivos 3D rBM, se preparó una capa delgada (~25 μ l) de matrigel en el fondo de cada cámara de una 'chamber slide'. Luego, los cultivos 3D rBM fueron colocados sobre hielo, pipeteados brevemente, y una alícuota de estos cultivos fue transferida a un eppendorf. ~50 μ l de esta mezcla se colocaron dentro de cada cámara y se dejaron polimerizar (37°C, 15 min).

En todos los experimentos, las células fueron fijadas ya sea en 2%PFA, 1:1 metanol: acetona o 100% metanol. En algunos experimentos, los cultivos se mezclaron con una solución de colágeno para ser embebidos en sucrosa y congelados utilizando Tissue-Tek OCT (Miles Laboratories), y luego se cortaron secciones de 5-20 μ m en un criostato. Las muestras se incubaron en soluciones de Abs primarios, se lavaron con buffer IF (3 veces, 15 min) y se incubaron luego con Ab secundario conjugado a FITC, Texas red, AlexaFluor488 o AlexaFluor555. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (10 μ g/ml) o PI (50 μ g/ml). Las células se visualizaron utilizando un microscopio laser confocal Bio-Rad MRC 1024 conectado a un microscopio Nikon Diaphot 200. Las imágenes de inmunofluorescencia fueron obtenidas utilizando una magnificación de 120X y las imágenes convencionales con una magnificación de 40-60X.

Citometría de flujo

Células en monocapa fueron tripsinizadas y resuspendidas en DMEM: F12 frío, centrifugadas y resuspendidas en 10 ml DPBS (frío). Las células se tiñieron con azul trypan y se contó el número celular en un hemocitómetro. La concentración celular se ajustó a 1×10^6 células/ml en 1% BSA/DPBS ($> 5 \times 10^5$ células/ml) para el bloqueo, y se incubaron en hielo en agitación por 30 min – 1 hr. Luego, la solución de células se separó en alícuotas de 1 ml a las cuales se agregó Ab primario directamente al buffer de bloqueo (en general se utilizó una dilución de Ab 1:100 en 1% BSA/DBPS), para incubar sobre hielo por 1 hr, agitando cada 10 min. Luego de lavar 3 veces por centrifugación (1000 rpm, 5 min, a 4°C) con DPBS helado, las células se resuspendieron en 200 μ l de una solución de Ab secundario conjugado a FITC o a ficoeritrina (PE) y se incubaron sobre hielo por 1 hr, agitando cada 10 min (en general se utilizó una dilución de Ab 1:100 en 1% BSA/DBPS). Finalmente se realizaron otros 3 lavados en DPBS y se resuspendieron las células en 1 ml 1% BSA/DPBS para ser analizadas en un FACScan (Becton Dickinson). Todas las manipulaciones fueron llevadas a cabo a 4°C.

Ensayo de migración

Para comparar la capacidad migratoria de distintas MECs se utilizó el ensayo de cicatrización de herida. Básicamente, las MECs se cultivaron en 2D en placas de 60 mm o 35 mm de diámetro y se dejó que llegaran a confluencia, momento en el cual se realizó

una herida longitudinal utilizando un tip de plástico. Luego de 8 hr de incubación, las placas se fijaron en 100% metanol y se tiñieron con 0.5% azul de toluidina. Utilizando un microscopio invertido (Olympus), se obtuvieron fotomicrografías en las cuales se midió el tamaño inicial (t_0) y final de la herida utilizando el software Adobe Photoshop y a partir de estas mediciones se calcularon la media y el SD para cada muestra.

Ensayo de invasión

La capacidad de las células de invadir la rBM se estudió en cámaras Boyden (Lochter et al., 1997). Las células se sembraron en transwells recubiertos de matrigel (2-3 mg/ml, BD Biosciences) a densidades celulares de entre 100,000 - 200,000 células/ 200 μ l de medio por inserto, con 500 μ l de medio en el hoyo inferior. Se incubaron las células a 37⁰C por 16-20 hr para permitir su invasión hacia el medio de cultivo regular de las MEC con o sin el agregado de 100 ng/ml EGF. Luego de este período, las células se fijaron en 5% DL - Gliceraldehído a temperatura ambiente (RT) por 10 min y se tiñieron con 0.5% azul de toluidina. Las células que no habían logrado invadir la BM y que quedaron en la superficie superior de la cámara de Boyden fueron eliminadas utilizando un hisopo de algodón. Las células que lograron invadir la BM, y por lo tanto se encontraban del lado inferior de la membrana, se contaron bajo un microscopio de contraste de fase (Olympus). Se contaron al menos 3 campos por membrana (0-50 células /campo).

En otros experimentos, la invasión de las MECs se analizó luego de 48 hrs de incubación ya fuera en medio de cultivo regular, en medio conteniendo medio condicionado (CM) de células T4-2, en medio con diferentes concentraciones del inhibidor de MMPs GM6001 (AMS Scientific) o su análogo inactivo (C1004), con Ab bloqueantes de función de la integrina $\beta 1$ AIIB2 (20 $\mu\text{g/ml}$), o con Abs estimulatorios de la integrina $\beta 1$ TS2/16 o MA2910 (20 $\mu\text{g/ml}$).

Zimografía en gelatina

Para analizar la expresión de MMPs por diferentes MECs, se utilizó el CM (48 hr) de cultivos de 10 días en 3D rBM. Las muestras se analizaron por zimografía de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Herron et al (Herron et al., 1986), para determinar los pesos moleculares y la abundancia relativa de la actividad gelatinasa presente en la muestra.

Ensayo de independencia de anclaje

El crecimiento independiente de anclaje fue estudiado utilizando el ensayo de agar blando (Wang et al., 1998). Brevemente, se resuspendieron 20,000 células en 1 ml de DMEM/F-12 conteniendo 0.35% de agarosa, con la adición de Abs bloqueantes de función o de rflt-1 según especificado en los diferentes experimentos, y se sembraron sobre 1 ml de 0.5% agarosa, y luego de 21 días en cultivo, se midió el tamaño de las

colonias en un microscopio de contraste de fase utilizando una pieza ocular calibrada. Las colonias de 40 μm de diámetro se consideraron positivas.

Construcciones de cDNA

La construcción de $\alpha 5$ integrina fusionada a eGFP (regalo del Dr. Horowitz; University of Virginia; (Laukaitis et al., 2001) se obtuvo como un fragmento XhoI-NotI a partir del vector pEGFP-N3 (Clontech) & se subclonó en el vector retroviral Hermes pHRSpuro GUS (regalo del Dr. Blau; (Rossi & Blau, 1998), reemplazando el cDNA de GUS entre los sitios Sall y NotI utilizando técnicas estándar, para permitir la expresión génica bajo el control de un promotor regulado por tetraciclina (tet) (Weaver et al., 2002).

La fusión de $\alpha 2$ integrina a eGFP se obtuvo cortando el gen de la integrina $\alpha 2$ del vector pBC (clon 2.72 de ATCC) con las enzimas de restricción Bgl II-NotI y ligándolo al fragmento 3' modificado por PCR de la integrina $\alpha 2$ (agregando un sitio de corte para la enzima Hind III) y al fragmento HindIII-NotI eGFP del plásmido pEGFP-N3, subclonándolos dentro del vector retroviral Hermes pHRSpuro GUS (en los sitios de restricción EcoRI-NotI).

Expresión génica ectópica

Los retrovirus anfotrópicos se obtuvieron a partir de las células 293 modificadas o de las células Phoenix ampho (G. Nolan) co-transfectadas con las construcciones Hermes HRS puro $\alpha 5$ o $\alpha 2$ integrina eGFP, pVSVG y pCgp (regalo de A. Kingsman, Oxford University, UK) utilizando la técnica del fosfato de calcio. Como control se utilizó la construcción eGFP. Las MECs fueron infectadas con el sobrenadante retroviral (1.5 ml) por medio de centrifugación (500 rpm por 1 hr). Las células que poseían el inserto retroviral fueron seleccionadas positivamente utilizando puromicina (0.5 $\mu\text{g/ml}$). Para la infección de las células resistentes a puromicina, utilizamos un alto título del retrovirus inductor basado en MFG que expresa el represor de tet fusionado al dominio de activación de HPV16, el cual es un derivado de la construcción del transactivador tet off del Dr. H. Blau (Rossi et al., 1998). Este virus inductor fue preparado por transfección de las células 293GPG (regalo de R. Mulligan, Whitehead Institute, MIT, Cambridge, MA), como fue previamente descrito por Ory y colaboradores (Ory et al., 1996). Las células transducidas se cultivaron en medio de cultivo con tet (1 $\mu\text{g/ml}$) para mantener el silenciamiento del transgen.

La expresión del transgen se indujo por remoción de la tet del medio 48 hr antes de realizar los experimentos. El aumento de la expresión de las distintas integrinas fue verificado por visualización de la fluorescencia verde de GFP bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus); los niveles totales de integrinas se confirmaron por

inmunoblots y su expresión en la superficie celular fue verificada por FACS. Las células positivas para eGFP fueron separadas por FACS, y los niveles de expresión de las distintas integrinas fueron re-analizados para asegurar la utilización de poblaciones celulares mayormente positivas para la expresión del gen de interés.

Estudios in vivo

Para los experimentos in vivo discutidos en el Primer Capítulo de esta Tesis, se inyectaron 10×10^6 MECs subcutáneamente (s.c.) en ambos flancos de ratones atímicos hembra Balb/c nude de 10 semanas de edad (Simonsen Laboratories). Los tumores se midieron semanalmente por 8 semanas utilizando un calibre y el tamaño tumoral se controló al momento del sacrificio de los animales. Las muestras fueron incluidas en parafina, cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) para su análisis histológico (estos experimentos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Mina Bissell, en Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA). Se realizaron dos experimentos independientes.

Para los experimentos de angiogénesis in vivo discutidos en el Capítulo 1 y para los experimentos in vivo presentados en el Capítulo 3 de esta Tesis, se utilizaron ratones atímicos hembra Balb/c nude de 4-6 semanas de edad (Jackson Laboratories), los que se dejaron aclimatar por una semana en nuestro bioterio (CRB, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). 5×10^6 cells/ 100 μ l de medio junto con matrigel (volumen 1:1), en

presencia o ausencia de mAb bloqueante de función de la integrina $\alpha 5$ o de IgG control, se inyectaron s.c. en ambos flancos de los ratones. El tamaño de los tumores se midió dos veces por semana por un período de 12 semanas. Los animales fueron sacrificados y los tumores fueron fotografiados con una cámara digital (Canon Powershot SD200), extraídos, pesados y procesados como se indica a continuación.

Procesamiento de los tumores

El tejido fresco fue extraído y colocado dentro de cassettes de plástico para su procesamiento, indicando nombre de la muestra y fecha para su posterior referencia, y los cassettes se transfirieron a 4% PFA (ON, 4 °C). Los tejidos fijados se transfirieron secuencialmente a 70% EtOH (ON, 4 °C, 2X). Luego los cassettes se transfirieron a 95% EtOH (1 hr, RT, 2X), luego a 100% EtOH (1 hr, RT, 2X), luego a 50:50 EtOH/ Xileno (30 min, RT) y finalmente a Xileno (1 hr, RT, 2X). Luego los cassettes se transfirieron a un baño de Parafina I (2 hr, 56 °C) y finalmente a Parafina II (ON, 56°C). Las muestras se tranfirieron a moldes con parafina (56 °C) y se dejaron secar a RT. Los bloques de parafina se sacaron de los moldes (sobre un bloque de hielo), se cortaron en secciones de 7 μ m utilizando un microtomo, y las secciones se montaron en vidrios portaobjetos en un baño de agua a 50°C, dejándose secar a RT. En algunos casos, los bloques de parafina se ablandaron por inmersión en detergente 15-30 min antes de ser cortados (Tide, Procter & Gamble, Cincinnati, OH), para facilitar su corte.

Inmunohistoquímica

Las secciones de parafina de las muestras tumorales fueron rehidratadas en xileno-etanol-agua, y teñidas en H&E para su evaluación histopatológica, o sujetas al tratamiento de recuperación de antígenos (10 mM buffer citrato pH: 6.0 o 1mM EDTA pH~8.0, en microondas por 10 min), bloqueados con 0.1%Tween 20-PBS conteniendo 1% BSA y 5% de suero de cabra y teñidos con Abs primarios ON a 4°C o por 2 hr a RT. Luego de esto, los vidrios fueron lavados en PBS e incubados por 1 hr con Ab secundario conjugado a AlexaFluor555, finalmente tiñiendo los núcleos con DAPI. Las muestras se montaron en Vectashield (Becton Dickinson) y se cubrieron con un cubreobjetos, y luego se analizaron utilizando un microscopio de laser confocal Bio-Rad MRC 1024 acoplado a un microscopio Nikon Diaphot 200 o con un microscopio de fluorescencia (Zeiss). Las imagenes de inmunofluorescencia fueron obtenidas con una magnificación de 120X, 40X o 10X.

ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assays)

La secreción al medio de VEGF, IL-8, bFGF y uPA por las MECs fue medida en el CM de 48 hr de cultivos 3D rBM (10-12 días) utilizando la técnica de ELISA en sandwich (American Diagnostica para uPA; R&D systems para VEGF, IL-8 y bFGF), de acuerdo a las instrucciones del vendedor. Brevemente, CM de 48 hr (con el agregado de

1% FBS), fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80 °C. Para los ensayos, las muestras se dejaron descongelar hasta alcanzar RT y se incubaron en las placas recubiertas del anticuerpo primario, y luego se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado y se agregó el sustrato cromogénico para medir la densidad óptica (O.D.) utilizando un espectrofluorómetro Fluoroskan Ascent FL (Labsystems). Estos valores, al ser comparados con una curva estándar del sustrato, permitieron obtener las concentraciones de las distintas proteínas en los CMs de las diferentes MECs.

Extracción de RNA a partir de células en cultivo

El RNA de cultivos de MECs se obtuvo utilizando el método del isotiocianato. Brevemente, se agregó una solución de 4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio-acido cítrico pH 7, 0.5% (w/v) N-lauroilsarcosina, sal de sodio más 100 mM β -mercaptoetanol (5 min, RT, en agitación; 3 ml de este buffer se agregaron a cultivos 2D en T80, o 3 ml por cada ml de matrigel para cultivos 3D rBM). Luego de la lisis celular, el RNA fue solubilizado por pipeteo y las muestras fueron congeladas a -80°C ON o mantenidas en estas condiciones hasta su uso. Luego se agregó 1/10 de volumen de 2 M Acido acético -Acetato de sodio pH 4. tratado con DEPC y se mezcló por vortex para obtener una solución homogénea. Luego se agregó 1 volumen de ddH₂O o fenol bufferado/saturado con 0.1 M citrato pH 4.3 (Sigma) y se mezcló por vortex, luego se agregaron 2/10 volúmenes de 49:1 (vol/vol) cloroformo: isoamil alcohol y se mezcló por vortex hasta obtener una emulsión completa. La solución de RNA se incubó en hielo por

15 min. Luego de centrifugar por 30 min /4°C /3000-4000xg para clarificar la fase acuosa, esta se transfirió a un nuevo tubo, y las fases se separaron por agregado de 1 volumen de isopropanol. El RNA total fue precipitado de la suspensión por incubación a –20°C (2 hr- ON) seguido de centrifugación (30 min/4°C/14000 rpm para Eppendorfs de 1.5 ml; o 16000 rpm, con un rotor Sorvall SS34 para tubos Corex). El pellet de RNA fue resuspendido en 0.5 ml de 1:1 (vol/vol) isotiocianato de guanidina /mecaptoetanol: isopropanol, transferido a un Eppendorf de 1.5 ml, incubado por 2 hr a –20°C y luego el RNA total fue aislado por centrifugación (15 min/4°C/14000 rpm). El pellet de RNA se lavó repetidamente (15 min/4°C/14000 rpm) con 75% (vol/vol) etanol en DEPC ddH₂O (-20°C) (500 µl). Luego del último lavado, el RNA total fue precipitado por centrifugación (5 min/4°C/14000 rpm) y el pellet fue secado al aire (RT, generalmente 10-15 min). El pellet final de RNA fue redissuelto en agua tratada con DEPC (25-100 µl) sobre hielo, por 30 min- 1 hr para solubilizar el RNA. El contenido de RNA se midió en alícuotas de 0.5 µl en 89.5 µl 10 mM Tris- HCl/1 mM EDTA (TE) pH=8 a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro, utilizando una microcuveta. La concentración total de RNA se calculó como:

$$\text{Conc RNA en } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{Absorbancia a } 260 \text{ nm}) \times (40 \mu\text{g}/\text{ml RNA Total} / 1 \text{ OD a } 260\text{nm}) \times (0.09 \text{ ml}/0.5 \mu\text{l})$$

Preparación de cDNA

Para sintetizar cDNA a partir de RNA total se utilizó la técnica de transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), siguiendo un protocolo estándar utilizando el primer T7-oligodT24 y la DNA Polimerasa T4 (descrito por Dr. Bart Frank, Arthritis & Immunology Program, Oklahoma Medical Research Foundation, <http://omrf.ouhsc.edu/~frank/CDNA.html>).

RT-PCR semi-cuantitativa

La expresión del mRNA de VEGF se analizó utilizando la técnica estándar de RT-PCR (descrita en Molecular Profiling Initiative, NCI, <http://cgap-mf.nih.gov/Protocols/PDFFormat/GeneSpecificRTPCR.pdf>) utilizando 1 µg de RNA total aislado a partir de cultivos 3D rBM de 10-12 días de MECs. Las secuencias de los primers utilizadas fueron (de 5' a 3'): VEGF forward: CGAAACCATGAACTTTCTGC y VEGF reverso: CCTCAGTGGGCACACACTCC; y 18s rRNA forward: CGGCTACCACATCCAAGGAA y 18s rRNA reverso: GCTGGAATTACCGCGGCT para la estandarización. Los productos obtenidos por RT-PCR fueron corridos en un gel de agarosa 1.5% y las bandas se tiñieron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz U.V. Las fotografías se analizaron por densitometria, y los valores obtenidos para la concentración de mRNA de VEGF fueron normalizados con respecto al mRNA 18s.

Estudios de bloqueo de función en cultivos 3D rBM

Para inhibir la función de las integrinas o la actividad del uPAR, las MECs fueron embebidas en matrigel conteniendo mAb bloqueantes anti- integrina $\alpha 2$ (clon 10G11), integrina $\alpha 4$ (clon P1H4), integrina $\alpha 5$ (clon P1D6), integrina αv (clon M9), integrina $\beta 1$ (clon AIIB2) o anti- uPAR (clon 3936), o IgG control (20 $\mu\text{g/ml}$). El tamaño de las colonias alcanzado luego de 10-12 días en cultivo 3D fue medido en un microscopio de contraste de fase, utilizando una pieza ocular calibrada.

Para inhibir la actividad del VEGFR, las MECs fueron embebidas en matrigel conteniendo VEGFR-1 recombinante humano (rflt-1), a concentraciones entre 200 y 1000 ng/ml. El tamaño de las colonias alcanzado luego de 10-12 días en cultivo 3D rBM fue medido en un microscopio de contraste de fase, utilizando una pieza ocular calibrada.

Extracción de proteínas

Cultivos 2D o 3D fueron lisados en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM cloruro de sodio, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato, 0.2% SDS conteniendo 20 mM de fluoruro de sodio, y 1 mM ortovanadato de sodio, y un cocktail de inhibidores de proteasas), y la concentración proteica se midió utilizando el ensayo BCA, con el kit BCA (Sigma), siguiendo las instrucciones del vendedor.

Inmunoblots

Para la SDS-PAGE, generalmente se utilizaron geles de 4% (stacking) y 8-12% (separating), dependiendo de las proteínas de interés. Las muestras se calentaron con buffer de muestra (con o sin β -mercapto etanol) por 10 min a 95°C, se sembraron en el gel, y se corrieron a un voltaje constante de 120V. La corrida fue parada dependiendo de la resolución deseada y de la proteína de interés. Luego el gel se transfirió a una membrana de polyvinylidifluoride (PVDF) o nitrocelulosa en el buffer de transferencia apropiado ON a amperaje constante de 0.1 amps, o por 2 hrs a amperaje constante de 0.4 amps. Luego de la transferencia, las membranas fueron teñidas con Ponceau S para marcar apropiadamente los distintos estándares y para comprobar una correcta transferencia. Luego se bloquearon las membranas en una solución de 1% caseína desnaturalizada o en buffer bloqueante Super Blotto - 1% BSA & 5% Blotto (leche en polvo descremada) en 0.05% Tween en 1X PBS-) (0.5- 2 hr, RT, o ON a 4 °C). Las membranas fueron incubadas luego con una solución de Ab primario en buffer bloqueante a RT por 1.5 - 2 hrs, u ON a 4 °C. Luego de 3 lavados (0.1% Tween en 1X PBS), las membranas se incubaron con el Ab secundario apropiado conjugado a horseradish peroxidase (HRP), en 0.05% Tween en 1X PBS a una dilución de 1:10,000, (1 hr, RT). Luego de otros 3 lavados, las bandas de proteínas fueron visualizadas por radiofotografía utilizando el kit ECL (Amersham Pharmacia BioTech), revelando el film en un revelador automático (Fuji film developer).

Para analizar los niveles totales y fosforilados de AKT y ERK, las células fueron sembradas en FN (10 $\mu\text{g/ml}$) ON y estimuladas con EGF o VEGF (40 ng/ml) por los períodos de tiempo indicados, y lisadas inmediatamente en buffer RIPA. Cantidades equivalentes de proteínas (confirmado por los valores de E-cadherina) fueron separadas en geles reductores SDS-PAGE, sometidas a inmunoblot y detectadas con el sistema ECL. La actividad específica de ambas proteínas se obtuvo por medio de la normalización de los valores densitométricos de AKT o ERK totales contra fosforilados, y contra los valores de E-cadherina.

RESULTADOS

Capítulo 1

Modelo de transformación maligna en 3D rBM

Introducción

La actualización de las técnicas de screening de cáncer de mama ha resultado en los últimos años en un aumento en el número de casos de pacientes presentando tumores pequeños o lesiones pre-invasivas in situ. Previamente el DCIS era considerado una entidad en sí mismo y tratado por mastectomía. Y a pesar de reconocerse el diferente comportamiento de distintos subtipos, las convenciones morfológicas acerca de la clasificación de los DCIS o las atipias no son suficientes para identificar aquellos pacientes que presentan un alto riesgo de progresión de la enfermedad (Badve et al., 1998; Lim et al., 2004). Provenzano et al (2004) encontraron algunos indicadores histológicos específicos de recurrencia de DCIS para una población australiana (Provenzano et al., 2004), pero no existen estudios similares realizados sobre otras poblaciones. Las estrategias de tratamiento para los diferentes subtipos biológicos de DCIS no han sido aun estandarizadas y van desde la mastectomía radical hasta la excisión local, con o sin terapia hormonal adyuvante o radioterapia. Los determinantes de la elección del tipo de terapia dependen de varios parámetros acerca del DCIS así como de factores específicos del paciente. Por lo tanto, para permitir la selección de opciones terapéuticas más modernas como por ejemplo la cirugía conservativa de la mama, para

evitar el sobre o sub- tratamiento, es necesaria la definición de criterios pronósticos adicionales o la identificación de las vías moleculares que conducen a la transformación de un DCIS en un carcinoma invasivo.

Varios autores han demostrado que un alto grado de angiogénesis y de moléculas proangiogénicas presentes en una lesión premaligna podrían predecir la predisposición de una lesión a la transformación maligna (Folkman & Shing, 1992; Teo et al., 2002; Wulfig et al., 2005). Alternativamente, ya que una de las características de los tumores malignos es la invasión del estroma subyacente por las células tumorales, la secreción de MMP así como la pérdida de polarización y de interacciones célula- célula han sido considerados reguladores fundamentales de la progresión maligna (Fata et al., 2004).

Engels et al (1997) encontraron que existen dos patrones angiogénicos diferentes que se desarrollan en el estadio pre-neoplásico: a) el aumento difuso de la vascularidad dentro del estroma, el cual podría deberse a la producción de factores angiogénico por células accesorias como macrófagos y células endoteliales, y b) un anillo denso de microvasos rodeando el ducto premaligno, el cual podría ser el resultado de la secreción de factores angiogénicos por las células neoplásicas, y cuya función es la de proveer al DCIS con una alta concentración de oxígeno y nutrientes, y contribuir con la diseminación de las células tumorales al torrente sanguíneo, favoreciendo así la formación de metástasis (Engels et al., 1997).

La expresión de MMPs ha sido asociada estrechamente a la progresión maligna (Morini et al., 2000; Sternlicht et al., 2000; Werb et al., 1996). De hecho, la remodelación o disrupción de la BM ocurre durante el desarrollo normal así como en estados de enfermedad, y la stromelisin-1, un miembro de la familia de las MMPs, fue una de las primeras proteinasas que se encontró estaban asociadas al cáncer (Werb et al., 1996).

Una característica de los carcinomas invasivos es la alteración de la arquitectura tisular debido a cambios en las interacciones célula- célula y célula- ECM, los cuales derivan en la pérdida de polaridad basal (Wang et al., 2002; Weaver et al., 1997). De hecho, las interacciones célula- célula y célula- ECM son principios organizativos esenciales que ayudan a definir la naturaleza del contexto del tejido, jugando un rol crucial en la regulación de la homeostasis y especificidad tisular (Bissell, 2002). En su trabajo, Bissell et al proponen que la estructura y la polaridad tisular podrían explicar como este contexto determina la integridad funcional, y como su pérdida puede llevar a la transformación maligna.

Por lo tanto, el desarrollo de un modelo que permita el estudio del status angiogénico de una lesión pre-maligna, así como su producción de MMPs y pérdida de arquitectura tisular, podría ser una herramienta útil para la detección de predictores alternativos de DCIS de alto riesgo.

A pesar de que existen modelos animales de transformación invasiva (Allred & Medina, 2000; Hu et al., 2004), su estudio es complicado, ya que la transformación lleva un largo tiempo en ocurrir. Por otra parte, los ratones transgénicos que sobre-expresan oncogenes o genes mutantes de supresores tumorales, representan cada uno solo un subconjunto de los cánceres de mama humanos (Medina, 2000). Pero es importante notar que la mayoría de los cánceres de mama humanos no son simplemente un único conjunto de alteraciones genéticas, sino varios subconjuntos de múltiples alteraciones.

De manera alternativa, para identificar promotores clave de la transformación del DCIS, hacen falta modelos confiables *in vitro*, como el modelo de progresión de cáncer de mama MCF10A desarrollado por Miller et al (Miller et al., 1993). Pero para poder estudiar los procesos celulares y moleculares que llevan a una célula normal a la transformación maligna, se necesita analizar poblaciones de MECs humanas puras que representen los estadios específicos de la progresión neoplásica.

Un modelo alternativo de progresión del cáncer de mama es la serie de células HMT3522 (S1, S2, y T4-2), establecida por Briand y colaboradores a partir de una lesión fibrocística de mama, la cual dio lugar a la línea celular epitelial mamaria humana inmortalizada, no tumorigénica y casi diploide: S1 (Briand, 1987). El cultivo primario de las MECs fue propagado *in vitro* en medio químicamente definido incluyendo insulina, transferrina, EGF, hidrocortisona, estradiol, prolactina, & selenito de sodio. Estas células no eran tumorigénicas en ratones atímicos; no poseían receptores de estrógeno, y el

estradiol no estimulaba su crecimiento. Durante la propagación en cultivo, los requerimientos de las células HMT-3522 disminuyeron simultáneamente con la amplificación y sobre-expresión del proto-oncogen c-myc. No se observaron alteraciones en otros proto-oncogenes relacionados al cáncer de mama humano, tanto con respecto al número de copias como a la expresión génica. Al pasaje número 118, en el cual el factor de crecimiento más importante continuaba siendo el EGF, Madsen et al (1992) lograron aislar una sublínea independiente de EGF (S2) (Madsen et al., 1992). Junto con la independencia de EGF de las células S2, estas presentaban sobre-expresión de los mRNAs para EGFR, TGF- α , y c-erb-B2 al compararla con la sublínea dependiente de EGF (S1). Ninguno de los pasajes tardíos de las células S1 ni las células S2 eran capaces de generar tumores en ratones atímicos. Estos resultados correlacionaban la amplificación y sobre-expresión de c-myc con una disminución en el requerimiento de factores de crecimiento, y generaron la idea de que aún cuando estas alteraciones se encontraban combinadas con la immortalización y la independencia de EGF, eran insuficientes para la transformación maligna de estas células epiteliales mamarias humanas. Un muy importante cambio en el fenotipo de las células S2 fue observado en el pasaje número 238, cuando estas células lograron generar un tumor en un ratón (Briand, 1996). Luego de dos pasajes ratón-cultivo, se estableció la línea celular transformada malignamente (T4-2), la cual era refractoria al EGF y la cual como única diferencia con las células S2 presentaba una copia extra de un marcador cromosómico, 7q-. Un rol fundamental del EGFR en la transformación maligna se encuentra enfatizado por la pérdida de la sensibilidad al EGF y la adquisición de un cromosoma 7p extra portando el gen del

EGFR por las células T4-2. Por lo tanto, la línea celular HMT-3522 podría servir como un modelo útil para el estudio de la diferenciación y carcinogénesis de las células mamarias in vitro.

Aprovechando la capacidad de modelar tanto la mama normal como el cáncer de mama con el ensayo 3D rBM (Petersen et al., 1992), previamente demostramos que las células S1 forman estructuras acinares polarizadas y arrestadas en su crecimiento, mimetizando los acinos mamarios in vivo (Petersen et al., 1992; Weaver et al., 1997). Las células T4-2, en cambio, forman colonias grandes y desorganizadas que son bastante homogéneas en tamaño y que han perdido la expresión polarizada de todos los marcadores de diferenciación examinados (discutido en Weaver et al., 1996).

Interesantemente, cuando las células S2 son crecidas en 3D rBM forman colonias desorganizadas y de tamaños heterogéneos, mayormente colonias de tamaños pequeños y medianos y unas pocas colonias de mayor tamaño. Por lo tanto, este no sería todavía un modelo perfecto de DCIS in vitro, ya que el estudio de factores específicos involucrados en la transformación maligna requiere de poblaciones celulares puras y homogéneas.

Debido a la heterogeneidad de la población S2, el objetivo de nuestro trabajo fue purificar un número de líneas celulares ‘pre malignas’ a partir de cultivos de células S2, utilizando el tamaño y el nivel de organización de las colonias en cultivos 3D rBM como criterios de screening.

Aquí describo el aislamiento y la caracterización de tres líneas celulares premalignas, S3-A (o S3 mini), S3-B (o S3 midi), y S3-C (o S3 maxi), a partir de colonias individuales de cultivos 3D rBM de células S2, los cuales podrían constituir un mejor modelo de DCIS para estudiar la transformación maligna in vitro.

Resultados

Aislamiento de una población premaligna y homogénea de MECs de tipo DCIS

Para evaluar los eventos que ocurren durante la progresión de un fenotipo no-tumorigénico a un fenotipo maligno invasivo, decidimos establecer poblaciones puras de células premalignas a partir de la línea heterogénea de células premalignas S2. Para esto crecimos las células S2 (pasaje número 215) en 3DrBM por 20 a 30 días y aislamos varias colonias de cada uno de los tamaños característicos: pequeñas, medianas y grandes, utilizando una aguja estéril para transferir cada una de estas colonias a una placa de cultivo independiente (utilizando un microscopio invertido). Luego expandimos y propagamos en cultivo cada uno de estos clones por al menos 6 generaciones y luego analizamos su morfología en cultivos 3D rBM (Figura 1). Estos clones demostraron generar cultivos 3D rBM del mismo tamaño que la colonia de origen (>90% pureza). Nos referimos a ellos como las líneas celulares S3-A (o S3 mini), S3-B (o S3 midi), y S3-C (o S3 maxi), con tamaño de colonias $A < B < C$. Los cultivos de células S3-A forman colonias

pequeñas en 3DrBM, aunque contienen una pequeña proporción de colonias más grandes; el resto, especialmente las células S3-C, forman cultivos esencialmente homogéneos. Estas células han sido propagadas por al menos 25 pasajes desde su aislamiento.

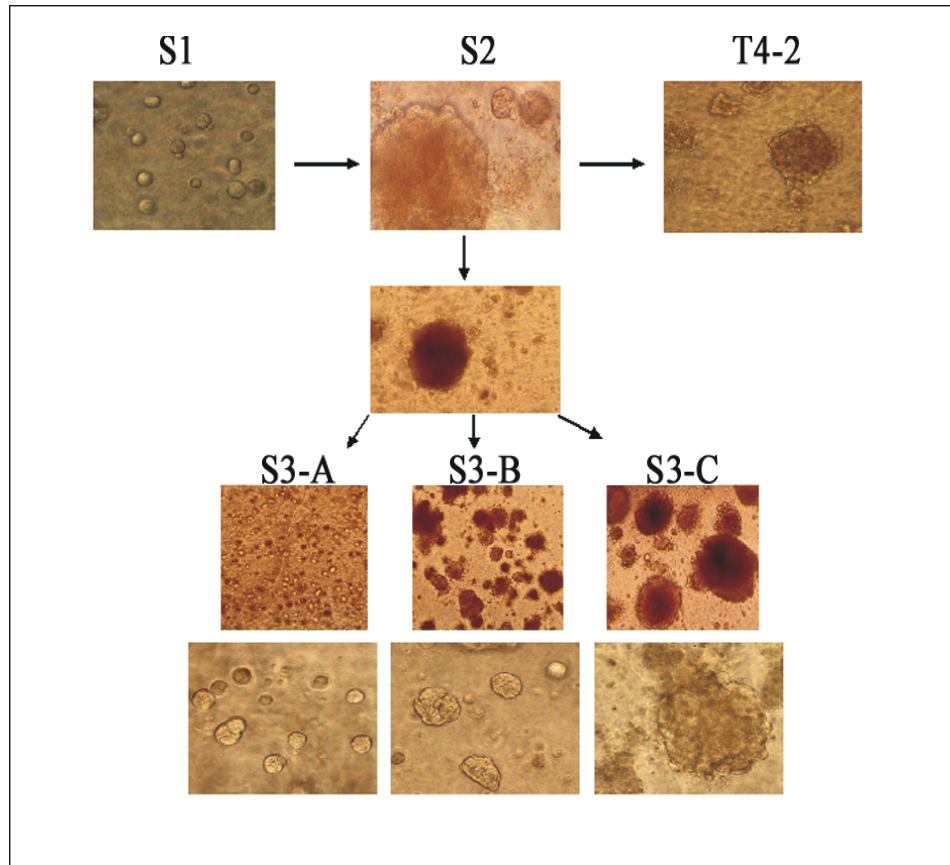


Figura 1. Morfología diferente y homogénea de las células S3-A, -B y -C en cultivo 3D rBM

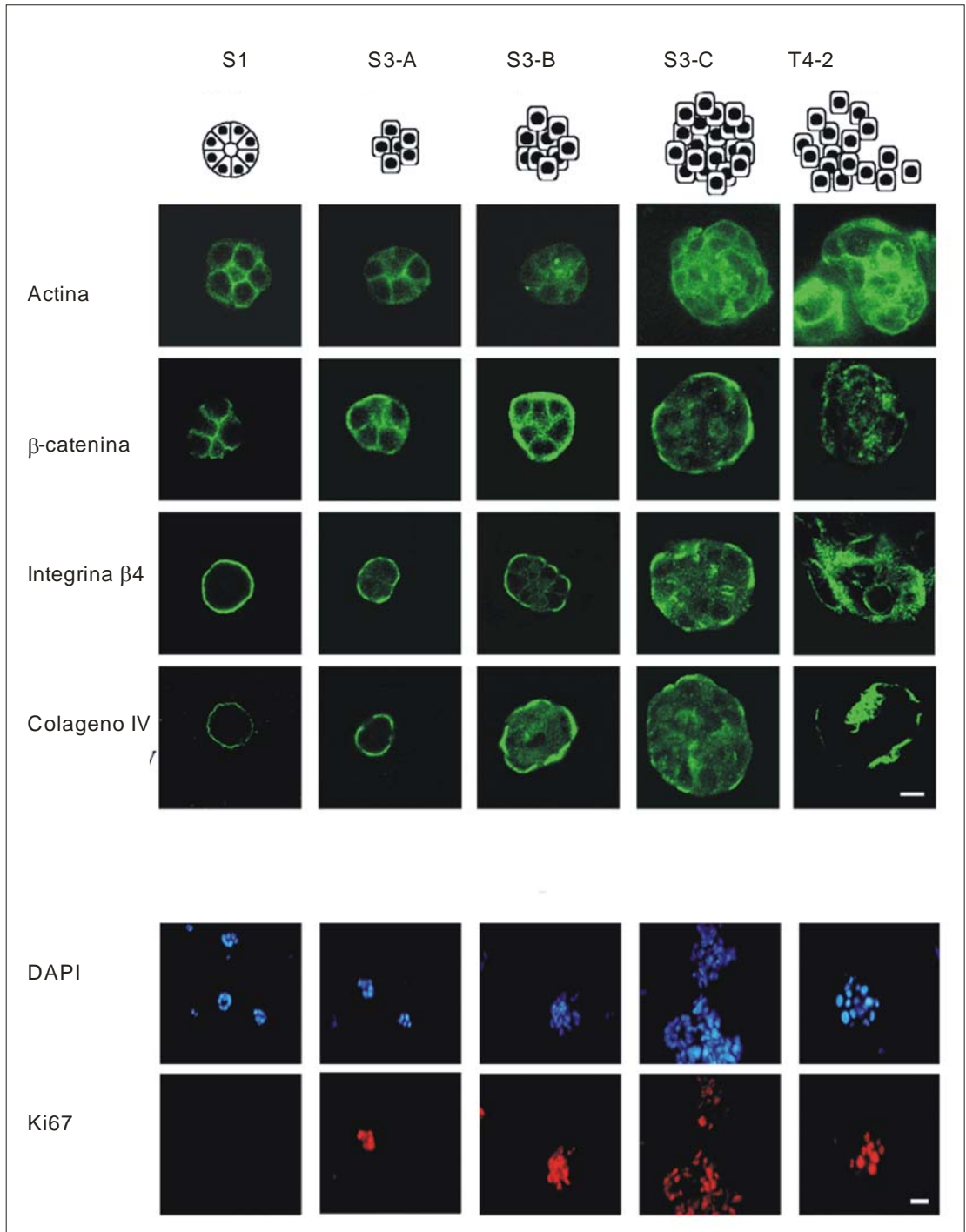
Fotomicrografías de contraste de fase mostrando las MECs originales de la serie celular HMT-3522, y los nuevos clones de células S3-A, -B y -C (llamadas S3-A, S3-B y S3-C de acuerdo al tamaño de las colonias que forman [A<B<C] luego de 12 días en cultivo 3D rBM. Al día 20 de cultivo, se aislaron las colonias de diferentes tamaños a partir de cultivos 3D rBM de células HMT-3522-S2 (arriba). La propagación progresiva de las colonias de tamaños pequeño, mediano y grande demostró generar un fenotipo igual al de las colonias de origen, como se muestra aquí para los pasajes 8 (abajo) de cada uno de estos clones.

Caracterización fenotípica: las células S3 poseen una pérdida parcial de su diferenciación en cultivos 3DrBM

Debido a que los DCIS in vivo se caracterizan por la pérdida del control del crecimiento y de la organización tisular, aunque no son invasivas, decidimos caracterizar morfológicamente las variantes premalignas clonadas. Las MECs no-malignas y tumorales pueden distinguirse en el ensayo de cultivo 3D rBM por el diferente tamaño y arquitectura de las colonias que forman. Mientras que las células no-malignas S1 dan lugar a colonias pequeñas y polarizadas, las células T4-2 forman estructuras grandes y desorganizadas. Nos preguntamos entonces si las células S3 mostrarían distintos niveles de diferenciación, consistentes con el tamaño de las colonias que generan en 3D rBM. Para esto crecimos las células S3-A, S3-B y S3-C por 20 días en cultivo 3DrBM. Mientras que las células S1 dieron lugar a acinos con “adherens junctions” funcionales (expresión basolateral de β -catenina), correctamente organizados y polarizados (expresión basal de integrina β 4 y de actina cortical), los cuales arrestan su crecimiento al completar su diferenciación morfogénica (bajo grado de tinción de Ki67) (Figura 2, y Petersen et al., 1992), similarmente a lo que ocurre en células normales de mama in vivo.

Figura 2. Las líneas de células S3 demuestran pérdida de diferenciación en cultivo 3DrBM

Imágenes confocales de cultivos 3D rBM de 12 días de células S1, S3-A, S3-B, S3-C, y T4-2 (izquierda a derecha) inmunoteñidas para β -actina, β -catenina, integrina β 4 y Ki-67 (de arriba a abajo). Obsérvese que las células S3-C presentan pérdida de polarización (desorganización de β -actina, β -catenina e integrina β 4) y pérdida de inhibición del crecimiento (Ki-67 positivo), de manera similar a lo que se ve para las células tumorales T4-2, mientras que las células S3-A y -B (como las células S1) se encuentran todavía polarizadas y arrestadas en su crecimiento.



Estas propiedades de diferenciación se pierden en las líneas celulares malignas como las T4-2 (Figura 2, y Weaver et al., 1997) así como en los carcinomas invasivos de mama in vivo. Las colonias de células S2 poseen un fenotipo heterogéneo con respecto a todos los criterios arriba mencionados. Las series celulares S3 poseen un fenotipo intermedio entre las células S1 y las células T4-2 (Figura 2), con las células S3-C mostrando el fenotipo más homogéneo, y siendo las menos diferenciadas de las tres líneas celulares premalignas. Estas células S3-C han perdido el control sobre su crecimiento (tinción positiva para Ki-67) así como la polaridad lateral y basal (tinción para β -catenina e integrina β 4, respectivamente).

Las líneas celulares S3 son no migratorias

La migración es una de las características principales de la transformación maligna y las metástasis. Las células tumorales deben migrar a través de e invadir la BM, llegar al torrente sanguíneo, y finalmente establecer focos metastásicos en el nuevo órgano (Fidler, 2002). Por lo tanto, una de las características más importantes de la transformación maligna es la capacidad migratoria de las células.

Para evaluar si las células premalignas S3-C podrían utilizarse como un buen modelo in vitro de DCIS, decidimos examinar su fenotipo migratorio. Al comparar la habilidad de las células HMT-3522 para migrar para cerrar una herida (“scratch assay”), encontramos que, como esperábamos, las células T4-2 fueron capaces de migrar

significativamente hacia la herida durante las 8 hr del ensayo (Figura 3), mientras que las células S3-C no fueron capaces de hacer lo mismo.

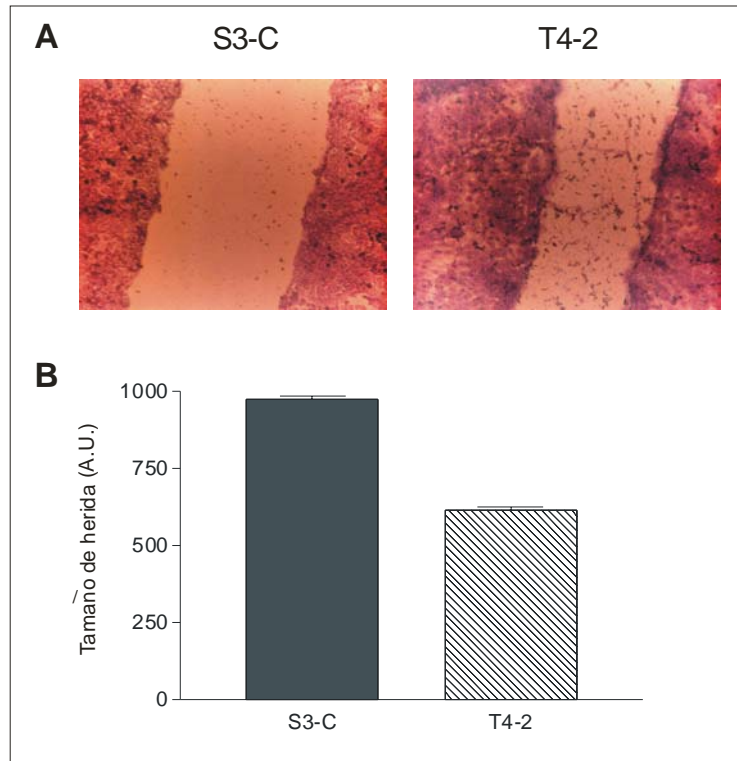


Figura 3. Las células S3-C no son migratorias

Las células S3-C y T4-2 se crecieron en placas de cultivo de 60 mm de diámetro hasta alcanzar confluencia, momento en el cual se realizó un surco longitudinal con un tip de micropipeta. La migración de las MECs fue evaluada luego de un período de incubación de 8 hr, midiendo el ancho del surco o herida al final del experimento. Izquierda: Fotomicrografía (contraste de fase) de células tenidas con Azul de coomasie, las cuales migraron para cerrar la herida, luego de 8 hr de incubación. Derecha: La migración (unidades arbitrarias) fue cuantificada en estas fotografías midiendo el tamaño de la herida utilizando el software Adobe Photoshop. Se graficaron la media y el SD en un histograma.

Las células S3-C son no invasivas y dependientes de anclaje para su crecimiento y supervivencia

La adquisición de la habilidad de invadir la BM es crucial para la progresión de un carcinoma in situ a un cáncer de mama invasivo y metastático, y una característica de malignidad in vitro es la habilidad de las células de crecer de forma independiente de anclaje (Zahir et al., 2003). Las lesiones premalignas son no invasivas, pero poseen un alto potencial para tornarse invasivas. Para determinar si alguna de las líneas celulares S3 clonadas se encontraban dentro del criterio de premalignidad, utilizamos ensayos en cámaras de Boyden para determinar la capacidad de estas células de invadir una rBM (Figura 4A). La inoculación de células S1, S2, y S3 en cámaras de Boyden recubiertas de rBM reveló que ninguna de estas células era invasiva, aún luego de la adición de EGF (20 ng/ml) como quimioattractante. En contraste, las células T4-2 demostraron ser altamente invasivas (Figura 4A), y pudieron ser estimuladas aún más por EGF. Cuando se agregó medio condicionado (CM) de las células T4-2 a cultivos de células S1, S2, y S3 para determinar si eran capaces de adquirir un fenotipo invasivo, las células S1 y S2 no fueron capaces de invadir, mientras que las células S3-A, S3-B y S3-C se hicieron ahora invasivas, con la mayor invasividad mostrada por las células S3-C (Figura 4A). Este experimento distingue claramente las células S1 y S2 de la serie celular S3: la última se encuentra “primada” para responder al CM de células malignas, pero no posee aún las alteraciones necesarias para permitir su invasividad per se.

Finalmente, a comparación con las células independientes de anclaje T4-2, las líneas celulares S3 fueron incapaces de formar colonias viables en agar blado (Figura 4B). Por lo tanto, estos experimentos marcan otra importante diferencia entre la serie de células premalignas S3 y las células T4-2: La conversión a un fenotipo maligno permite la producción de moléculas secretorias que confieren invasividad autónoma y capacidad invasiva a las células T4-2, las cuales no se encuentran aún presentes en las células S3.

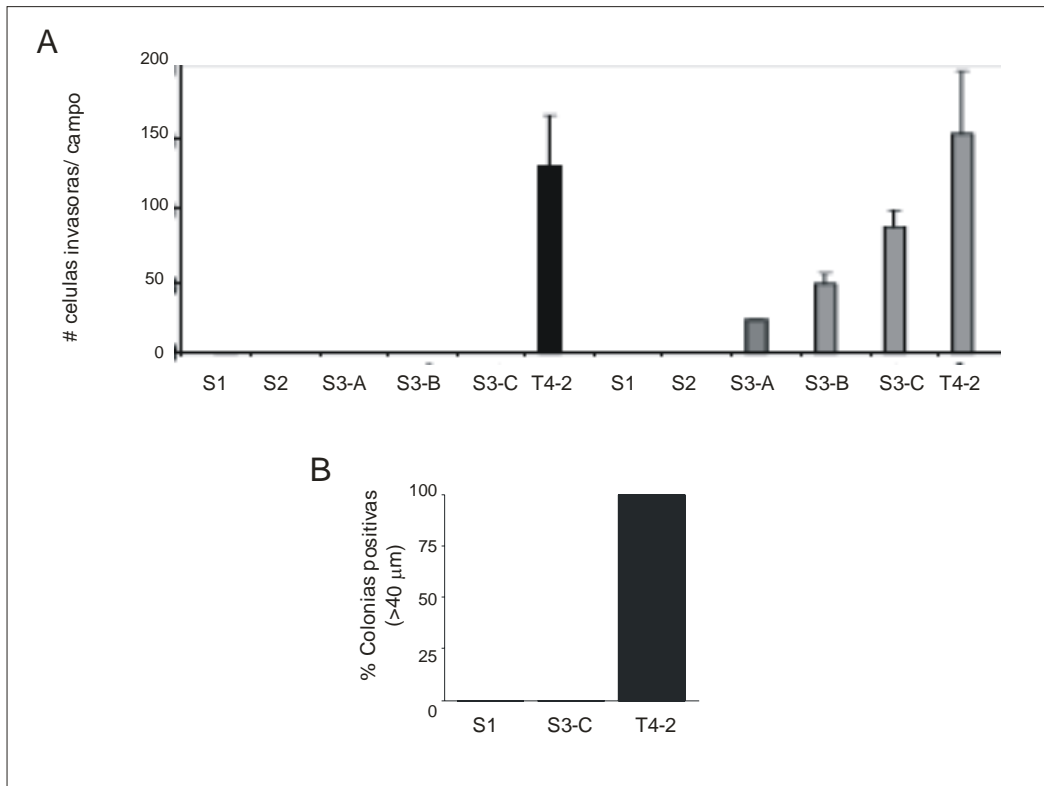


Figura 4. Adquisición de invasividad en la transición de un fenotipo premaligno a uno maligno

A. Cuantificación del porcentaje de invasión por las células S1, S2, S3-A, S3-B y S3-C en presencia de medio condicionado (CM) de células T4-2. Barras negras, células control; barras grises, células tratadas con CM de cultivos de células T4-2. Las MECs se inocularon en una cámara de Boyden cubierta de rBM y se incubaron por 16-20 hr. Los ensayos de invasión se realizaron al menos 3 veces por línea celular indicada. El número de células invasoras por campo se determinó bajo una magnificación de 200X. Nota: estos experimentos fueron realizados por mi colega A. Rizki en Berkeley, CA. B. Cuantificación del porcentaje de colonias positivas (>40 μm) que crecieron en el ensayo del agar blando (21 ds).

La actividad MMP es necesaria para la adquisición de invasividad y la transición de un fenotipo premaligno a uno maligno

Ya que las MMPs son moléculas relacionadas con la invasión por excelencia, decidimos estudiar la expresión de diferentes MMPs por las líneas celulares de la serie HMT-3522. Determinamos la capacidad gelatinolítica general presente en lisados de cultivos de células S1, S2, S3 y T4-2 utilizando zimogramas. Nuestros resultados demostraron que las células S1 expresaban proMMP2 pero no MMP9; las células S2, S3-A y S3-B no expresaban niveles detectables de MMP2 o MMP9; la línea S3-C expresaba bajos niveles de proMMP9 y las células T4-2 expresaban altos niveles de proMMP9 pero no de MMP2 (Figura 5A).

Sumado a la diferencia en niveles de expresión de MMPs entre las células S3 y las T4-2, encontramos que estas metaloproteinasas eran necesarias para la adquisición de invasividad, ya que el inhibidor de MMPs de amplio espectro GM6001 inhibía la invasividad de las células T4-2, mientras que el tratamiento de las células con CM1004, un análogo inactivo de GM6001, no ejercía efectos detectables (Figura 5B). Estos datos sugieren que la actividad de las MMPs es necesaria para la invasividad en este modelo, y que la expresión elevada de MMP9, 13, 15, y 17 se correlaciona con la alta invasividad observada en la transición de un fenotipo premaligno a uno maligno. Previamente MMP13 y MMP9 han sido asociadas a la progresión del cáncer de mama (Brown, 1993; Nielsen et al., 2001; Rha et al., 1998), demostrando nuevamente que los cultivos 3DrBM

de células S3-C y T4-2 serían modelos razonablemente confiables para evaluar la significancia funcional de la expresión génica en la transición maligna.

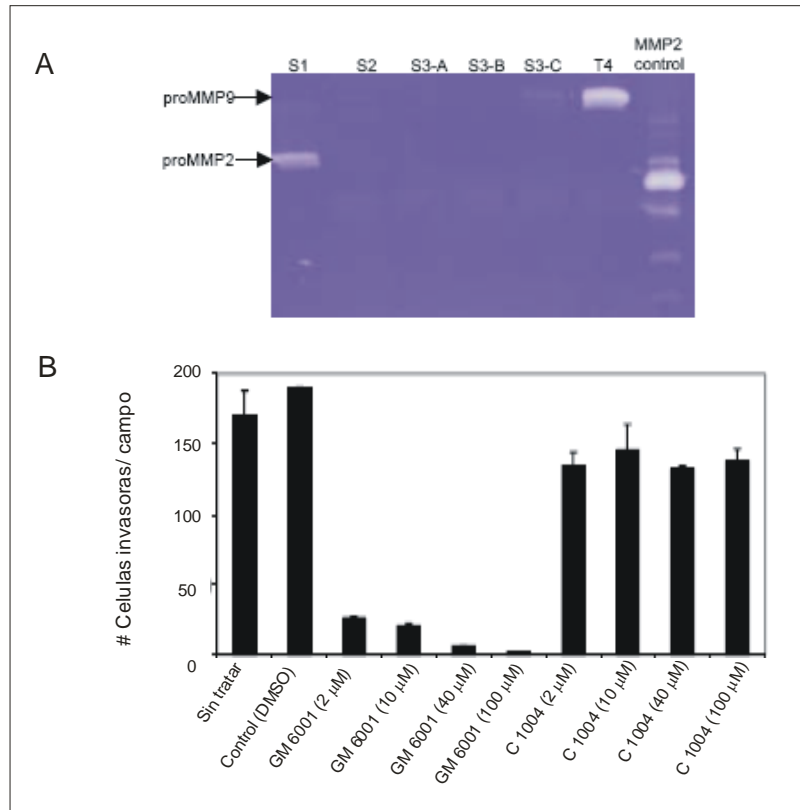


Figura 5: La progresión maligna se encuentra asociada con la expresión diferencial de MMPs

A. Zimograma para determinar la actividad gelatinolítica de las células S1, S2, S3-A, S3-B, S3-C y T4-2 (de izquierda a derecha), comparadas con el control de MMP2 recombinante activada por APMA. El tamaño de las bandas esperadas para proMMP9 y proMMP2 se encuentra indicado por flechas a la izquierda. B. Histograma cuantificando el porcentaje de invasividad para células T4-2 co-incubadas con el inhibidor de MMPs GM6001 o con CM1004, un análogo inactivo (no tratadas, control DMSO, + GM6001, y + C1004, de izquierda a derecha, duplicados). Nota: estos experimentos fueron realizados por mi colega A. Rizki en Berkeley, CA.

Por este motivo, decidimos utilizar las células S3-C como un modelo de DCIS in vitro para continuar con los estudios de progresión maligna.

Las células S3 poseen un potencial tumorigénico intermedio in vivo

Para células humanas en cultivo, no existen criterios claros o aceptados que definan la “pre malignidad”. Utilizando el sistema de líneas celulares isogénicas originadas a partir del mismo paciente, nos preguntamos si las células S3 poseerían un fenotipo intermedio entre las células no malignas S1 y las células malignas T4-2, en cuanto a número, tamaño, y características histológicas de las lesiones generadas al ser inyectadas en ratones nude. Inyectamos 10 millones de células en ambos flancos de ratones atímicos nude y medimos el número, tamaño tumoral, y características histológicas luego de 8 semanas (Figura 6A). Las células S1 o la inyección de medio de cultivo solo no produjeron ningún tipo de crecimiento, las células S2 formaron un tumor pequeño y estable de 7 mm³ de volumen en 1 de 22 inyecciones, y las células T4-2 formaron tumores palpables con una alta frecuencia, como fue descrito previamente (Briand, 1987; Briand, 1996; Wang et al., 2002; Weaver et al., 1997). La serie S3 formó tumores muy pequeños (<5mm³), con frecuencias de 7/20, 2/22, y 2/22 para las células S3-A, S3-B, y S3-C, respectivamente. La levemente mayor frecuencia de tumores obtenidos a partir de las células S3-A sería consistente con nuestra observación previa de que ~10% de las colonias formadas por estas células en 3DrBM son de tamaños muy grandes. Utilizando hematoxilina y eosina (H&E) examinamos la histología de las

tumores (Figura 6B), y encontramos que solo los tumores formados por la inyección de células T4-2 poseía células viables, proliferativas, y malignas, ya que habían invadido el estroma subyacente; estos tumores fueron caracterizados como una “squamous metaplasia”. Los tumores formados a partir de las células S3 poseían células no proliferativas con “clusters” de queratina rodeados de células inflamatorias, y eran no invasivos. Por lo tanto, las características del crecimiento in vivo de las células S3 eran claramente diferentes, tanto a las de las células no malignas S1 como de las células malignas T4-2, mostrando un fenotipo intermedio con respecto a la frecuencia, el tamaño y la histología de las lesiones formadas.

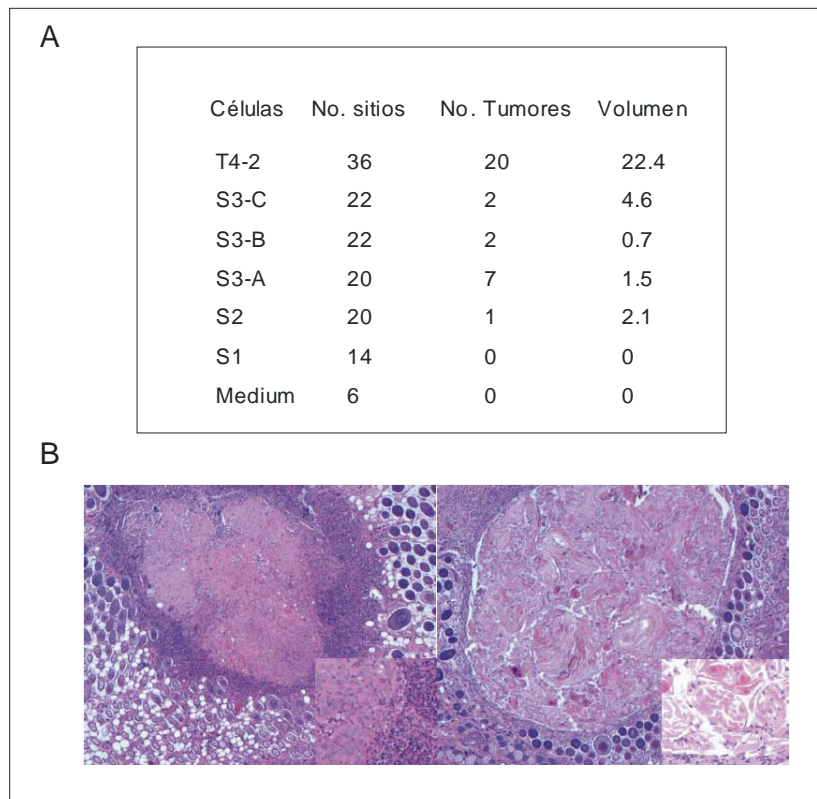


Figura 6. Las células S3 poseen un fenotipo premaligno en ratones nude in vivo

A. Tabla resumiendo los resultados de dos experimentos. Las células S3 y las líneas celulares control S1, S2, y T4-2 fueron inyectadas en ratones BALB/c nude atímicos. Se inyectaron 10 millones de células en ambos flancos de cada ratón, y los tumores fueron medidos semanalmente con un calibre. Los animales fueron sacrificados 8-10 semanas luego de la inyección de las MEC. El tamaño tumoral expresado en la tabla representa el final del experimento. Columna 1: tipo celular, columna 2: número de sitios inyectados (2 flancos por animal), columna 3: número total de tumores formados por tipo celular, y columna 4: volumen media de los tumores en mm^3 . B. Fotomicrografía mostrando la histología de tumores formados por las células T4-2 (panel superior) y células S3 (panel inferior) teñidos con H&E. Nota: estos experimentos fueron realizados originalmente por V.M. Weaver y A. Rizki en Berkeley, CA.

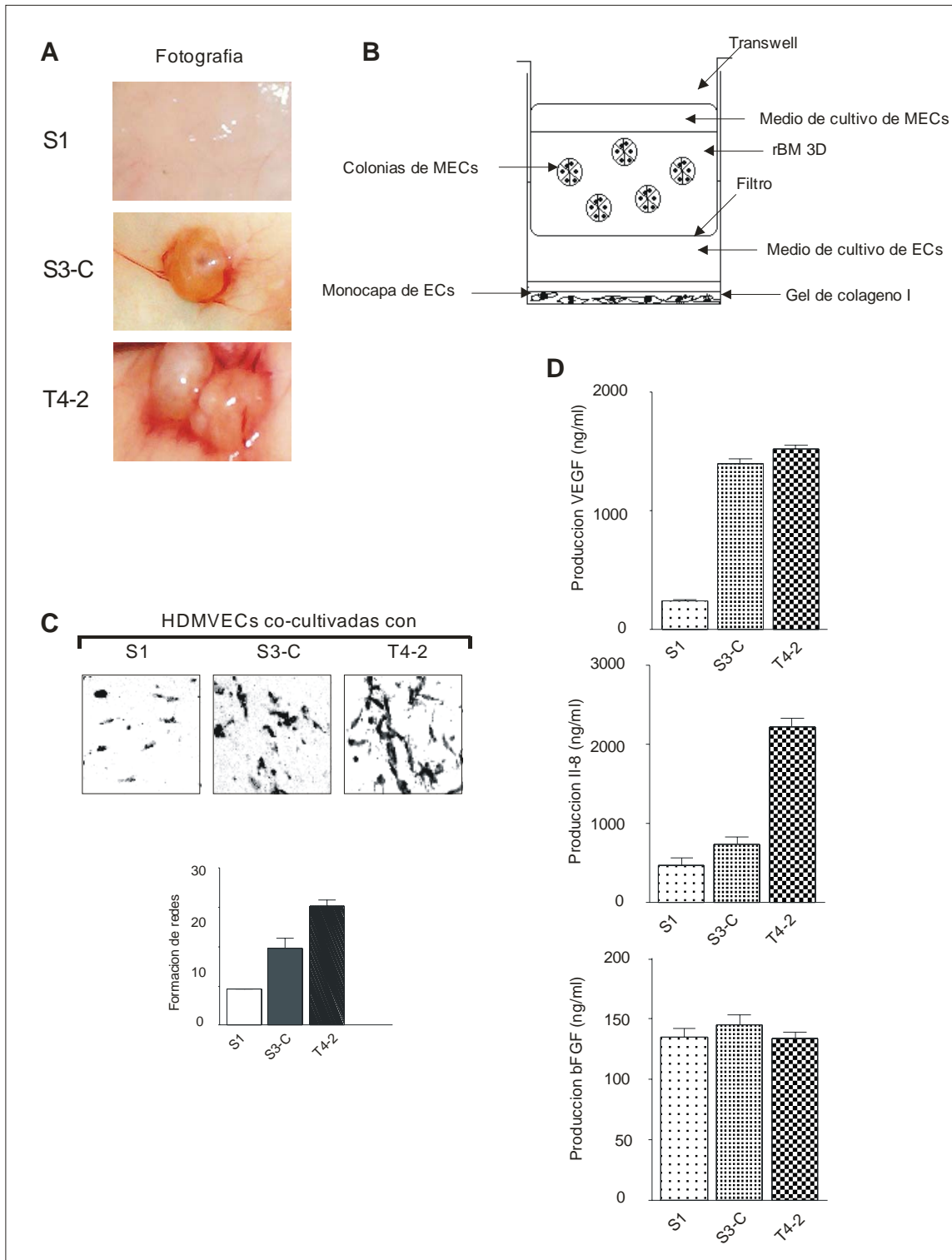
Las células S3-C son angiogénicas in vivo e in vitro

A pesar de que la inyección s.c. de células S3-C en ratones nude no dio lugar a la formación de tumores invasivos, notamos que estas lesiones eran ya angiogénicas en presencia de rBM (Figura 7A), una característica que ha sido previamente observada en lesiones premalignas humanas (Bergers et al., 1999; Chodak et al., 1980). Más aún, estas células demostraron ser capaces de estimular la angiogénesis de las ECs HDMVECs y HUVECs en el ensayo de co-cultivo desarrollado por nosotros para estudiar la angiogénesis in vitro (Figura 7B y C). En este ensayo, las MECs son cultivadas en 3D rBM en una cámara de Boyden por 10-12 días, luego de los cuales estas cámaras son transferidas a placas de 24 hoyos que poseen ECs cubiertas por geles de colágeno de tipo I (80% confluencia). Las MECs y las ECs son co-incubadas por 2 días, y la capacidad angiogénica de las distintas MECs se determina evaluando la invasión de las ECs hacia arriba, dentro del gel de colágeno (Figura 7B) y calculando la capacidad de las ECs de formar redes de células, análogas a capilares in vivo, utilizando el software Sion Image.

Cuando se estudió la producción de distintos factores pro-angiogénicos, se encontró que mientras que las células S1 no expresaban niveles significativos de VEGF, las células S3-C ya mostraban un aumento en la producción de esta proteína, aunque sus niveles eran menores que los obtenidos en el CM de células T4-2 (Figura 7D). A pesar de los resultados obtenidos para el VEGF, esto no resultó ser cierto para otros factores pro-

Figura 7. Las células S3-C son angiogénicas in vitro e in vivo

A. Fotografías digitales de lesiones derivadas de la inyección de células S1, S3-C y T4-2 mostrando la presencia de vasos sanguíneos tanto en tumores de células S3-C como T4-2. B. Esquema representando el modelo de co-cultivo desarrollado para estudiar la angiogénesis in vitro. Las MECs fueron crecidas en 3D rBM dentro de una cámara de Boyden (12 ds) y estos transwells fueron transferidos a placas de 24 hoyos donde monocapas semiconfluentes de HDMVECs habían sido cubiertas con un gel de colágeno tipo I (1 mm espesor). Luego de 2 días, los gels de colágeno fueron fijados en 4% PFA, teñidos con 0.1% azul de toluidina y montados en portaobjetos de vidrio para obtener fotomicrografías. La formación de redes por las ECs en las diferentes condiciones experimentales fue analizada utilizando el software Scion Image, esqueletonizando la foto de las redes de ECs. Para cada conjunto de datos se obtuvieron la media y SD. C. Fotomicrografías mostrando la invasión del gel de colágeno por las HDMVECs co-cultivadas con células S1, S3-C o T4-2 (los mismos resultados se obtuvieron para las iHUEC2A). Nótese que las únicas células capaces de generar una respuesta angiogénica son las S3-Cs y las T4-2s. D. Niveles de VEGF, IL-8 & bFGF en medio condicionado (CM) de cultivos 3DrBM de células S1, S3-C y T4-2 (12 ds), obtenidos por ELISA. Mientras que la secreción de VEGF pareció estar correlacionada con el potencial maligno de las células (S1 < S3 < T4-2), los niveles de bFGF en el CM fueron los mismos, sin importar el fenotipo de las MECs, y la IL-8 fue expresada solo por las células tumorales.



angiogénicos como la IL-8 o el bFGF, cuyos niveles fueron similares a los producidos por las células nomalignas S1 (Figura 7D).

Estos datos confirman de manera aún mas contundente que las células S3-C presentan características de MECs humanas premalignas.

Distintos niveles de expresión de integrinas se correlacionan con la transición de un fenotipo premaligno a uno maligno

La transición de un DCIS a un carcinoma invasivo se encuentra asociada a un aumento en la migración, invasión y supervivencia de las células. La motilidad, invasión, y supervivencia celulares dependen fuertemente de interacciones célula- ECM (estudiado en (Liotta & Kohn, 2001), y las integrinas, los principales receptores celulares para la ECM, se han encontrado implicadas en cada uno de estos procesos (discutido en Hanahan & Weinberg, 2000).

Distintas integrinas han sido implicadas en la adquisición de invasividad en tejidos mamarios, y nosotros así como otros investigadores demostramos que las integrinas son críticas para la expresión del fenotipo maligno (Alford & Taylor-Papadimitriou, 1996; Mercurio et al., 2001; Shaw, 1999; Weaver et al., 1997). Más aún, en nuestro grupo demostramos que las integrinas serian reguladores clave de la arquitectura tisular (Wang et al., 1998; Weaver et al., 1997) y serían también

responsables del aumento de la supervivencia de las MECs tumorales in vitro (Zahir et al., 2003). La expresión de la integrina $\beta 1$ es crítica para la iniciación de la tumorigénesis mamaria in vivo, y para mantener la capacidad proliferativa de células tumorales de estadios tardíos (White et al., 2004), así como para el mantenimiento del fenotipo maligno in vitro e in vivo (Weaver et al., 1997). Estas observaciones proveen una demostración directa de que las integrinas podrían ejercer una función crítica en el crecimiento de los tumores mamarios.

Basándonos en estos precedentes, decidimos explorar la posibilidad de que la transformación maligna estuviese asociada a cambios específicos en la expresión de integrinas. Utilizando FACS determinamos los niveles de expresión en la superficie celular de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, y $\beta 4$ en las series celulares S3 para compararlos con los niveles encontrados para las células T4-2 y S1 (Figura 8A). Los datos demostraron que los niveles de las integrinas $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, y $\beta 4$ eran significativamente más altos en las células T4-2 comparados con las células S3 y S1, pero no se encontraron diferencias significativas para las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$.

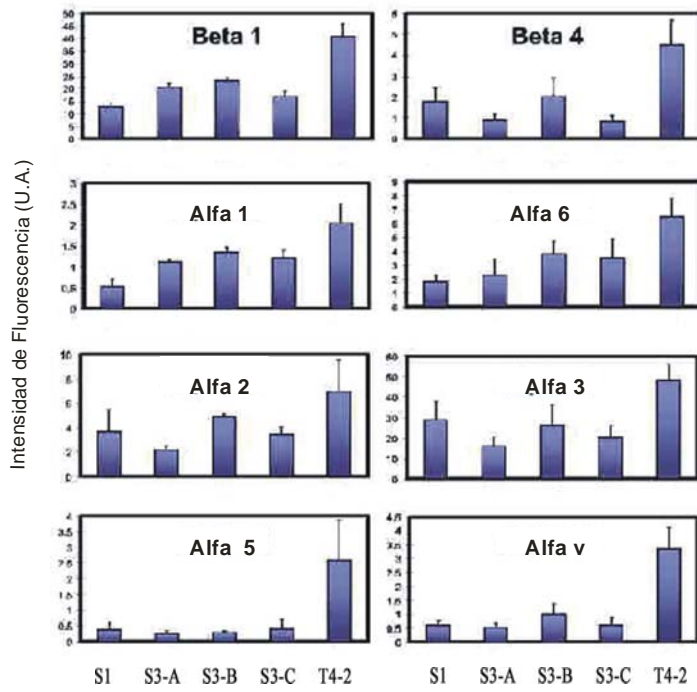
Para determinar la significancia funcional de la expresión alterada de las integrinas, establecimos un ensayo de invasión in vitro en cámaras de Boyden recubiertas de rBM, pre-incubando las células T4-2 con un Ab bloqueante de función de la integrina $\beta 1$ (AIIB2) (Figura 8B), el cual demostró previamente ser capaz de revertir el fenotipo tumoral in vitro así como in vivo (Weaver et al., 1997). El bloqueo de la actividad de la

integrina $\beta 1$ abolió la capacidad invasiva de las células T4-2. De manera inversa, nos preguntamos si la activación de la integrina $\beta 1$ en las células premalignas S3-C podría hacerlas invasivas in vitro. Utilizando un Ab estimulador de función de la integrina $\beta 1$ (Arroyo et al., 1993), encontramos un aumento dependiente de la dosis de Ab en el número de células S3-C capaces de invadir la BM (Figura 8C). Estos resultados demuestran que la función de la integrina $\beta 1$ es necesaria para la adquisición de invasividad en este modelo de cultivo. E inversamente, la estimulación de la actividad de la integrina $\beta 1$ fue suficiente para aumentar el potencial invasivo de las células premalignas, demostrando que esta integrina serviría como un marcador para distinguir lesiones benignas de aquellas con mayor probabilidad de progresión maligna in vivo.

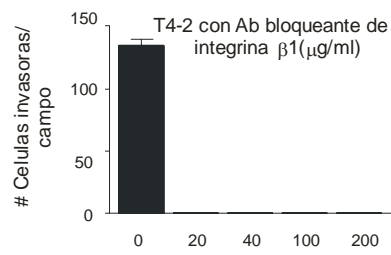
Figura 8. Cambios en la expresión de integrinas contribuyen a la adquisición de invasividad in vitro

A. Histograma representando los niveles de expresión en la superficie celular de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, y $\beta 6$ por las células HMT-3522 S1, S3-A, S3-B, S3-C y T4-2 obtenido por FACS. Los valores de expresión fueron normalizados con respecto a las células S1 para cada integrina, para permitir la comparación entre experimentos utilizando diferentes Abs. Solo las integrinas $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 4$ y $\beta 1$ se encontraron expresadas consistentemente de manera mayor en las células T4-2 que en las células S3 y S1 y ($p < 0.05$). B. Número promedio de células invasivas por campo de magnificación baja (200X) examinado para las muestras indicadas de células T4-2: control no tratadas o tratadas con las concentraciones indicadas ($\mu\text{g/ml}$) de Ab bloqueante de la integrina $\beta 1$. C. Número promedio de células invasivas por campo de magnificación baja (200X) examinado para las muestras indicadas de células S3-C y T4-2: células S3-C o T4-2 control no tratadas, o células S3-C tratadas con las concentraciones indicadas ($\mu\text{g/ml}$) de Ab estimulante de la integrina $\beta 1$ TS2/16. Nota: estos experimentos fueron realizados originalmente por V.M. Weaver y A. Rizki en Berkeley, CA.

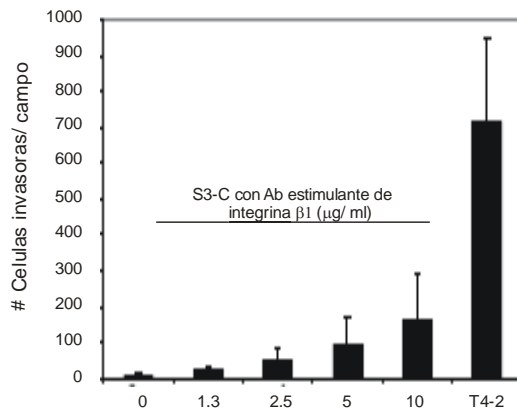
A



B



C



Discusión

En este primer Capítulo hemos descrito un modelo de cultivo en el cual primeramente definimos el criterio de premalignidad como la capacidad de las células de dar lugar a poblaciones celulares malignas al ser propagadas in vitro, como es el caso de las células S2 y sus raras derivadas malignas, las células T4-2. Para enriquecer los cultivos heterogéneos en 3D rBM de las células S2 en sus poblaciones premalignas aisladas, clonamos tres poblaciones celulares, de acuerdo al tamaño de las colonias formadas en 3DrBM como una primera herramienta de screening. Caracterizamos la capacidad de estas células de diferenciarse, utilizando como criterios el arresto del crecimiento y la formación de acinos polarizados correctamente en 3DrBM. In vivo, el aumento de proliferación de las células acinares y ductales se observa ya al nivel hiperplásico, y el índice proliferativo aumenta durante la progresión del cáncer de mama a partir de una hiperplasia, pasando a una hiperplasia atípica y a un carcinoma in situ, pero se mantiene constante entre los carcinomas in situ y los invasivos (Bai et al., 2001). Nuestros resultados son consistentes con observaciones in vivo: las células S3 poseen mayores tasas de proliferación que las células no tumorigénicas S1, con tasas de crecimiento intermedias para las S3-A y S3-B, y similares velocidades de crecimiento para las células T4-2 y S3-C, como se observó en el ensayo de cultivo en 3DrBM (Figura 2). Otras medidas de diferenciación incluyeron la expresión polarizada de integrinas, la expresión de β -catenina en uniones célula-célula, y la organización cortical de actina, los cuales previamente se demostró que son buenos marcadores de la diferenciación tisular

de la mama in vivo (Hashizume et al., 1996; Nollet et al., 1999; Pignatelli et al., 1992). Utilizando estos criterios, demostramos que las células S3-C poseen el fenotipo más pobremente diferenciado dentro de la serie celular S3, haciendo de estas células candidatos plausibles para estudios futuros de la transición premaligna y maligna.

Para elucidar cuáles eran los factores necesarios para la transformación maligna, utilizamos los ensayos de migración e invasión, ya que la capacidad de migrar e invadir a través de la BM es un criterio que define la malignidad per se. Ninguna de las células S3 o las células fenotípicamente normales S1 fueron capaces de invadir en las mismas condiciones en las cuales las células malignas T4-2 eran altamente invasivas.

Cuando inyectamos las distintas MECs en ratones nude, todas las células de la serie S3 produjeron lesiones pequeñas con una baja frecuencia, comparadas con las células malignas T4-2 que dieron lugar a grandes tumores con alta frecuencia (Figura 6). El examen histológico de los tumores formados por las células S3 y T4-2 estableció que los tumores premalignos no poseían demasiadas células proliferativas y presentaban grandes depósitos de queratina e infiltración de células inmunes, sugiriendo que las células inyectadas no serían capaces de sostener la viabilidad a largo plazo, y exhibiendo un fenotipo que recordaba a la senescencia in vivo. En contraste, la inyección de las células malignas T4-2 produjo tumores que contenían células epiteliales viables que se encontraban proliferando activamente. Debido a que las tres diferentes poblaciones de células S3 exhibieron frecuencias similares de formación de tumores no viables en

ratones nude, este ensayo no serviría para determinar cuál de estas líneas celulares poseería el mayor potencial para la transformación maligna. A pesar de esto, una importante observación fue que las células S3 mostraron un fenotipo angiogénico in vivo así como in vitro, como es el caso de los DCIS humanos.

Este resultado, combinado con la observación de que las células S3-C mostraban el fenotipo más pobremente diferenciado en cultivos 3DrBM, nos indujo a elegir a las células S3-C como la población premaligna más consistente derivada de las células S2. Análisis genómicos subsiguientes comparando los niveles de expresión génica entre las células premalignas S3 y las células malignas T4-2 apoyaron la relevancia de este modelo para la determinación de mecanismos moleculares involucrados en la transición de un tumor premaligno a un cáncer de mama (Ritzki et al, observaciones no publicadas). Finalmente, demostramos que los niveles de expresión de las integrinas $\alpha 5$, αv y $\beta 1$ eran raros en las células pre-malignas y no-malignas (Figura 8A), sugiriendo que estas integrinas podrían ser de importancia en la transición de un DCIS a un carcinoma invasivo. Más aún, demostramos que la función de la integrina $\beta 1$ es necesaria para la adquisición de invasividad en este modelo, ya que al bloquear la función de la integrina $\beta 1$ en las células T4-2 se abolió su capacidad de invadir una rBM (Figura 8B). Inversamente, la estimulación de la actividad de la integrina $\beta 1$ fue suficiente para aumentar el potencial invasivo de las células premalignas (Figura 8C), demostrando el posible potencial de esta integrina como un marcador para distinguir lesiones benignas de aquellas con altas probabilidades de transformarse en cánceres in vivo.

Capítulo 2

La integrina $\alpha 5\beta 1$ induce la supervivencia de las células epiteliales pre-malignas a través de un loop autocrino que involucra la interacción entre VEGF y flt-1

Introducción

En el Capítulo anterior describimos el establecimiento de la línea celular S3-C y determinamos su potencialidad para ser utilizada como un modelo de DCIS in vitro. Las células premalignas S3-C dieron lugar a colonias proliferativas no polarizadas luego de 10-12 en cultivo 3D rBM. Estas células fueron a su vez capaces de inducir una respuesta angiogénica in vitro e in vivo, pero no demostraron poseer características malignas como capacidad migratoria, capacidad invasiva, y crecimiento y supervivencia independientes de anclaje. Consistentemente con estas observaciones, cuando fueron inyectadas en ratones nude, las células S3-C no dieron lugar a tumores invasivos.

Debido a que las integrinas han sido asociadas a la mayoría de los procesos involucrados en la transformación maligna, intentamos determinar si existía alguna diferencia entre los patrones de expresión de integrinas entre las diferentes líneas

celulares del modelo de progresión de cáncer de mama HMT-3522. Encontramos que las integrinas $\alpha 5$, αv y $\beta 1$ eran expresadas en altos niveles únicamente por las células tumorales T4-2, de manera similar a lo que sucede con los carcinomas mamarios in vivo (Serre et al., 1995), (Gould et al., 1990), (Berry et al., 2003), (Koukoulis et al., 1993), y también encontramos que la función de la integrina $\beta 1$ era necesaria para la adquisición de la capacidad invasiva de nuestro modelo de progresión de cáncer de mama.

Debido a sus funciones como moléculas de adhesión célula- célula y célula-ECM, y debido a su habilidad de activar diferentes vías de señalización llevando a la proliferación, supervivencia y control de la estructura tisular, las integrinas han sido propuestas como reguladores clave de la formación de metástasis (Felding-Habermann, 2003; Qian et al., 2005; Tani et al., 2003; Varner & Cheresch, 1996; Wang et al., 2004).

El escape inicial de una célula tumoral de su sitio primario requiere de la pérdida de la adhesión célula- célula y de alteraciones en la naturaleza de las adhesiones entre las células tumorales liberadas y la ECM, las que permiten a las células móviles neoplásicas migrar a lo largo de sustratos subyacentes (Fidler, 2002; Meyer & Hart, 1998). Luego de su desprendimiento del tumor primario, las células metastásicas deben invadir el estroma subyacente, entrar a la vasculatura o el sistema linfático, sobrevivir y arrestarse en un sitio distante. A partir de aquí, deben extravasar al tejido y estimular la angiogénesis para crecer y formar una masa tumoral secundaria. Los paralelos entre este proceso y los procesos de inflamación y cicatrización de heridas han servido para identificar varias de

las moléculas que se cree se encuentran involucradas en la diseminación tumoral. Los procesos claves involucrados incluyen, entre otros, cambios en la adhesión celular, la producción de factores de crecimiento y la secreción de una variedad de citoquinas que atraen y activan células inflamatorias y ECs estromales durante la invasión y angiogénesis.

El escape de la vigilancia del sistema inmune, la sobre-expresión de factores de crecimiento y/o sus receptores y la regulación positiva de vías de señalización que regulan la supervivencia y/o proliferación y escape de la apoptosis (como por ejemplo las vías PI3K/AKT y MEK/ERK respectivamente), son varios de los factores involucrados en la supervivencia de las células metastásicas. El aumento de la expresión de factores pro-supervivencia como Bcl-2, survivina, IAPs y NF- κ B, y la inducción de la angiogénesis a través de la sobre-regulación de factores proangiogénicos o la sub-regulación moléculas antiangiogénicas son fundamentales para el proceso metastásico. Por lo tanto, la identificación de los factores que inducen la supervivencia de las células tumorales serviría para ayudar a la identificación de nuevos blancos para el tratamiento de lesiones metastásicas.

A su vez, también se encontró una importante correlación entre la expresión de integrinas y la transformación maligna. Más aún, la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ pareciera correlacionarse con el potencial invasivo y metastásico de las MECs (Koukoulis et al., 1991). Y, como fue propuesto previamente, las integrinas podrían

regular varios, sino todos, los pasos principales involucrados en la transformación maligna. Por otra parte, se ha descubierto que el VEGF es un factor de crecimiento importante que influencia la supervivencia de las células tumorales mamarias. Más allá de su actividad pro-angiogénica, el VEGF, a través de su interacción con sus receptores en la superficie de la célula tumoral, puede inducir un loop autocrino de supervivencia en algunas líneas celulares tumorales (Bachelder et al., 2001). Más aún, estos autores demostraron que la interacción entre VEGF-VEGFR y la integrina $\alpha 6\beta 4$ era esencial para este loop de supervivencia.

Debido al aumento exponencial de los casos de DCIS de mama detectados en los últimos años, la comprensión de cómo un DCIS se transforma en un tumor invasivo y finalmente da lugar a metástasis es fundamental para poder establecer una forma eficiente para controlar la progresión de la enfermedad.

Una observación importante es que se supone que el estroma que rodea una lesión pre-maligna como el DCIS (discutido en Unger & Weaver, 2003) es normal, pero realmente no lo es. En realidad este estroma muestra características de una herida, con trans-diferenciación de FBs, infiltración de células inmunes y de ECs, e importantes alteraciones en la ECM, una red de proteínas compuesta mayormente de colágenos, LMs y proteoglicanos (Unger & Weaver, 2003). Los cambios en la composición y organización de la ECM incluyen la expresión de FN y TN (Ioachim et al., 2002), y todo esto lleva a importantes cambios arquitectónicos que modifican las propiedades

mecánicas y bioquímicas de un tejido, características de un estroma reactivo. Interesantemente, varios investigadores han mostrado que un estroma reactivo puede inducir el comportamiento maligno de MECs normales (Figura A; de Barcellos-Hoff & Ravani, 2000).

Los cambios en los patrones de expresión de integrinas son un fenómeno que ha sido ampliamente documentado en la transformación maligna, y consistentemente con la expresión de FN y TN, tanto los cánceres de mama in vivo como las líneas celulares tumorales mamarias in vitro expresan sus receptores: los heterodímeros $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta(x)$ (discutido en Brakebusch et al., 2002; Jia et al., 2004).

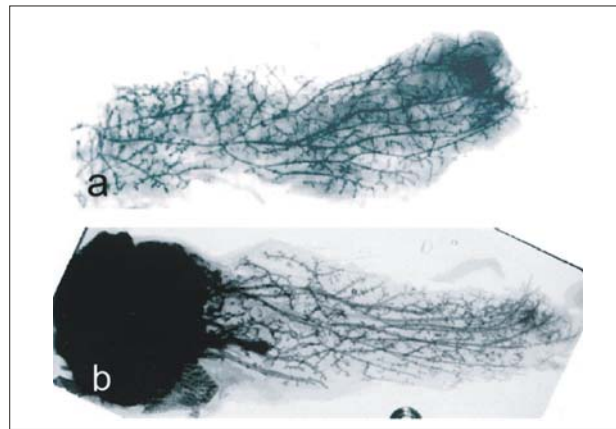


Figura A: El estroma reactivo promueve el comportamiento maligno de MECs alteradas genéticamente

Fotomicrografía de MECs COMMA-D crecidas en la almohadilla de grasa mamaria vaciada de MECs (cleared mammary fat pad) control (arriba) o irradiado (para inducir una respuesta desmoplástica; abajo). Obsérvese como las MECs crecidas en la almohadilla de grasa control dan lugar a estructuras mamarias normales, mientras que las células implantadas en la almohadilla de grasa irradiada dan lugar a grandes tumores. Figura de Barcellos-Hoff et al, 2000.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el rol de las interacciones célula- ECM en la supervivencia y en el fenotipo invasivo y migratorio observados en la transición de un DCIS a un carcinoma invasivo.

Con este propósito, utilizamos las células pre-malignas S3-C del modelo de progresión de cáncer de mama HMT-3522 que hemos descrito en el Capítulo 1 de estas Tesis, en combinación con ensayos 3DrBM, co-cultivos 3D con ECs y manipulaciones in vivo.

Resultados

La transformación maligna se encuentra asociada a la pérdida del control del crecimiento y a la disrupción de la morfología tisular

Las células no malignas S1 crecidas en 3D rBM forman estructuras acinares arrestadas en su crecimiento (tinción negativa para Ki-67), con actina cortical, interacciones célula- célula estables (expresión polarizada de β -catenina) y deposición de una BM polarizada basalemente, representada aquí por la tinción del colágeno de tipo IV, recapitulando la morfología de las MECs in vivo. Las células tumorales T4-2, por el contrario, forman estructuras desorganizadas, no polarizadas e invasivas, que no se encuentran arrestadas en su crecimiento y que exhiben una deposición errática de

proteínas de la ECM. En contraste, nuestros datos indicaron que las células pre-malignas S3-C poseían un comportamiento intermedio entre estas dos; con pérdida de la polaridad basal y del control del crecimiento, pero sin ser invasivas ni tumorigénicas en ratones (Figuras 1A y 1B).

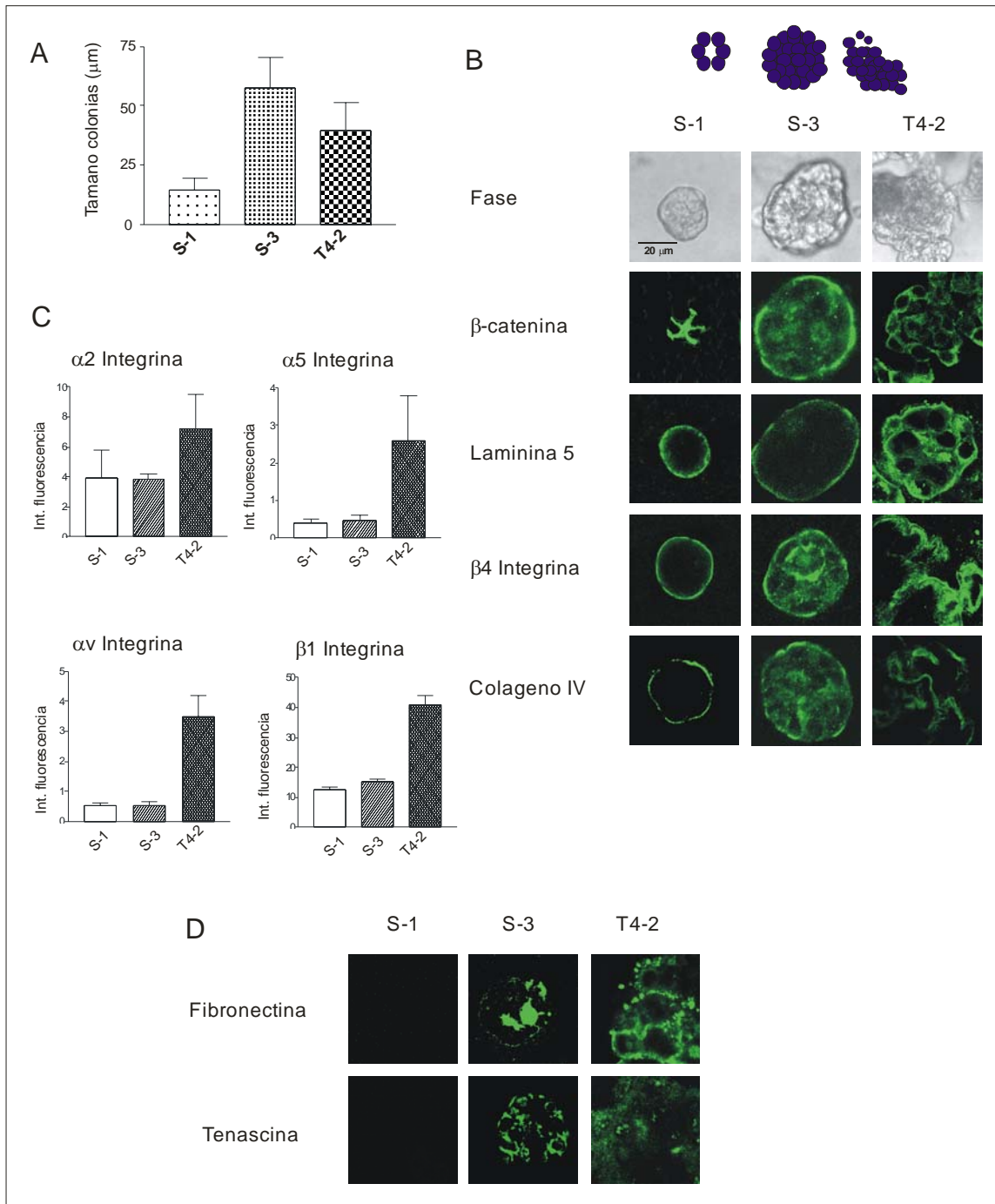
Las células pre-malignas S3-C no expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ pero depositan su ligando FN

Los perfiles de expresión de integrinas obtenidos por FACS (Figura 1C) e inmunofluorescencia (datos no mostrados) demostraron que, de manera similar a lo que ha sido reportado para cánceres de mama primarios y metastáticos, la expresión de integrinas también se encuentra alterada en esta serie de células. En particular, las células tumorales T4-2 exhiben niveles elevados de integrinas $\alpha 5$ y αv (subunidades presentes en los receptores “asociados a heridas”) comparados con las células nomalignas S1 y las pre-malignas S3-C.

Consistentemente con la regulación positiva de receptores asociados a heridas, encontramos que la transformación maligna también estaba asociada con la expresión elevada de las proteínas del estroma reactivo FN y TN (Figura 1D). Tanto las células premalignas como las tumorales exhibieron altos niveles de expresión de FN y TN por inmunofluorescencia, mientras que la expresión de estas proteínas de la ECM por las células no malignas S1 fue insignificante.

Figura 1. La transformación maligna se encuentra asociada a la pérdida del control del crecimiento y la polaridad, y a la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αv y de sus ligandos FN y TN

A. El tamaño de las colonias de células S1, S3-C y T4-2 en cultivo 3D rBM (12 ds) fue medido bajo un microscopio de contraste de fase y representado en un histograma. B. Fila superior: Fotomicrografías de contraste de fase mostrando las diferencias en el tamaño de las colonias y la arquitectura de las células no-malignas S1, pre-malignas S3-C y tumorales T4-2. Resto del panel: Inmunofluorescencia para marcadores de polaridad: β -catenina, LM5, integrina $\beta 4$ y colágeno tipo IV. Obsérvese la pérdida de polaridad a medida que las MECs progresan hacia la malignidad. C. Expresión de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 5$, αv y $\beta 1$ medida por FACS (intensidad de fluorescencia) en células S1, S3-C y T4-2. Las únicas células que expresan altos niveles de integrina $\alpha 5$, αv y $\beta 1$ son las T4-2, mientras que todas las células (S1, S3-C y T4-2) expresan niveles similares de la integrina $\alpha 2$. D. Inmunofluorescencia para las proteínas del estroma reactivo: FN y TN en cultivos 3D rBM (12 ds) de células S1, S3-C y T4-2.



La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ aumenta la migración y la invasión inducida por EGF de las células pre-malignas S3-C

Previamente demostramos que bloqueando la función de la integrina $\beta 1$ podíamos revertir el fenotipo tumoral de las células T4-2 (Weaver et al., 1997). Debido a que nuestros experimentos demostraron que la integrina $\alpha 5$ se encontraba sobre-expresada en las células tumorales pero no en las células pre-malignas, nos preguntamos si la estimulación de la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ – FN podría inducir la transformación maligna de las células S3-C. Para evaluar esta posibilidad, decidimos expresar la integrina $\alpha 5$ en las células pre-malignas S3-C (células S3-C $\alpha 5$), las que ya expresan su ligando FN. Logramos esto gracias a la expresión retroviral del gen de la integrina $\alpha 5$ unido a la “enhanced green fluorescent protein” (eGFP), utilizando como control un vector retroviral expresando únicamente eGFP (células S3-C eGFP). Mientras que la expresión de la integrina $\alpha 5$ no tuvo efectos significativos sobre el crecimiento de estas células tanto en 2D como en 3D (datos no mostrados), la adhesión a y el “spreading” en FN aumentaron significativamente en células expresando la integrina $\alpha 5$ (Figura 2A). Cuando las células fueron inducidas a migrar en el ensayo de cicatrización de herida (Figura 2B) así como a invadir a través de una membrana recubierta de rBM por estimulación con EGF (Figura 2C), pudieron hacerlo a un nivel significativo sólo las células que expresaban la integrina $\alpha 5$. Las células S3-C eGFP no fueron capaces de

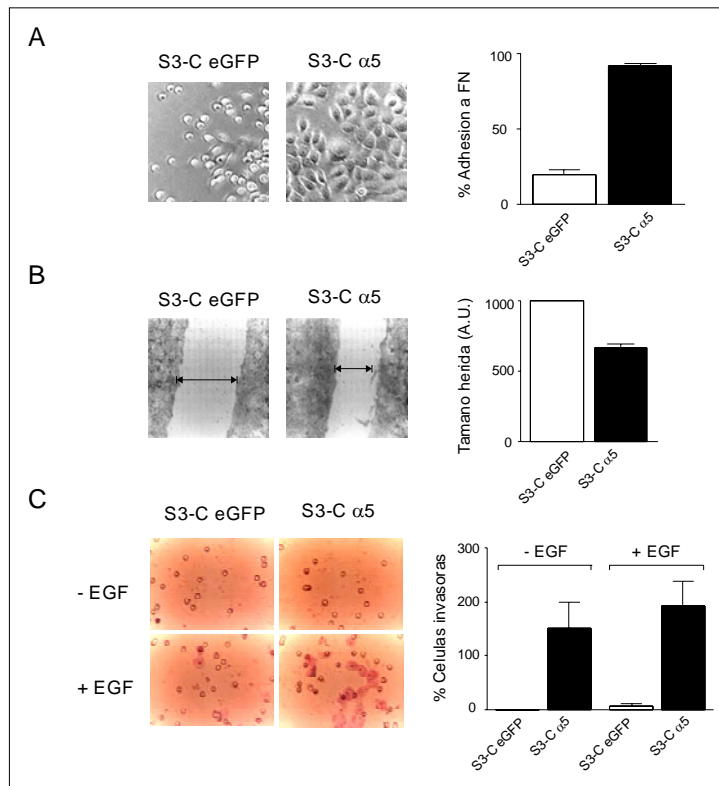


Figura 2. Las células S3-C expresando la integrina $\alpha 5\beta 1$ demuestran un aumento en su capacidad migratoria e invasiva

A. Izquierda: Fotomicrografías de contraste de fase de las células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$ cultivadas sobre FN, mostrando un aumento en la adhesión a y el spreading sobre FN de las células S3-C $\alpha 5$. Derecha: Cuantificación de la adhesión a FN por las células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$. B. Ensayo de migración. Izquierda: Fotomicrografías de contraste de fase de células teñidas con azul de coomasie en el ensayo de migración de cicatrización de herida, luego de 8 hr de incubación. Derecha: Gráfico cuantificando la migración celular. C. Arriba: Fotomicrografías de contraste de fase de células que invadieron a través de una cámara de Boyden recubierta de rBM, teñidas con azul de toluidina, en ausencia (arriba) o presencia (abajo) de EGF (20 ng/ml). Abajo: Cuantificación del porcentaje de células que invadieron a través de los filtros recubiertos de rBM.

migrar o invadir la rBM a un nivel significativo, ya fuera en presencia o en ausencia de EGF (Figuras 2B y 2C).

La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ permite el crecimiento independiente de anclaje de las células pre-malignas S3-C

Los resultados previos fueron confirmados por el ensayo del agar blando, en el que la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5$ confirió a las células pre-malignas la capacidad de crecer independientemente de anclaje (Figura 3A). Más aún, la pre-incubación de las células S3-C $\alpha 5$ con un Ab bloqueante de función de la integrina $\alpha 5$ (pero no un Ab bloqueante de integrina $\alpha 2$) abolió este efecto (Figura 3B), sugiriendo que la expresión de la integrina $\alpha 5$ podría estar correlacionada con la adquisición de la capacidad tumorigénica.

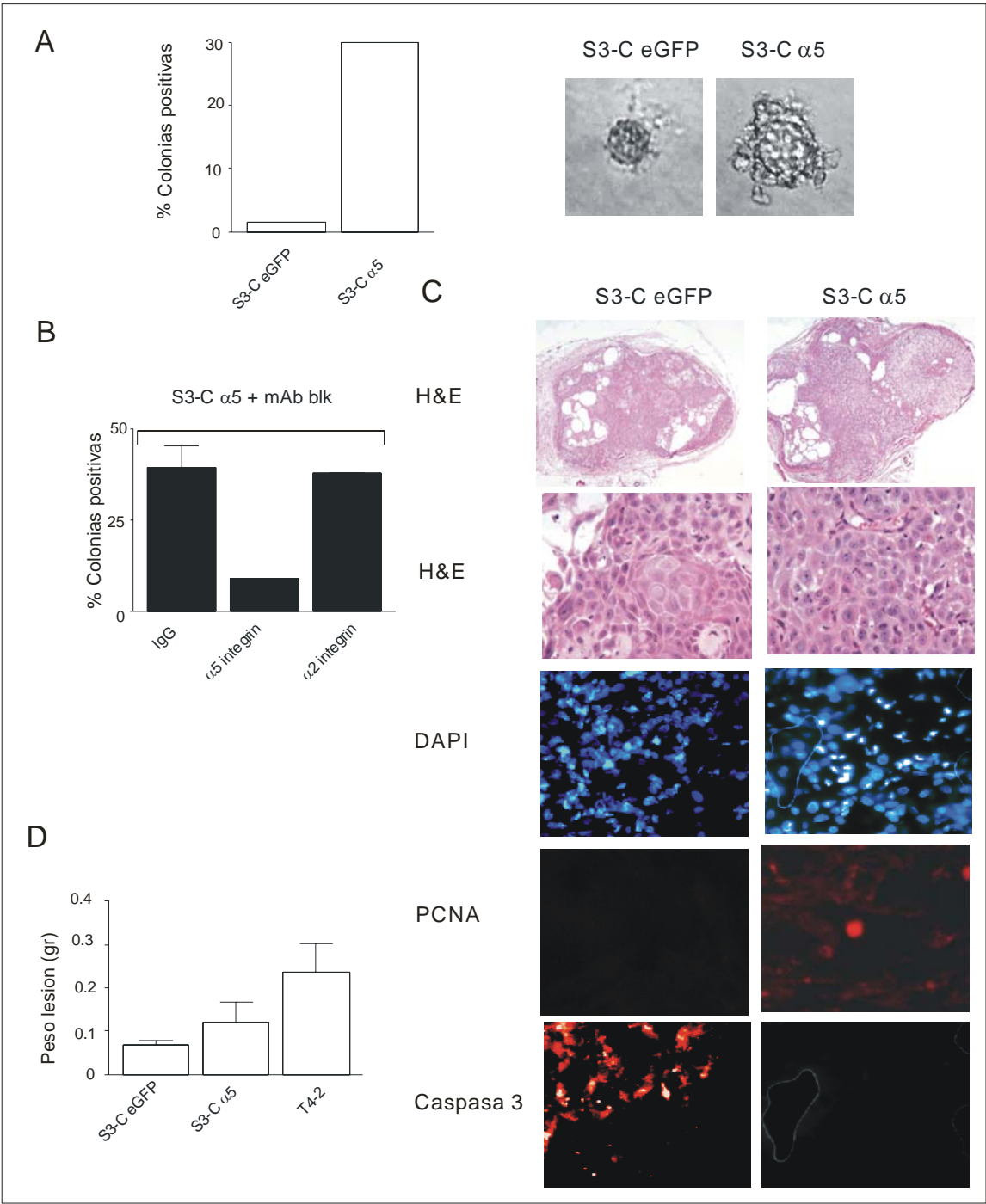
Las células pre malignas S3-C expresando la integrina $\alpha 5\beta 1$ forman tumores in vivo

Para confirmar la capacidad transformadora de la estimulación de la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ -FN, inyectamos células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$ s.c. en ambos flancos de ratones BALB/c nude. Debido a que las células S3-C tardan demasiado tiempo para dar lugar a masas celulares significativas en ratones, y a que estas células no forman tumores invasivos in vivo, inyectamos las células junto con matrigel para incrementar las

posibilidades de su crecimiento in vivo. Mientras que las células S3-C eGFP dieron lugar a masas celulares acompañadas de una importante necrosis, tinción negativa para PCNA (no proliferativas) y tinción positiva para caspasa 3 (apoptóticas), las células S3-C $\alpha 5$ formaron tumores proliferativos y de mayor tamaño, sin signos apreciables de necrosis, tinción positiva para PCNA y tinción negativa para caspasa 3, asemejando lo observado para los tumores invasivos formados por las células T4-2 in vivo (Figuras 3C y 3D) (compárese también con la Figura 6 del Capítulo 1 de esta Tesis).

Figura 3. Las células S3-C expresando la integrina $\alpha 5\beta 1$ adquieren características de malignidad

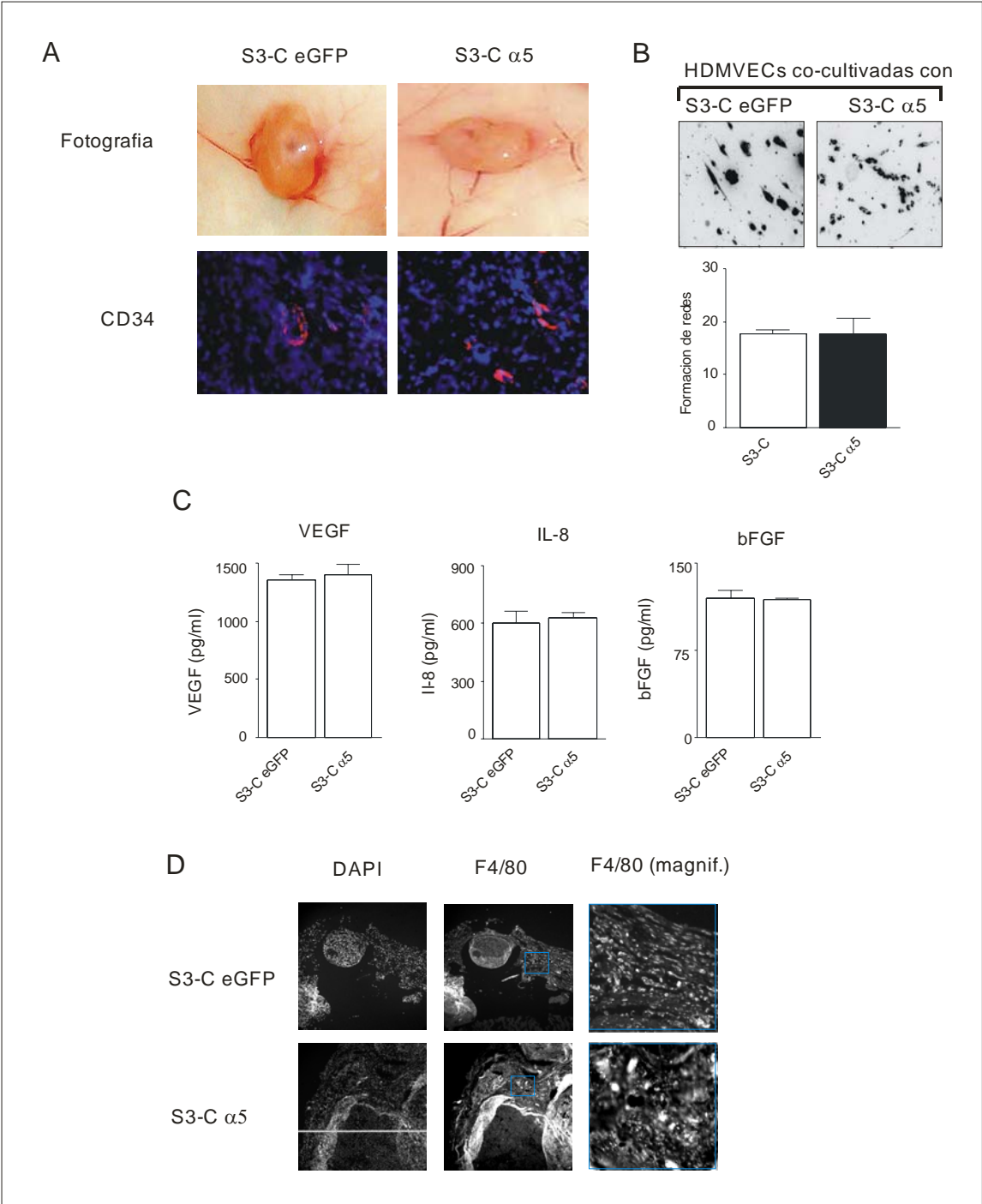
A. Izquierda: Histograma mostrando el porcentaje de colonias positivas ($>40 \mu\text{m}$) que crecieron luego de 21 días de cultivo de células S1, S3-C eGFP, S3-C $\alpha 5$ y T4-2 en agar blando. Derecha: Fotomicrografías de contraste de fase de células S3-C control (S3-C eGFP) y células expresando la integrina $\alpha 5$ (S3-C $\alpha 5$) creciendo en agar blando a los 21 días de cultivo. B. Histograma mostrando el porcentaje de colonias positivas ($>40 \mu\text{m}$) que crecieron luego de 21 días de cultivo de células S1, S3-C eGFP, S3-C $\alpha 5$ y T4-2 en agar blando en presencia o ausencia de Abs bloqu coastas de función de las integrinas of $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 2$ y αv . Las células S1 fueron utilizadas como control. C. Las células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$, junto con matrigel, fueron inoculadas en ambos flancos de ratones hembra Balb/c nu/nu de 4-6 semanas y el tamaño de los tumores fue medido por un período de dos meses. Luego de este período, los tumores fueron extirpados y subsecuentemente fijados en 4% PFA y embebidos en parafina. Filas superiores 1 y 2: tinción de H&E de secciones de parafina de tumores derivados de las células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$. Obsérvese la importante necrosis en las lesiones derivadas de las células S3-C eGFP. Filas 3 a 5: Inmunohistoquímica mostrando la tinción con DAPI (núcleos, azul), PCNA (células proliferativas, rojo) y caspasa 3 activada (células en apoptosis, rojo). Mientras que las lesiones derivadas de las células S3-C eGFP son no proliferativas y muestran importantes signos de apoptosis, los tumores derivados de las células S3-C $\alpha 5$ se encuentran proliferando activamente y no muestran signos de apoptosis. D. Peso de los tumores al momento de la excisión.



Coincidentemente con el aumento de la supervivencia in vivo, observamos un aumento de la respuesta angiogénica asociado a la actividad de la integrina $\alpha 5\beta 1$, similar a la observada en tumores control de células T4-2 (Figura 4A). Pero los resultados obtenidos en el ensayo de angiogénesis in vitro no fueron capaces de reproducir las observaciones hechas in vivo. Las células S3-C $\alpha 5$ indujeron una respuesta angiogénica similar (promedio de formación de redes de ECs co-cultivadas con MECs) a las células control S3-C eGFP (Figura 4B). Más aún, la expresión de la integrina $\alpha 5$ por las células S3-C no fue capaz de inducir diferencias en el patrón de expresión de distintas moléculas pro-angiogénicas cuantificadas por ELISA (los niveles de VEGF, IL-8 o bFGF en el CM fueron los mismos, sin importar los niveles de expresión de la integrina $\alpha 5$ en estas células; Figura 4C).

Figura 4. La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ no afecta la capacidad angiogénica in vitro de las células S3-C

A. Arriba: Fotografías de tumores derivados de las células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$ - mostrando el aumento del número de vasos sanguíneos en los segundos. Abajo: Immunohistouímica mostrando la tinción para CD34 (rojo) de los vasos sanguíneos en estas mismas muestras (se utilizó DAPI para teñir los núcleos, azul). B. Fotomicrografías mostrando la invasión del gel de colágeno por las HDMVECs co-cultivadas con células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$; los mismos resultados se obtuvieron con las células iHUEC2A. Las MECs fueron crecidas en 3D rBM dentro de una cámara de Boyden (12 ds) y luego estos transwells fueron transferidos a placas de 24 hoyos donde monocapas semi confluentes de HDMVECs o iHUEC2As habían sido cubiertas con un gel de colágeno de tipo I (1 mm grosor). Luego de 2 días, los geles de colágeno conteniendo ECs que habían migrado e invadido fueron fijados en 4% PFA, teñidos con 0.1% azul de toluidina y montados en un portaobjetos para obtener fotomicrografías. La formación de redes por las ECs en las diferentes condiciones experimentales fue analizada utilizando el software Scion Image, esqueletonizando las fotos de las redes de ECs. Para cada set de datos se obtuvieron la media y el SD. C. Cuantificación de los niveles de VEGF, IL-8 y bFGF (pg/ml) en el CM (48 hr) de cultivos 3D rBM (12 ds) de células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$ obtenidos por ELISA. D. Inmunohistoquímica para visualizar la infiltración por macrófagos en las lesiones derivadas de las células S3-C eGFP (muy baja tinción para F4/80) y en los tumores derivados de las células S3-C $\alpha 5$ (alta infiltración, tinción de F4/80 intensa).



Como tantas otras metaloproteinasas de matriz, el uPA es expresado por las células estromales en algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Previamente se ha demostrado que los miofibroblastos son abundantes en el tejido tumoral mamario. Estos se originan por diferenciación de fibroblastos, probablemente inducida por citoquinas producidas por las células tumorales. El trabajo de Nielsen et al (1996) sugirió que los miofibroblastos, a través de la producción de uPA, poseerían un rol activo en la invasión del cáncer de mama (Nielsen et al., 1996).

Estudios recientes demostraron que los niveles de uPA y PAI-1 en el cáncer de mama se correlacionan con un riesgo aumentado de menor supervivencia libre de relapso y de un menor tiempo de supervivencia en general; y el hecho de que los activadores del plasminógeno sean indispensables para la formación de tubos en las células microvasculares y que podrían inducir angiogénesis in vivo sugiere fuertemente un rol para el uPA y el PAI- 1 en la neovascularización tumoral. Debido a que los macrófagos y las células tumorales producen uPA, Hildenbrand et al (1995) postularon que podría existir una colaboración entre las células tumorales y los macrófagos asociados al tumor (TAMs). Estos autores encontraron una correlación positiva entre densidad de microvasos, invasión vascular, niveles de uPA, contenido de macrófagos y tasa de proliferación (Hildenbrand et al., 1995).

Condeelis y colegas (2005) demostraron que los macrófagos y las células tumorales son co- migratorios en tumores mamarios, y que estos tipos celulares son mutuamente dependientes para la invasión. Este proceso involucraría un loop paracrino incluyendo colony stimulating factor 1 (CSF-1) y EGF (Goswami et al., 2005). Los macrófagos expresan EGF, el cual promueve la invasión de las células de carcinoma, y a su vez el CSF-1 producido por las células tumorales promueve la expresión de EGF por los macrófagos. Más aún, el EGF promueve la expresión de CSF-1 por las células tumorales, generando así un feedback positivo. La disrupción de este loop por bloqueo de la señalización vía el EGFR o el CSF-1R es suficiente para inhibir la migración e invasión tanto de los macrófagos como de las células tumorales.

Los macrófagos concentran uPA en su superficie por medio de la expresión de uPAR, para localizar la proteólisis dependiente del plasminógeno (importante en la remodelación de la matriz y el movimiento celular) en el espacio pericelular. Hildenbrand et al (1999) demostraron que los TAMs derivados de carcinomas de mama invasivos y de DCISs poseían niveles significativamente elevados de uPAR comparados con macrófagos derivados de tejido mamario normal (Hildenbrand et al., 1999). Estos autores concluyeron que los macrófagos activados que poseen niveles elevados de uPAR pertenecerían a áreas de inflamación muy cercanas a las células tumorales infiltrantes o no infiltrantes (DCIS). Los monocitos presentes en la sangre que expresan niveles de uPAR elevados podrían ser reclutados selectivamente del torrente sanguíneo a sitios de inflamación cercanos a las células tumorales, y/o los cánceres de mama y lesiones

precursoras podrían inducir la sobre-expresión de uPAR en los TAMs por interacciones paracrinas.

Por lo tanto, en un intento de explicar el diferente fenotipo in vivo de las células S3-C eGFP versus las células S3-C $\alpha 5$, decidimos estudiar la infiltración de macrófagos en las distintas muestras tumorales. Nuestros resultados demostraron que efectivamente, los tumores generados a partir de las células S3-C $\alpha 5$ poseían una mayor infiltración de macrófagos al ser comparados con las lesiones formadas por las células S3-C eGFP.

La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ induce la expresión de flt-1

Los resultados anteriores no lograron explicar la observación de que las células S3-C $\alpha 5$ mostraran una supervivencia aumentada en el ensayo de agar blando.

Para determinar cuál podría ser el factor involucrado en el aumento de la supervivencia, la invasión y la formación de mayores tumores in vivo por las células pre-malignas S3-C expresando la integrina $\alpha 5$ con respecto a las células S3-C control, decidimos evaluar la expresión de la isoforma del VEGFR que se ha reportado previamente en MECs: VEGFR-1/flt-1. Encontramos que mientras las células control S3-C eGFP no expresaban niveles detectables de flt-1 en su superficie, la expresión de la integrina $\alpha 5$ en estas células indujo la expresión de este receptor por las células S3-C $\alpha 5$.

Así, el aumento de la supervivencia observado en las células S3-C α 5 podría deberse a un loop autocrino de supervivencia vía la interacción VEGF-flt-1.

El bloqueo de flt-1 inhibe la supervivencia de las células S3-C α 5 en agar blando

Para evaluar la posibilidad de que el aumento de la supervivencia de las células S3-C α 5 pudiera estar mediado por interacciones VEGF-flt-1, diseñamos un ensayo de crecimiento independiente de anclaje en presencia de flt-1 recombinante (rflt-1), el cual se demostró que inhibe la interacción entre VEGF y flt-1 en la superficie celular (Goldman et al., 1998). Consistentemente, la adición de rflt-1 al agar blando inhibió el crecimiento independiente de anclaje de las células S3-C α 5 (Figura 5C). Más aún, el bloqueo de la interacción flt-1/ VEGF por agregado de rflt-1 fue suficiente para disminuir la capacidad de las células tumorales T4-2 de crecer y sobrevivir independientemente de anclaje (Figura 6A). De la misma manera, cuando las células T4-2 fueron cultivadas en 3DrBM en presencia de rflt-1, esto fue suficiente para revertir el fenotipo tumoral a un estado “durmiente”, similar al alcanzado por la inhibición del EGFR (tratamiento con Tyrphostin) (Figura 6B), indicando que esta vía también podría estar involucrada en el mantenimiento del fenotipo de las células tumorales.

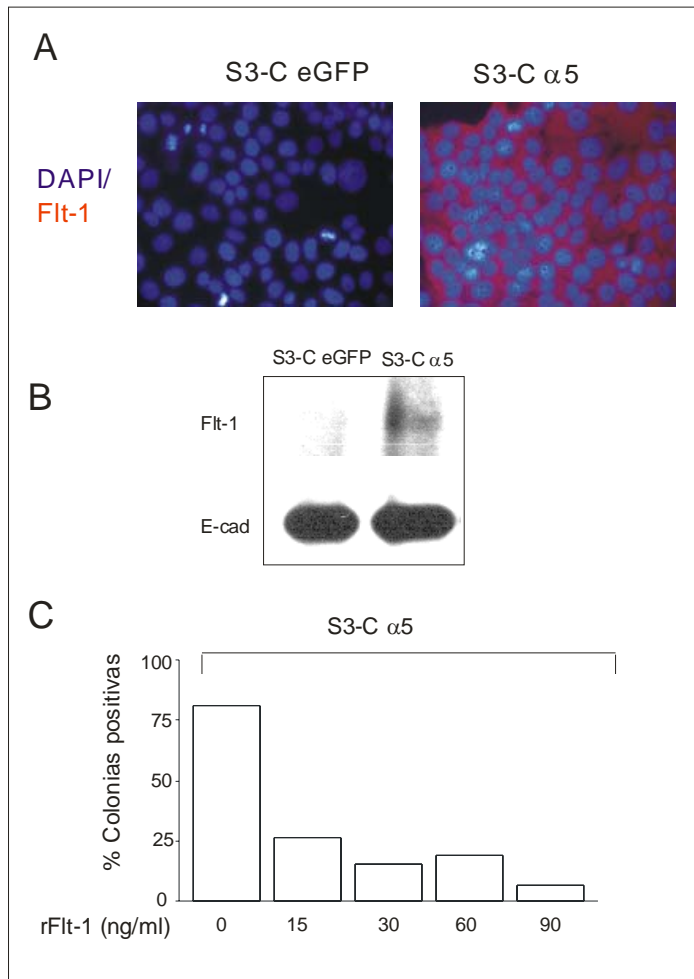


Figura 5. La expresión de la integrina $\alpha 5$ induce la expresión de flt-1 en células S3-C

A. Inmunofluorescencia para flt-1 en células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$ cultivadas en monocapa 2D, mostrando un aumento significativo de la expresión de flt-1 por las células S3-C $\alpha 5$. B. Inmunoblot mostrando niveles protéicos de flt-1 significativamente mayores en lisados de las células S3-C $\alpha 5$ que en las células control S3-C eGFP. C. Histograma mostrando el porcentaje de colonias positivas (>40 μm) que crecieron luego de 21 días de cultivo de células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$ en presencia de diferentes concentraciones de flt-1 recombinante (rflt-1) utilizado para la inhibición de la interacción flt-1-VEGF. Como se muestra en el gráfico, el bloqueo de la interacción flt-1-VEGF inhibe la habilidad de las células de sobrevivir y crecer independientemente de anclaje.

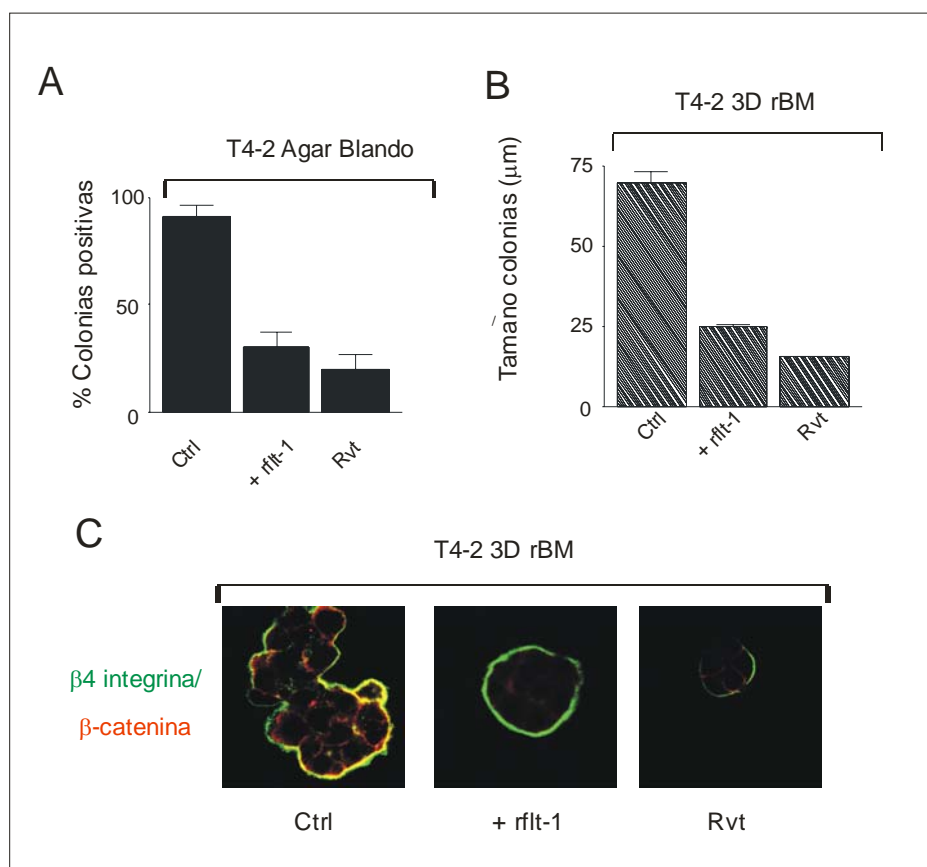


Figura 6. La interacción VEGF-flt-1 está involucrada en el mantenimiento del fenotipo maligno de las células tumorales T4-2

A. Histograma mostrando el porcentaje de colonias positivas (>40 μm) que crecieron luego de 21 días de cultivo de células T4-2 en agar blando en presencia de diferentes concentraciones de flt-1 recombinante (rflt-1) utilizado para inhibir la interacción flt-1-VEGF. Como se muestra en el gráfico, la inhibición de la interacción flt-1-VEGF es suficiente para disminuir la capacidad de las células tumorales de crecer y sobrevivir independientemente de anclaje. B. El tamaño de las colonias de células T4-2 control (Ctrl), tratadas con rflt-1 (+ rflt-1) y tratadas con Tyrphostin (Rvt) en cultivo 3D rBM (12 ds) fue medido bajo un microscopio de contraste de fase y representado en un histograma. B. Immunofluorescencia para marcadores de polaridad: integrina β4 (verde) y β-catenina (rojo) en células T4-2 control (Ctrl), tratadas con rflt-1 (+ rflt-1) y tratadas con Tyrphostin (Rvt) en cultivos 3D rBM (12 ds).

La interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN induce la sobre-expresión de flt-1 al estimular la activación de ERK inducida por VEGF

Se sabe que las integrinas activan múltiples vías de señalización, y que a su vez son requeridas para la óptima activación de los receptores de factores de crecimiento. Previamente demostramos que el “cross-talk” entre la integrina $\beta 1$ y el EGFR a través de PI3K y ERK influencia el crecimiento tumoral, la supervivencia y la pérdida de polaridad. Más aún, el bloqueo de cualquiera de estas moléculas induce la reversion del fenotipo tumoral a un estado durmiente. Basándonos en estos datos, nos preguntamos si la activación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría inducir la expresión o el aumento de actividad de flt-1 a través de la estimulación de las mismas vías de señalización.

El tratamiento con VEGF (40 ng/ml), indujo la activación de ERK (expresado como la isoforma fosforilada) en las células S3-C $\alpha 5$, mientras que no demostró ningún efecto sobre las células S3-C eGFP. La estimulación con VEGF no afectó la actividad de AKT en ninguna de las células estudiadas. Por lo tanto, la vía de señalización MEK/ERK estaría involucrada en el mantenimiento del loop de supervivencia autócrino mediado por la inducción de la expresión de flt-1 por la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN. Para comprobar si esta vía de señalización afectaba los niveles de expresión de flt-1, pre-incubamos las células S3-C $\alpha 5$ con inhibidor de PI3K o MEK y analizamos los niveles de flt-1. Este tratamiento no afectó los niveles protéicos de flt-1 (datos no mostrados), sugiriendo que ERK estaría siendo estimulado por la interacción flt-1-VEGF.

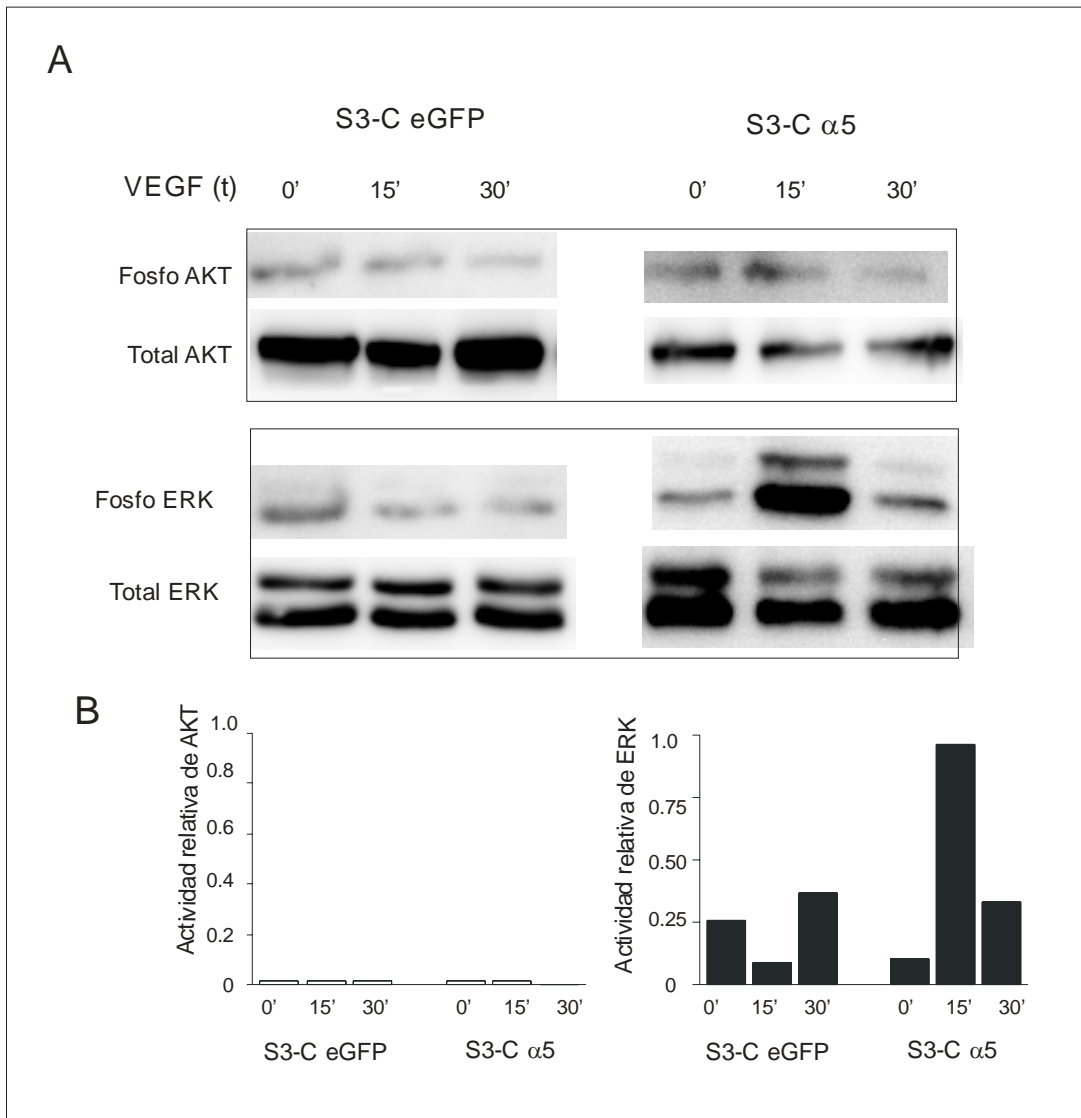


Figura 7. Las células S3-C $\alpha 5$ inducen la expresión de *flt-1* via la activación de Akt y ERK inducida por VEGF

A. Activación de AKT y ERK en células S3-C eGFP y S3-C $\alpha 5$ estimuladas con VEGF (40 ng/ml). Inmunoblot representativo de AKT y ERK fosforilados y totales. B. La actividad específica relativa de AKT y ERK a los 0, 15 y 30 min de estimulación con VEGF fue calculada por análisis densitométrico de los inmunoblots, dividiendo los valores de las formas activadas (fosforiladas) de AKT o ERK por los valores de AKT o ERK totales, respectivamente luego de normalizarlos con respecto a los de E-cadherina.

Discusión

En este Capítulo demostramos que la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células pre-malignas S3-C indujo su transformación maligna. Gracias a la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ utilizando un vector retroviral, células pre-malignas que previamente no expresaban esta integrina, pero sí su ligando FN (Figura 1) adquirieron la capacidad de migrar e invadir la rBM (Figura 2) y crecer y sobrevivir independientemente de anclaje (Figura 3), todas características de la transformación maligna. Esto fue también confirmado in vivo. Mientras que la inyección de células control S3-C eGFP en ratones nude dio lugar a masas celulares no proliferativas y apoptóticas, acompañadas de importante necrosis, las células S3-C $\alpha 5$ dieron lugar a tumores de mayor tamaño, proliferativos y no apoptóticos, con menores signos de necrosis, similares a los tumores invasivos obtenidos a partir de las células T4-2 (Figura 3). A pesar de que, semejante a lo observado en los tumores invasivos in vivo, los tumores de células S3-C $\alpha 5$ demostraron ser más angiogénicos que su contraparte control S3-C eGFP (Figura 4A), estos resultados no fueron consistentes in vitro (Figuras 4B y C). Por lo tanto, el aumento de la capacidad angiogénica de las células S3-C $\alpha 5$ no explicaría su habilidad de sobrevivir y de dar lugar a tumores más agresivos y de mayor tamaño in vivo.

El carcinoma in situ es aceptado como una lesión premaligna, y la adquisición de la capacidad de invadir a través de la BM es un criterio clave de la definición de malignidad (discutido en Allred & Mohsin, 2000). Aquí demostramos que la expresión

de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células premalignas S3-C indujo su comportamiento migratorio e invasivo (Figura 2). La conversión a un fenotipo invasivo es diferente a las metástasis, pero es un requisito obligatorio para la formación de éstas, y por lo tanto representa un paso crucial en la progresión del cáncer. La identificación de las alteraciones moleculares necesarias para la transición del fenotipo pre-maligno al maligno podría generar marcadores clínicos de utilidad para la distinción entre lesiones benignas y aquellas con alta probabilidad de transformarse en malignas, así como aportar blancos moleculares funcionales relevantes para el tratamiento de estadios tempranos de cánceres de mama.

El VEGF-A es considerado el más fundamental regulador de la angiogénesis y la vasculogénesis (Neufeld et al., 1999), y su expresión ha sido demostrada en células tumorales de varios cánceres humanos, incluyendo el cáncer de mama. El VEGF induce significativamente la actividad de la vía MAPK/ERK, la cual presumiblemente posee un papel central en la estimulación de la proliferación de las ECs. La respuesta mitogénica inducida por el VEGF también podría involucrar el cross-talk entre las vías ERK y JNK (discutido en Neufeld et al., 1999; Zachary & Glikli, 2001). El cross-talk entre el sistema de integrinas y el VEGFR es de fundamental importancia en ECs adhiriendo a vitronectina (ligando para la integrina $\alpha v\beta 3$), y la estimulación por VEGF de la síntesis de DNA y de la proliferación celular mediadas por VEGFR2 se han observado en una gran variedad de ECs (Soldi et al., 1999). Más aún, la expresión de los VEGFRs flt-1 y KDR ha sido detectada en varios tipos de células no endoteliales, incluyendo células

malignas como células de carcinomas de mama, melanoma y carcinomas ovaricos, sugiriendo que el VEGF tendría un rol fisiológico en el cáncer, ejerciendo un efecto autocrino sobre las células malignas más allá de su rol en la angiogénesis (discutido en Arita et al., 2005). Por último, el *flt-1* ha sido correlacionado con un mayor riesgo de recurrencia local y de metástasis en pacientes con cáncer de mama (Dales et al., 2004).

Nosotros demostramos que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ induce la expresión del VEGFR *flt-1* en las células pre-malignas S3-C (Figura 5), y que la inhibición de la interacción VEGF-*flt-1* por medio de la adición de *rflt-1* a los cultivos no solo disminuyó la capacidad de las células S3-C $\alpha 5$ de crecer independientemente de anclaje (Figura 5), sino que también logro revertir el fenotipo tumoral de las células T4-2 en cultivo 3D rBM (Figura 6). Demostramos así que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN estaría involucrada en la transformación maligna del DCIS, y que esta interacción, en cooperación con el VEGFR activado podría contribuir al fenotipo maligno por medio del aumento de la supervivencia y la proliferación a través de vías de señalización dependientes de ERK (Figura 7), afectando así la arquitectura tisular (Figura B). Esto demuestra la importancia de las interacciones epitelio-estroma en la determinación del comportamiento normal o maligno de las MECs.

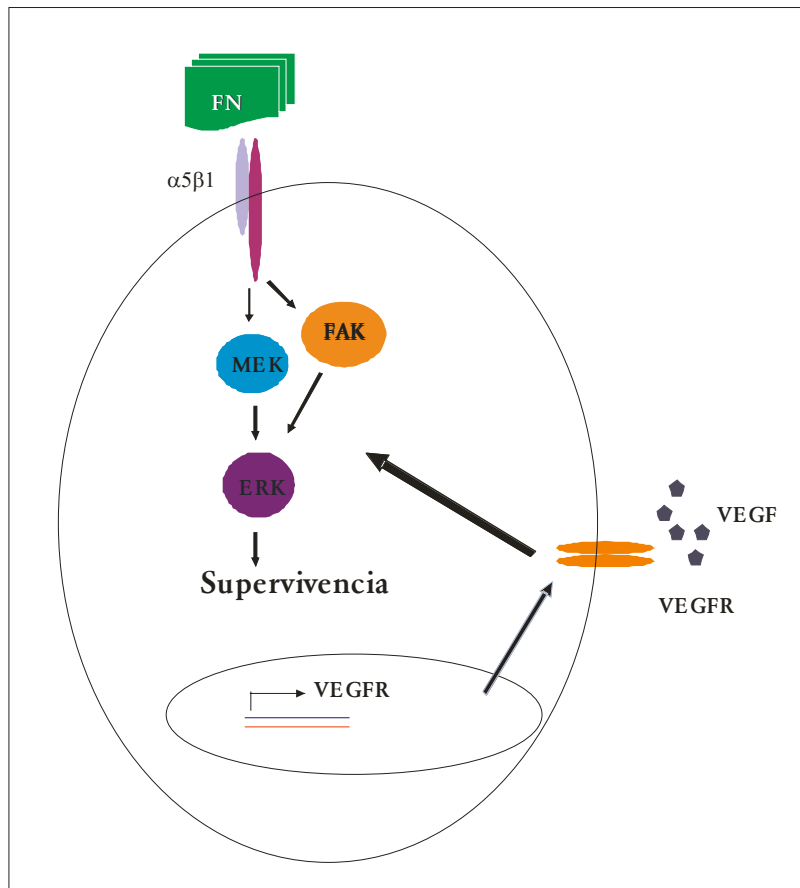


Figura B: Aumento de la supervivencia celular inducido por la expresión de la integrina $\alpha5\beta1$ vía un loop autocrino que involucra la interacción flt-1-VEGF

La interacción integrina $\alpha5\beta1$ -FN induce la expresión del VEGFR, el que podría participar en un loop autocrino de supervivencia a través de su interacción con VEGF llevando al aumento de la supervivencia de las células transformadas por medio de la estimulación de la vía de señalización MEK/ERK.

Capítulo 3

La dormición tumoral depende de interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN (-uPAR-uPA) que regulan el switch angiogénico

Introducción

La conversión de un tejido normal en uno canceroso frecuentemente tarda años en ocurrir. En particular, los tumores epiteliales pueden existir como lesiones pre-malignas por períodos prolongados de tiempo, y aun así solo una baja proporción de tumores benignos acaban transformándose en cánceres (Bergers & Coussens, 2000; Hwang & Esserman, 1999). Una vez formados, los tumores presentan un comportamiento generalmente errático, por lo que determinar una estrategia de tratamiento basada en los criterios clínicos actuales puede ser un desafío. Por ejemplo, algunos tumores pueden crecer e invadir agresivamente, mientras que tumores de grado similar pueden experimentar extensos períodos de “dormición” (Demicheli et al., 1997; Riethmuller & Klein, 2001; Tsao et al., 1997). Las metástasis tumorales y la respuesta a las drogas quimioterapéuticas son igualmente difíciles de predecir (Chambers et al., 2001; Hart, 1999; Kostler et al., 2000). Esta variabilidad comportamental, a pesar de similitudes en el fenotipo tumoral, demuestra que el cáncer es una enfermedad compleja regulada por

múltiples vías. A pesar de los avances hechos en los últimos años, la mayoría de las muertes por cáncer son debidas a metástasis resistentes a terapias convencionales (Fidler, 1990), las cuales son detectadas años luego del tratamiento del tumor primario, sugiriendo que estas células se encontraban en un estado de “dormición”. También se puede encontrar dormición tumoral en tejidos primarios (Tlsty, 2001; Udagawa et al., 2002), y este hecho ha sido documentado ampliamente por el descubrimiento generalmente accidental de cánceres primarios ocultos durante autopsias de individuos que no murieron de cáncer. De hecho, el 30% de mujeres sometidas a autopsias poseían cánceres de mama microscópicos. La dormición tumoral y la enfermedad metastásica son procesos altamente selectivos regulados por numerosos mecanismos, y la dormición tumoral podría constituir un aumento del riesgo para la emergencia de la enfermedad maligna. Por lo tanto, el entendimiento de cuáles son los factores que dirigen y mantienen la dormición tumoral sería crítico para la identificación de pacientes de alto riesgo y para desarrollar tratamientos que prevengan la recurrencia tumoral.

Se han realizado amplios esfuerzos para descifrar los factores que facilitan este estado no proliferativo de la enfermedad, pero aún no existen respuestas con respecto a cómo se logra alcanzar la dormición tumoral. Se ha sugerido que el equilibrio entre proliferación y muerte celulares sería tal vez un factor clave, pero existe falta de información acerca de los mecanismos moleculares que gobiernan la dormición tumoral. El cáncer es una enfermedad caracterizada por la pérdida de polaridad tisular, debido a cambios en las interacciones célula- célula y célula- ECM, y es ampliamente aceptado

que el microambiente tisular posee una importante función en la transformación maligna y las metástasis, así como en la respuesta a las terapias anti-cáncer. Las células interactúan con el microambiente mayormente a través de las integrinas, las que son heterodímeros compuesto de una subunidad alfa y una subunidad beta que reconocen diferentes ligandos presentes en la ECM y en la superficie de células adyacentes. Las integrinas son reguladores clave del crecimiento, la supervivencia, la adhesión, la invasión, las metástasis y la angiogénesis. Diferentes cánceres muestran alteraciones en los patrones de expresión de integrinas y en la composición de su ECM. De hecho, el estroma reactivo encontrado en tumores de mama y en otros tipos de tumores esta compuesto de grandes cantidades de FN y TN (Ioachim et al., 2002).

Previamente demostramos que la represión de la función de la integrina $\beta 1$ puede llevar a los tumores a un estado de dormición, afectando su habilidad de crecimiento in vivo (las células ya no son capaces de generar tumores en ratones nude- [(Weaver et al., 1997)]). Consistentemente con esto, Muller et al demostraron que el knock-out condicional de la integrina $\beta 1$ en las células epiteliales luminales de ratón previene la formación de tumores inducidos por middle T, y esto se encontraba asociado a una inhibición del crecimiento (Mueller & Fusenig, 2004). Otro factor que ha sido implicada en la dormición tumoral es la falta de angiogénesis; las células tumorales no angiogénicas pueden existir en los tejidos en estado durmiente por largos períodos de tiempo sin dar lugar a tumores. Un factor que aún no ha sido explorado es la posibilidad de que el microambiente tisular pudiera dirigir la dormición tumoral a través de la inducción de

vías que controlan la proliferación, polaridad y angiogénesis a partir de integrinas, por modulación de la arquitectura tisular.

Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue el de evaluar la hipótesis de que la modulación de la arquitectura tisular dependiente de integrinas poseería una función fundamental en la dormición tumoral al regular vías de señalización claves que sinergizarían para controlar la polaridad, el crecimiento, la supervivencia y la angiogénesis.

Para evaluar esta hipótesis utilizamos el modelo de progresión de cáncer de mama HMT-3522 en combinación con ensayos 3D rBM y co-cultivos de ECs y MECs, así como ensayos in vivo utilizando ratones BALB/c nude.

Resultados

La integrina $\alpha 5\beta 1$ y la dormición tumoral modulada por la arquitectura tisular

Una característica de los carcinomas invasivos es la pérdida de la arquitectura normal y el aumento de la proliferación y la supervivencia celulares. Utilizando el modelo de progresión de cáncer de mama HMT3522 y un ensayo organotípico de 3D rBM encontramos que la transformación maligna estaría asociada a la pérdida de interacciones célula- célula (tinción para β -catenina), la disrupción de la polaridad tisular

(tinción para integrina $\beta 4$, LM5, actina y colágeno tipo IV) y la pérdida del control de crecimiento (tinción para Ki-67); mientras que la reversión fenotípica de estos tumores por medio del bloqueo de la señalización a través de la integrina $\beta 1$, EGFR, PI3K o MEK se encontraría correlacionada con la reformación de estructuras polarizadas, no invasivas y arrestadas en su crecimiento (Figura 1 y Weaver et al., 1997). La transformación maligna se encontro asociada con la regulación positiva de las proteínas del estroma reactivo FN y TN, y sus niveles disminuyeron con la reversión fenotípica de los tumores (Figuras 1A y B). Esto sería consistente con la noción de que los cánceres de mama presentan perturbaciones en sus interacciones epitelio- estroma, y expresan niveles alterados de integrinas y proteínas de la ECM. En particular, las integrinas asociadas a heridas: $\alpha 5$ y αv , han sido implicadas en las metástasis tumorales mamarias. Por FACS y Western blot encontramos que las células tumorales T4-2 poseían altos niveles de expresión de las integrinas $\alpha 5$, αv y $\beta 1$ al compararlas con las células no malignas S1 a partir de las cuales se derivó esta línea celular (Figura 1C). La reversión fenotípica de las células tumorales disminuyo la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αv junto con la modulación negativa de la integrina $\beta 1$ (Figura 1D).

Aqui y en trabajos previos (Weaver et al., 1997) demostramos que el bloqueo de la función de la integrina $\beta 1$ podía revertir el fenotipo tumoral a un estado de dormición; pero debido a que la integrina $\beta 1$ es una subunidad altamente promiscua, el heterodímero $\alpha\beta$ podría ser uno entre varios. Para intentar definir cuál era la subunidad alfa

responsable de la reversión fenotípica inducida por el bloqueo de la integrina $\beta 1$ utilizamos Abs bloqueantes de función de diferentes subunidades α en los cultivos 3D rBM. Encontramos que mientras el bloqueo de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 4$ y αv ejercía poco o ningún efecto sobre el comportamiento de las células tumorales (las colonias formadas por estas células crecieron tanto como las células T4-2 control tratadas con IgG no específica), al bloquear la función de la integrina $\alpha 5$ obtuvimos el mismo efecto que el obtenido previamente por la reversión inducida por el bloqueo de la integrina $\beta 1$ (Figuras 2A y B). Más aún, sólo el bloqueo de las integrinas $\alpha 5$ o $\beta 1$ logró interferir con la habilidad de las células tumorales de crecer independientemente de anclaje (Figura 2C). Por lo tanto, la inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$ induciría el arresto del crecimiento y la formación de una estructura tisular polarizada, revirtiendo el fenotipo tumoral a un estado “durmiente”.

Figura 1. La transformación maligna se encuentra asociada a la pérdida del control del crecimiento, la desorganización de la morfología tisular y la expresión elevada de las integrinas $\alpha 5$ y αv , FN y TN. La reversión tumoral se encuentra asociada a la normalización de la expresión de estos receptores y de sus ligandos

A. Esquema superior: representación de la morfología de las células S1, T4-2 y T4-2 revertidas (T4 Rvt). Línea superior: Fotomicrografías de contraste de fase mostrando las diferencias en el tamaño de las colonias y la arquitectura de las células no-malignas S1, tumorales T4-2 y durmientes T4 Rvt (por bloqueo de la integrina $\beta 1$; los mismos resultados se obtuvieron con la inhibición de EGFR, PI3K o MEK). Resto del panel: Inmunofluorescencia para Ki-67 (estatus proliferativo de las células); marcadores de polaridad: actina, integrina $\beta 4$, β -catenina, LM5 y colágeno tipo IV; y las proteínas del estroma reactivo: FN y TN, utilizando Abs secundarios conjugados a ⁴⁸⁸AlexaFluor (verde). Obsérvese la diferencia significativa en el estatus proliferativo de las células S1 (arrestadas en su crecimiento, tinción negativa para Ki-67) y las células T4-2 (tinción positiva para Ki-67). Las células tumorales se encuentran no polarizadas y expresan altos niveles de FN y TN. Estas diferencias no se observan cuando las células T4-2 son crecidas en presencia del Ab bloqueante de la integrina $\beta 1$ (AIIB2, 20 $\mu\text{g/ml}$), Tyrphostin AG 1478 (200 nM), PD98059 (40 μM) o LY 294002 (50 μM) (Wang et al., 1998). Cada uno de estos tratamientos revirtió el fenotipo tumoral, llevando a las células a un estado durmiente polarizado (tinción negativa para Ki-67 de las células T4 Rvt). B. El tamaño de las colonias de células S1, T4-2 y T4 Rvt en cultivo 3D rBM (12 ds) fue medido bajo un microscopio de contraste de fase y representado en un histograma. C. Expresión de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 5$, αv y $\beta 1$ medida por FACS (intensidad de fluorescencia) en células S1, y T4-2. D. Izquierda: Western blot de lisados de proteínas obtenidas a partir de cultivos 3D rBM de células S1, T4-2 y T4 Rvt, mostrando como la reversión fenotípica por el bloqueo de la integrina $\beta 1$ en las células tumorales regula negativamente los niveles protéicos de las integrinas $\alpha 5$ y αv junto con la modulación negativa de la expresión de la integrina $\beta 1$. Derecha: Cuantificación de la expresión de la integrina $\alpha 5$ de un western blot representativo.

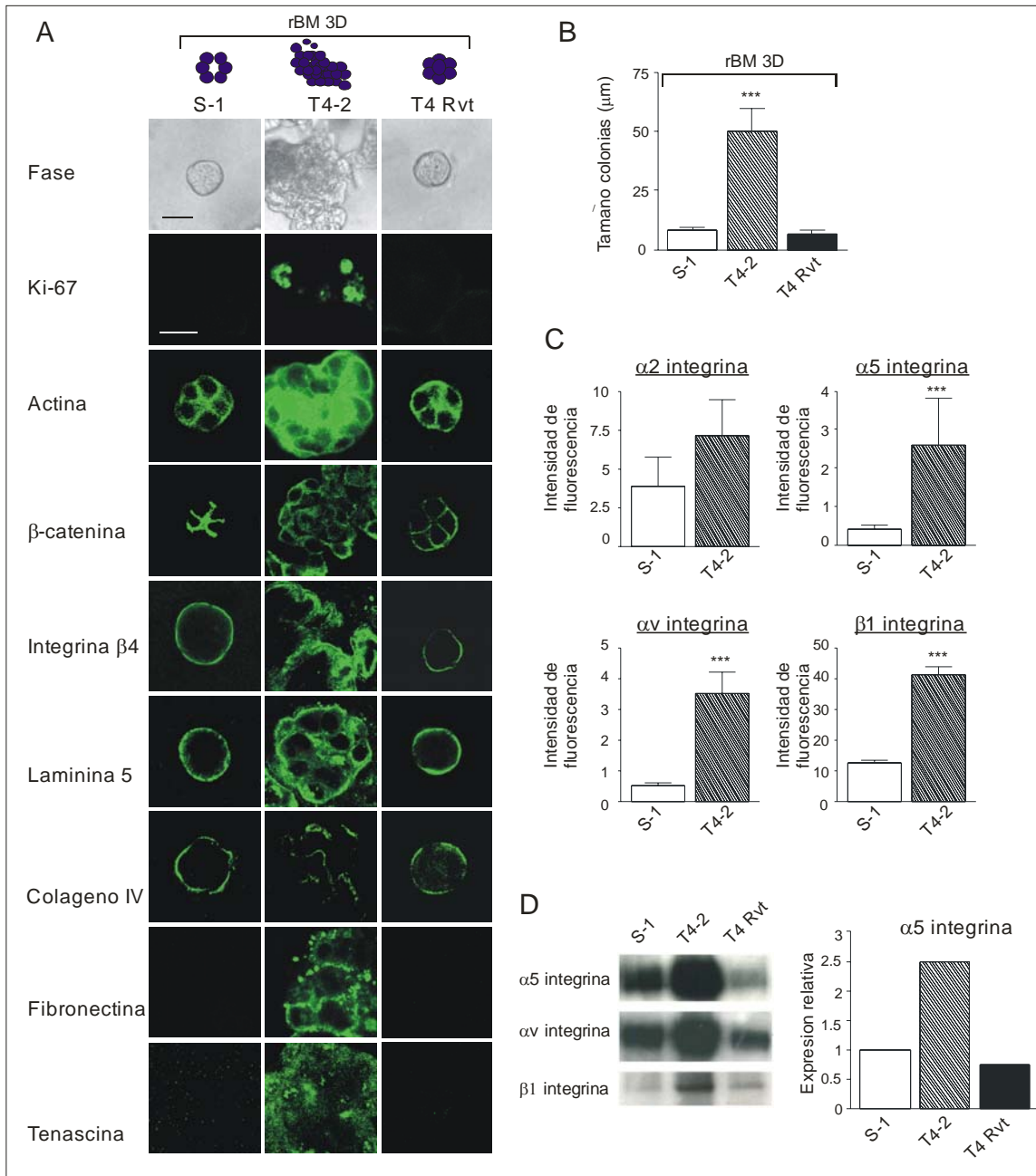
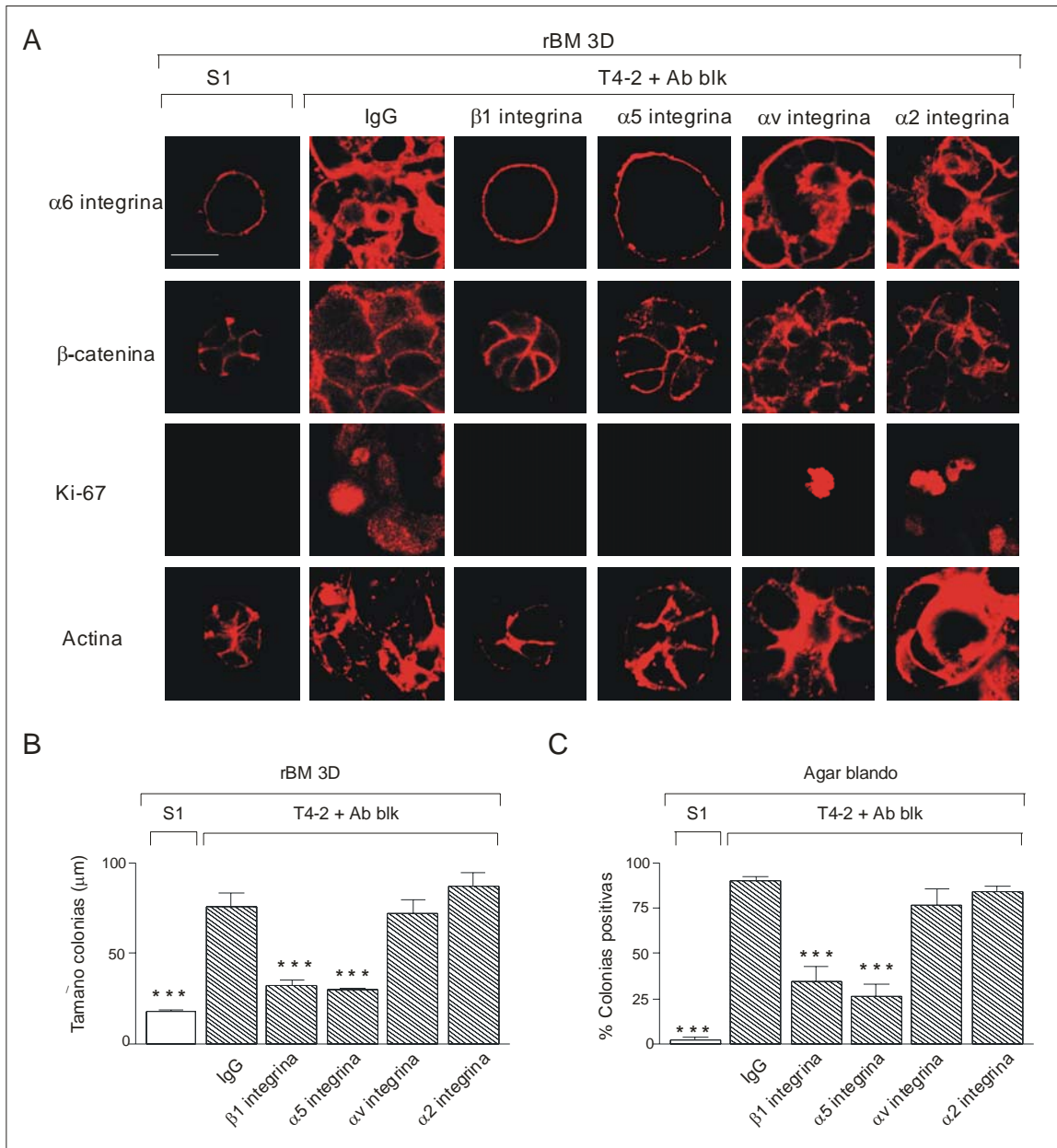


Figura 2. La inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$ induce la dormición tumoral y la reversión fenotípica in vitro

A. Inmunofluorescencia mostrando la restauración de la polarización (expresión de la integrina $\alpha 6$ y β -catenina) y el control del crecimiento (tinción para Ki-67) luego del tratamiento de las células tumorales T4-2 con Abs bloqueantes de las integrinas $\beta 1$ o $\alpha 5$, pero no por Abs bloqueantes de las integrinas $\alpha 2$ o αv . Las células T4-2 fueron cultivadas en 3D rBM por 12 días en presencia o ausencia de Abs bloqueantes de las integrinas $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 2$ y αv (20 $\mu\text{g/ml}$). Las células S1 fueron utilizadas como control. B. El tamaño de las colonias de células S1 y T4-2 en cultivo 3D rBM (12 ds) en presencia de Abs bloqueantes de integrinas (20 $\mu\text{g/ml}$, como control se utilizó una IgG no inmunogénica) fue medido bajo un microscopio de contraste de fase y representado en un histograma C. Histograma mostrando el porcentaje de colonias positivas ($>40 \mu\text{m}$) que crecieron luego de 21 días de cultivo de células T4-2 en agar blando en presencia o ausencia de Abs bloqueantes de las integrinas $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 2$ o αv . Como control se utilizaron las células S1.

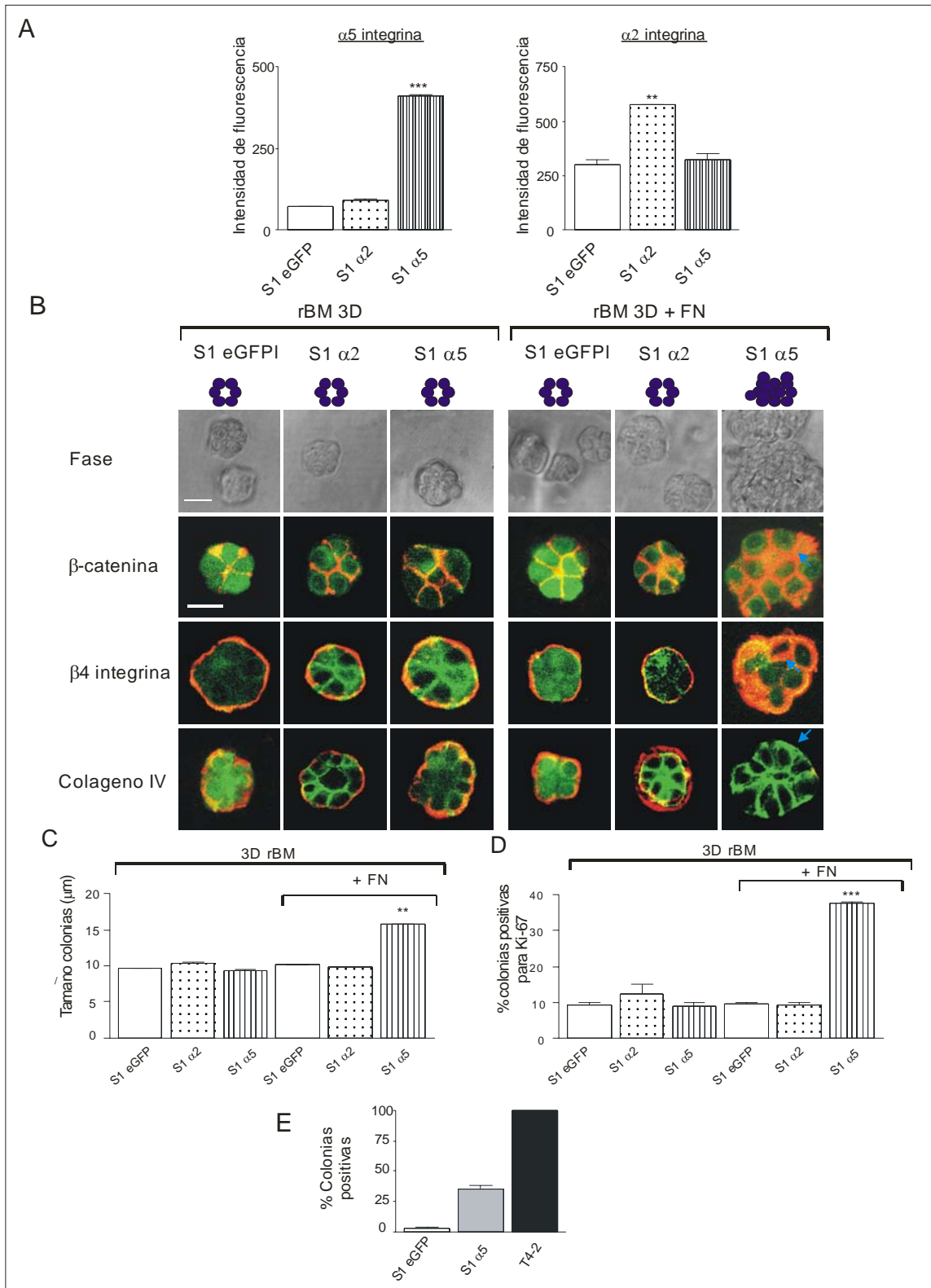


La integrina $\alpha 5\beta 1$ perturba la arquitectura tisular y promueve el crecimiento in vitro

Debido a que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ pareció estar correlacionada con un fenotipo transformado, nos planteamos la posibilidad de que la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células no malignas S1 (las cuales poseen baja o nula expresión endógena de este receptor) podría inducir la transformación maligna de estas células. Por medio de la transducción retroviral introdujimos en su genoma la integrina $\alpha 5$ unida a eGFP, junto con un elemento de control de la transcripción dependiente de tetraciclina (tet-off) (o integrina $\alpha 2$ unida a eGFP como control). Confirmamos la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y $\alpha 2$ por inmunoblot y FACS (Figura 3A), y demostramos que la expresión de cada una de estas integrinas no afectaba los niveles de expresión de la otra. Al cultivar estas células (S1 $\alpha 5$ y S1 $\alpha 2$) en 3D rBM, no observamos diferencias con respecto al tamaño de las colonias y a la polarización tisular de las células S1 $\alpha 5$ comparadas con las células S1 $\alpha 2$ o eGFP- vector control (S1 eGFP). Esto no fue sorprendente, ya que las células S1 no expresan FN, el ligando por excelencia de la integrina $\alpha 5\beta 1$, y la rBM utilizada para estos ensayos (matrigel) tampoco posee FN. De hecho, la adición de FN exógena a los cultivos 3D rBM (3D rBM +FN) indujo la pérdida de polaridad y del control del crecimiento de las células S1 $\alpha 5$, dando lugar a colonias de mayor tamaño que se encontraban aún proliferando al día 12, en contraste con las colonias polarizadas y arrestadas en su crecimiento formadas por las células S1

Figura 3. La expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células no malignas S1 induce la pérdida de la polaridad y del control del crecimiento únicamente en presencia de su ligando FN

A. Expresión de las integrinas $\alpha 2$ y $\alpha 5$, medida por FACS (intensidad de fluorescencia) en células S1 expresando ectópicamente la integrina $\alpha 5$ unida a eGFP (S1 $\alpha 5$), la integrina $\alpha 2$ (S1 $\alpha 2$) o el vector control (S1 eGFP). La expresión ectópica de la integrina $\alpha 5$ no influyen los niveles de la integrina $\alpha 2$ y vice versa B. Fila superior: Fotomicrografías de contraste de fase mostrando las diferencias en el tamaño de las colonias y la arquitectura de las células S1 $\alpha 5$ versus las células S1 $\alpha 2$ y S1 eGFP, únicamente en presencia de FN (las células fueron crecidas en 3D rBM o 3D rBM +FN (100 $\mu\text{g/ml}$, 12 días). Resto del panel: Inmunofluorescencia para marcadores de polaridad: integrina $\beta 4$, β -catenina y colágeno tipo IV, utilizando un Ab secundario conjugado a ⁵⁵⁵AlexaFluor (rojo). La fluorescencia verde se debe a la eGFP. C. El tamaño de las colonias en cultivo 3D rBM o 3D rBM +FN (12 ds) fue medido bajo un microscopio de contraste de fase y representado en un histograma. D. Histograma mostrando el porcentaje de colonias proliferativas (Ki-67 positivo) presentes en cultivos 3D rBM o 3D rBM +FN (12 ds). Solo las células S1 $\alpha 5$ crecidas en presencia de FN fueron capaces de superar su inhibición natural del crecimiento, proliferando aún al día 12 de cultivo. E. Histograma mostrando el porcentaje de colonias positivas (>40 μm) que crecieron luego de 21 días de cultivo de las células en agar blando en ausencia o presencia de flt-1 recombinante (rflt-1, 90 ng/ml). Las células T4-2 fueron utilizadas como control positivo.



eGFP y S1 $\alpha 2$ (Figuras 3B, 3C y 3D). Sorprendentemente, cuando las células S1 eGFP y S1 $\alpha 5$ fueron analizadas en su habilidad de crecer en agar blando, encontramos que la expresión de la integrina $\alpha 5$ era suficiente para permitir el crecimiento y la supervivencia independiente de anclaje de las células S1 $\alpha 5$ (Figura 3E). Como se observó en el caso de las células pre-malignas expresando ectópicamente el gen de la integrina $\alpha 5$ (Capítulo 2 de esta Tesis), la adición de VEGFR-1 recombinante (rflt-1) al agar blando inhibió la supervivencia y crecimiento independientes de anclaje de las células S1 $\alpha 5$, indicando que el loop de crecimiento autocrino dirigido por la interacción VEGF-flt-1 también se encontraría implicado en la pérdida del fenotipo normal de estas células previamente no malignas.

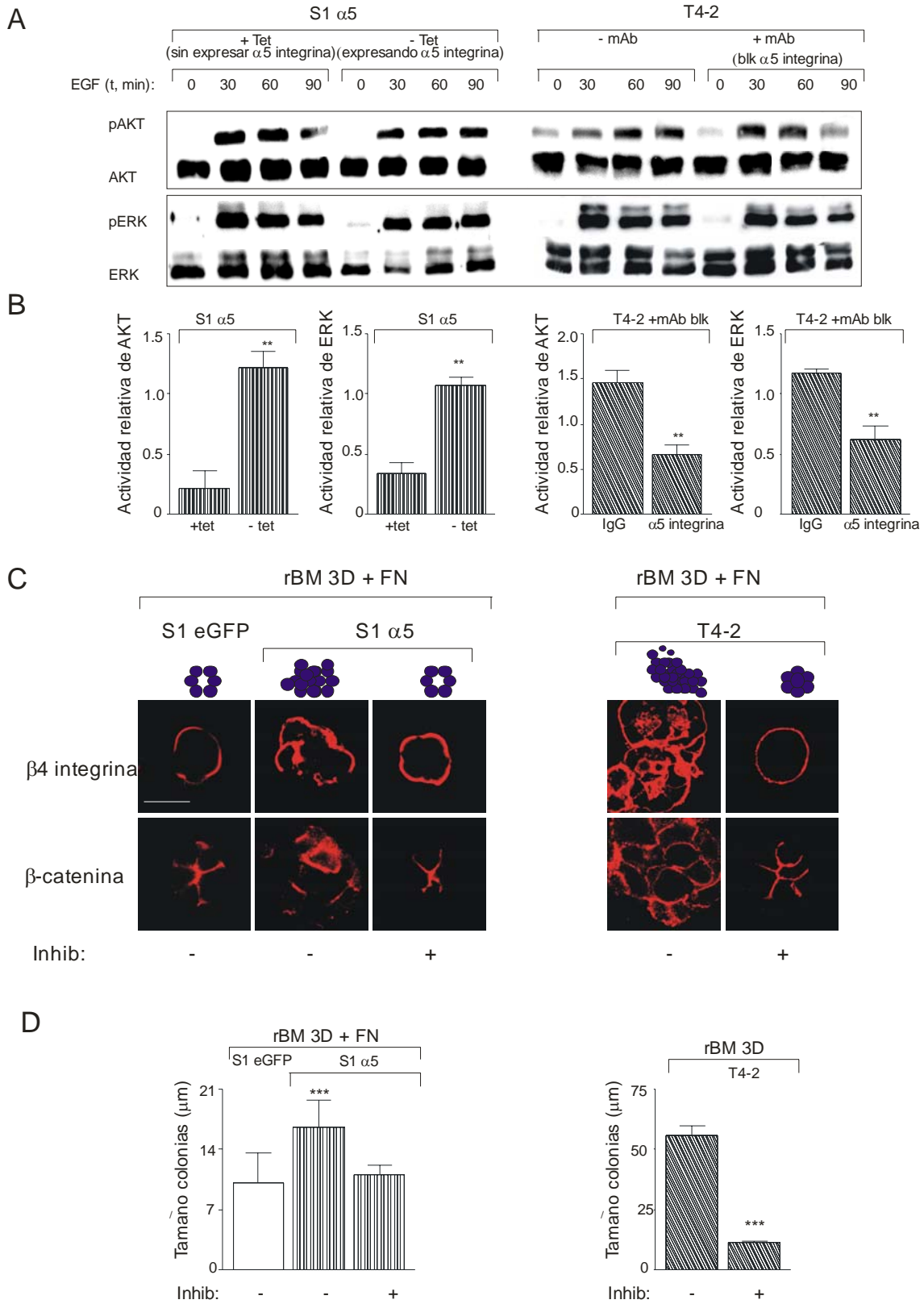
La integrina $\alpha 5\beta 1$ modula el comportamiento tisular a través de la regulación de PI3K y MEK

Para estudiar los posibles mecanismos que llevan a la transformación del fenotipo observado en las células S1 $\alpha 5$, decidimos estudiar las vías de señalización PI3K/AKT y MEK/ERK, las cuales se encuentran aumentadas en casi todos los tipos de cánceres y están involucradas en el control de la supervivencia y la proliferación, y las cuales nosotros demostramos pueden regular la expresión del fenotipo tumoral de las células T4-2 (Wang et al., 2002; Wang et al., 1998). Primeramente analizamos los niveles de AKT y

ERK fosforilados y totales en células que habían sido sembradas sobre FN y estimuladas con EGF (20 ng/ml) por 0, 30, 60 y 90 minutos. La estimulación por EGF de las células S1 control, en las cuales la expresión de la integrina $\alpha 5$ había sido reprimida por la adición de tetraciclina (así como para las células S1 $\alpha 2$, datos no mostrados) indujo la activación transitoria de AKT y ERK. En contraste, las células S1 $\alpha 5$ fueron capaces de mantener la activación sostenida tanto de ERK como de AKT (Figuras 4A y B, compárense los niveles de ERK y AKT fosforilados versus los totales a los 90 min). De manera similar, mientras que el tratamiento de las células T4-2 con EGF indujo la fosforilación sostenida de AKT y ERK, el bloqueo de la función de la integrina $\alpha 5$ en estas células inhibió su capacidad de inducir la activación sostenida de estas moléculas de señalización, induciendo solo una activación transiente de ERK y AKT. Más aún, la inhibición de EGFR, PI3K o MEK en cultivos 3D rBM + FN revirtió el fenotipo inducido por la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ tanto en células S1 $\alpha 5$ como en células tumorales T4-2 (Figura 4C), resultando en la repolarización y la formación de colonias más pequeñas (Figura 4D).

Figura 4. La integrina $\alpha 5\beta 1$ regula la actividad de AKT y ERK en MECs, resultando en un fenotipo transformado

A. Inducción de la activación de AKT y ERK por EGF. Se muestra un inmunoblot representativo de los niveles totales y fosforilados de AKT y ERK en las células S1 $\alpha 5$ con la expresión reprimida (+tet) o inducida (-tet) de la integrina $\alpha 5$, y de las células T4-2 en presencia o ausencia de Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ (MAB1956Z). Obsérvense las diferencias entre la activación transitoria de ERK y AKT en células que no poseen una integrina $\alpha 5$ funcional, y la activación sostenida de estas moléculas señal por las células que expresan la integrina $\alpha 5$. B. Actividad específica relativa de AKT y ERK luego de 90 min de estimulación con EGF de las células S1 $\alpha 5$ y T4-2 en las mismas condiciones experimentales que en A, calculadas por análisis densitométrico de los inmunoblots de AKT o ERK activados (fosforilados) divididos por los niveles totales de AKT o ERK, respectivamente, luego de normalizar con respecto a E-cadherina. C. Inmunofluorescencia para marcadores de polaridad: integrina $\beta 4$ y β -catenina, a los 12 días de cultivo 3D rBM +FN de las células S1 eGFP y S1 $\alpha 5$ y (panel izquierdo) y células T4-2 (panel derecho), con o sin el tratamiento con los inhibidores Tyrphostin AG 1478 (200 nM), PD98059 o LY 294002 (40 μ m) (la inhibición de EGFR, PI3K o MEK resultó en la restauración del fenotipo normal). D. El tamaño de las colonias formadas en cultivo 3D rBM +FN (12 ds) en presencia o ausencia de inhibidores (mismos que en C) fue medido bajo un microscopio de contraste de fase y representado en un histograma.



La integrina $\alpha 5\beta 1$ modula la expresión del fenotipo maligno in vivo

Debido a que nuestros experimentos in vitro demostraron que podíamos revertir el fenotipo tumoral bloqueando la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células T4-2, o inducir la pérdida del fenotipo normal por expresión de este receptor en las células S1, quisimos determinar si estas observaciones continuaban siendo ciertas in vivo. Para nuestros experimentos utilizamos ratones Balb/c nu/nu, los que permiten el crecimiento de líneas celulares humanas. Inoculamos células S1 eGFP, S1 $\alpha 5$ y T4-2, éstas últimas junto con una IgG no-inmunogénica o un Ab bloqueante de función de la integrina $\alpha 5$, junto con rBM (matrigel), y medimos el tamaño de los tumores durante un período de dos meses. Luego de este tiempo, extirpamos y pesamos los tumores, y a continuación los fijamos y embebimos en parafina para obtener secciones de tejido para ser analizadas por inmunohistoquímica. Como era de esperarse, las células T4-2 control dieron lugar a grandes masas tumorales esencialmente viables y proliferativas. De manera interesante, las células tratadas con el Ab bloqueante de función de la integrina $\alpha 5$ formaron predominantemente grandes quistes necróticos no proliferativos, acompañados por una muy pequeña masa tumoral adyacente. En contraste, las MECs S1 formaron estructuras pequeñas y no invasivas de características ductales (acinos), mientras que las células S1 $\alpha 5$ formaron lesiones proliferativas de mayor tamaño con características de displasia (Figura 5C). La tinción con H&E de secciones de parafina de las muestras tumorales confirmó los datos macroscópicos, y la inmunohistoquímica para PCNA (antígeno de proliferación) y de caspasa 3 activada (marcador de apoptosis) confirmaron de manera

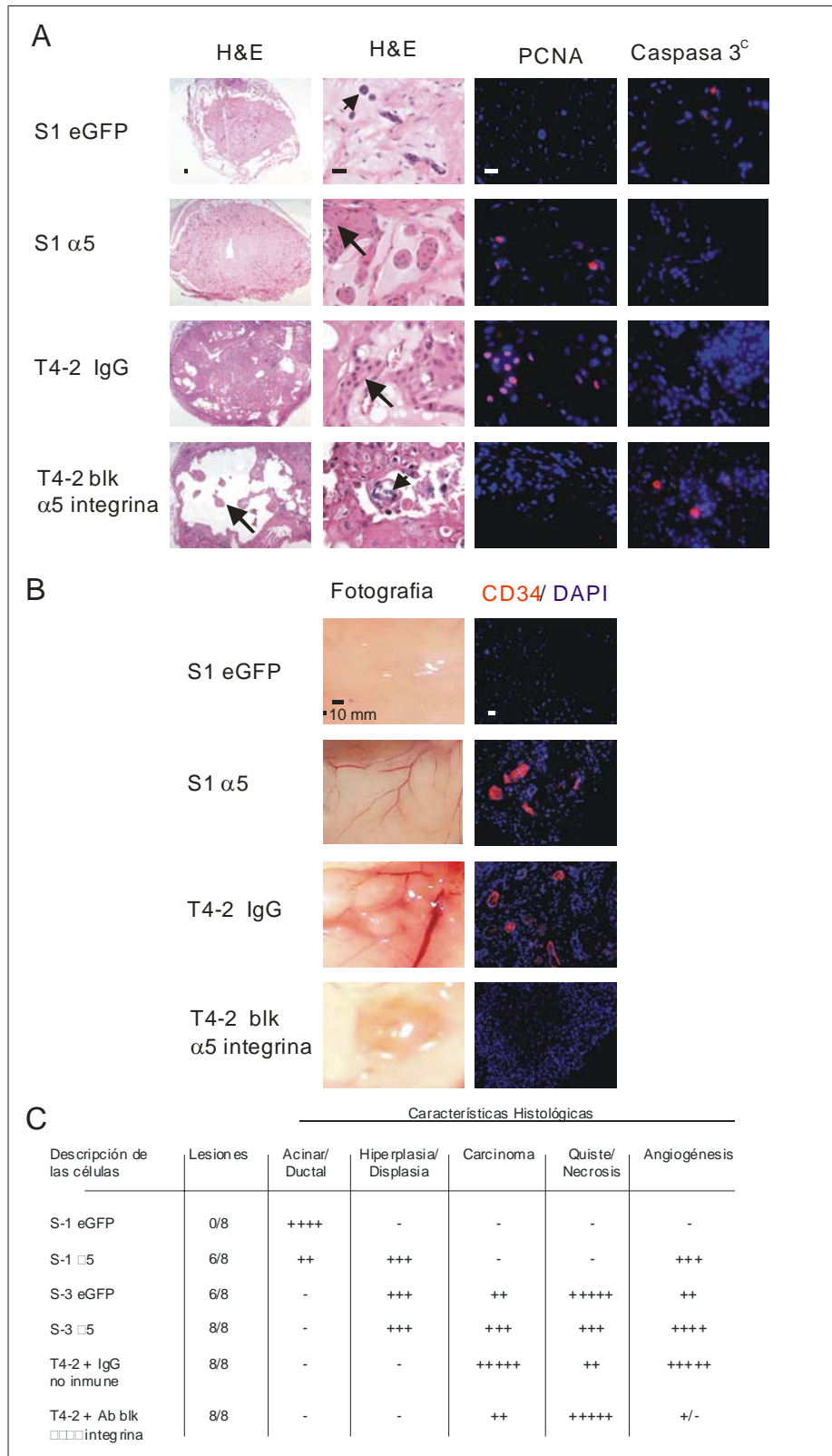
más contundente que mientras las células T4-2 tratadas con IgG se encontraban proliferando activamente, las células tratadas con el Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ se encontraban arrestadas en su crecimiento y mostraban signos de necrosis y apoptosis (Figura 5A). Más aún, las células S1 $\alpha 5$ dieron lugar a lesiones hiperplásicas que no mostraban signos de apoptosis en contraste con su contraparte control, las que dieron lugar a estructuras acinares/ ductales normales que se encontraban en proceso de apoptosis (Figuras 5A y 5C).

La integrina $\alpha 5\beta 1$ modula la polaridad tisular y la angiogénesis in vivo

Las metástasis tumorales dependen de la pérdida de la arquitectura tisular, de la invasión y de la angiogénesis. Y una de las características fundamentales de la dormición tumoral es la falta de angiogénesis. Por lo tanto, la observación macroscópica de una importante respuesta angiogénica en la piel de ratones portadores de tumores derivados de células T4-2 tratadas con IgG no fue una sorpresa. Por el contrario, las células S1 eGFP o las células T4-2 tratadas con el Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ no indujeron una respuesta angiogénica (Figura 5B). Sorprendentemente, las lesiones derivadas de las células S1 $\alpha 5$ fueron capaces de inducir niveles significativos de angiogénesis. Mas aún, la inmunohistoquímica para CD34 (Figura 5C) y SMA confirmó estas observaciones, mostrando un gran número de vasos sanguíneos teñidos positivamente con CD34 en las muestra provenientes de las lesiones derivadas de las célula T4-2 y S1 $\alpha 5$, pero poca o ninguna tinción en el resto de las muestra (Figura 5C).

Figura 5. El bloqueo de la función de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ induce la dormición tumoral in vivo en asociación con la modulación de la angiogénesis

Las células S1 eGFP, S1 $\alpha 5$ y T4-2 (co-incubadas con IgG no inmunogénica o con Ab bloqueante de función de la integrina $\alpha 5$), junto con matrigel, fueron inoculadas en ambos flancos de ratones hembra Balb/c nu/nu de 4-6 semanas. Luego de dos meses, los tumores generados fueron extirpados y subsecuentemente fijados en 4% PFA y embebidos en parafina. Columnas 1 y 2: tinción de H&E de secciones de parafina de tumores derivados de las células S1 eGFP y S1 $\alpha 5$ y células T4-2 tratadas con IgG control o con Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$. Obsérvese la importante necrosis en las lesiones derivadas de las últimas. Columnas 3 y 4: Inmunohistoquímica mostrando la tinción con DAPI (núcleos, azul), PCNA (células proliferativas, rojo) y caspasa 3 activada (células en apoptosis, rojo) de estas mismas muestras. Obsérvese como mientras que las células T4-2 control se encuentran proliferando activamente (importante tinción para PCNA), los tumores derivados de las células T4-2 tratadas con Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ muestran signos de apoptosis (tinción positiva para caspasa 3 activada). Este patrón apoptótico también puede observarse en las lesiones derivadas de las células S1 eGFP, pero no en los tumores derivados de las células S1 $\alpha 5$. B: Izquierda: Fotografías de tumores derivados de las células S1 eGFP, S1 $\alpha 5$, T4-2 tratadas con IgG y T4-2 tratadas con un Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$, mostrando un gran número de vasos sanguíneos en los tumores T4-2 control así como en los tumores S1 $\alpha 5$. Derecha: Inmunohistoquímica mostrando la tinción para CD34 (rojo) de los vasos sanguíneos en estas mismas muestras (se utilizó DAPI para teñir los núcleos, azul). C. Tabla describiendo las características de las diferentes lesiones: número de masas celulares obtenidas por grupo (entre paréntesis se indica la media \pm SD del peso de las lesiones al momento de la excisión), y sus características histológicas.



La integrina $\alpha 5\beta 1$ modula la angiogénesis en cultivo

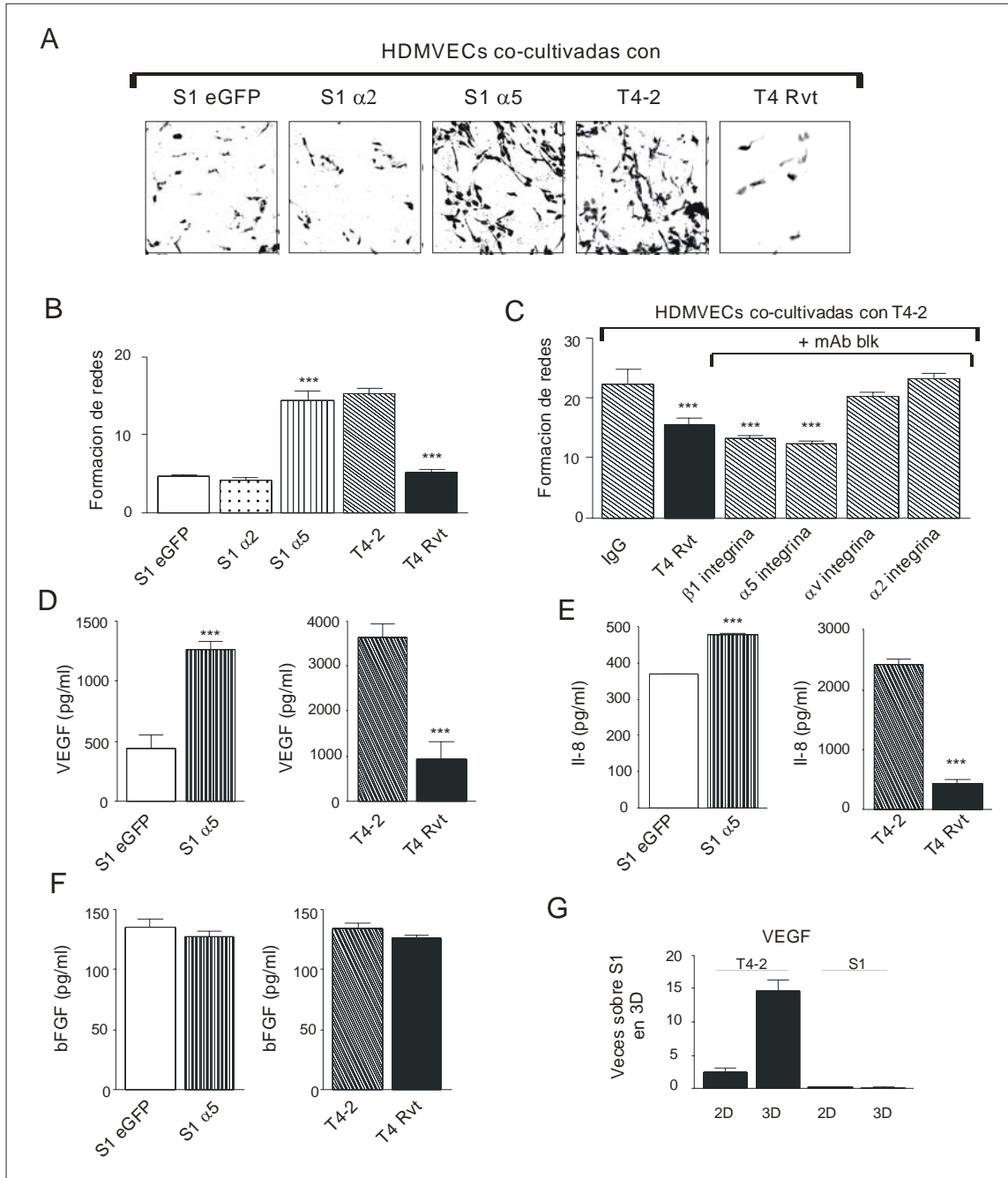
Debido a que la inhibición de la respuesta angiogénica en los tumores derivados de las células T4-2 tratadas con el Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ podría deberse a un efecto directo del Ab sobre las ECs (ya que existe amplia evidencia demostrado que la inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$ ejerce efectos directos sobre la proliferación de las ECs (Kim et al., 2000), decidimos utilizar el ensayo de angiogénesis in vitro para descartar esta posibilidad. Para esto inhibimos la función de la integrina $\alpha 5$ por medio de Abs bloqueantes en la MECs en cultivos 3D rBM, y co-cultivamos estas células en diferentes condiciones con HDMVECs. Nuestros resultados in vitro confirmaron los obtenidos in vivo, y la Figura 6 muestra como mientras que las células T4-2 y S1 $\alpha 5$ inducen una respuesta angiogénica positiva (obsérvese como las ECs se encuentran má elongadas que las ECs control en ausencia de MECs), las células control S1 (S1 eGFP y S1 $\alpha 2$), las células T4 Rvt (Figuras 6A y 6B) y las células T4-2 tratadas con Abs bloqueantes de función de las integrinas $\alpha 5$ o $\beta 1$ no lograron inducir una respuesta angiogénica (ECs redondeadas) (Figura 6C).

La inducción del fenotipo pro-angiogénico en cultivo e in vivo se encuentra asociada a la secreción de VEGF e IL-8

Para determinar si la reversión fenotípica y la restauración de la arquitectura tisular eran los responsables de la modulación de la producción de factores pro- y anti-angiogénicos, realizamos ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assays) a partir del medio condicionado (CM) de cultivos de 12 días en 3D rBM +FN de células S1 eGFP, S1 $\alpha 5$, T4-2 y T4 Rvt. Nuestros resultados demostraron que la arquitectura tisular, a través de la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ -FN regula la producción de VEGF e IL-8 (Figuras 6F y 6E), pero no ejerce efecto alguno sobre la producción de bFGF (Figura 6F). Más aún, por RT-PCR encontramos que el mRNA del VEGF era también expresado diferencialmente entre las células S1 y T4-2, e interesantemente el aumento de la expresión del mRNA del VEGF también se encontraba asociado a una estructura 3D (Figura 6G).

Figura 6. La integrina $\alpha 5\beta 1$ induce angiogénesis in vitro

Cultivos de MECs en 3D rBM +FN en cámaras de Boyden (12 ds) y fueron transferidos a placas de 24 hoyos conteniendo monocapas semi-confluentes de HDMVECs (o iHUEC2As) recubiertas con gel de colágeno de tipo I (1 mm de grosor). Luego de 2 días, los geles de colágeno fueron fijados en 4% PFA, teñidos con 0.1% azul de toluidina y montados en un portaobjetos para obtener fotomicrografías. La formación de redes por las ECs en las diferentes condiciones experimentales fue analizada utilizando el software Scion Image, esqueletonizando las fotos de las redes de ECs. Para cada set de datos se obtuvieron la media y el SD. A. Fotomicrografías mostrando la invasión del gel de colágeno por las HDMVECs co-cultivadas con células S1 eGFP, S1 $\alpha 2$, S1 $\alpha 5$, T4-2 o T4 Rvt. Mientras que las células S1 $\alpha 5$ o T4-2 inducen la invasión del gel de colágeno por las EC, el resto de las MECs no son angiogénicas. Los mismos resultados se obtuvieron con las ECs iHUEC2A. B. Cuantificación de la formación de redes por las ECs en A. C. Histograma representando la formación de redes por las HDMVECs co-cultivadas con células T4-2 co-incubadas con IgG control, inhibidor de EGFR (Rvt) o Abs bloqueantes de las integrinas $\beta 1$, $\alpha 5$, αv o $\alpha 2$ (20 $\mu\text{g/ml}$) en cultivos 3D rBM (12 ds). Nótese que la reversión del fenotipo tumoral afecta la capacidad angiogénica de las células tumorales T4-2. Los mismos resultados se obtuvieron con las células iHUEC2A. D. Cuantificación de los niveles de VEGF (pg/ml) en el CM (48 hr) de cultivos 3D rBM (12 ds) de células S1 eGFP y S1 $\alpha 5$ (izquierda) y de células T4-2 y T4 Rvt (derecha). Obsérvese el aumento de la secreción de VEGF por las células que expresan la integrina $\alpha 5$. E. Cuantificación de los niveles de IL-8 (pg/ml) en el CM (48 hr) de cultivos 3D rBM (12 ds) de células S1 eGFP y S1 $\alpha 5$ (izquierda) y de células T4-2 y T4 Rvt (derecha). Obsérvese el aumento de la secreción de IL-8 por las células que expresan la integrina $\alpha 5$. F. Cuantificación de los niveles de bFGF (pg/ml) en el CM (48 hr) de cultivos 3D rBM (12 ds) de células S1 eGFP y S1 $\alpha 5$ (izquierda) y de células T4-2 y T4 Rvt (derecha). No se observan diferencias en la secreción de bFGF en los CMs de las diferentes células. G. Histograma cuantificando los valores obtenidos por RT-PCR para la expresión del mRNA del VEGF en células S1 y T4-2 en cultivos 2D y 3D rB. Para la normalización se utilizó la rRNA 18s. Es de notar que los niveles del mRNA del VEGF aumentan significativamente cuando las células T4-2 son cultivadas en 3D rBM.



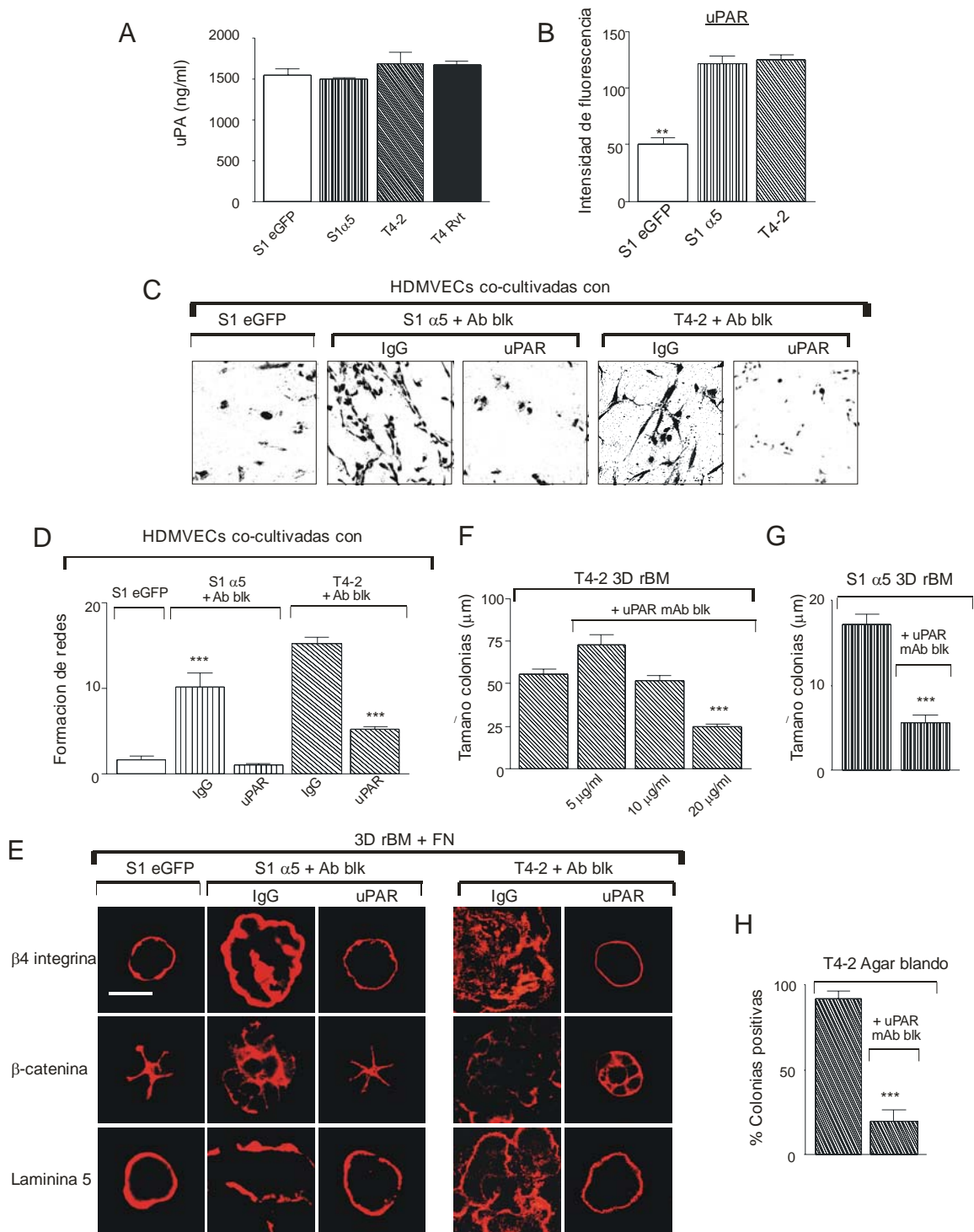
Cross-talk entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ -uPAR-EGFR, polaridad tisular y angiogénesis

La observación de que, coincidentemente con el switch angiogénico inducido por la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN se observaba una pérdida de la arquitectura tisular, y que a su vez la reversión del fenotipo tumoral y la restauración de una estructura tisular organizada inhibían la capacidad angiogénica de las MECs nos indujo a pensar que podría existir una asociación entre la formación de estructuras “durmientes” y la capacidad angiogénica. La activación del uPAR por uPA ha sido implicada en la angiogénesis y la dormición tumoral, y se ha demostrado que en algunos tipos celulares este receptor interactúa con la integrina $\alpha 5\beta 1$ a través del EGFR (Liu et al., 2002). Ya que las células tumorales T4-2 expresan altos niveles de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y del EGFR, y que tanto la inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$ como del EGFR pueden inducir la dormición tumoral (Figura 1 y Weaver et al., 1997), decidimos estudiar si las líneas celulares de nuestro modelo mostraban a su vez expresión diferencial de uPAR y uPA. Analizamos la expresión de uPAR en la superficie celular por FACS y western blot, y la producción de uPA por ELISA, y encontramos que, mientras los niveles de uPA en el CM de las diferentes líneas celulares eran los mismos, independientemente de los niveles de expresión de la integrina $\alpha 5$ por estas células (Figura 7A), la expresión de uPAR se correlacionaba positivamente con la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Figura 7B).

Para analizar si el uPAR se encontraba involucrado en el switch angiogénico, establecimos co-cultivos en los cuales pre-incubamos las células tumorales con Abs bloqueantes de uPAR y encontramos que este tratamiento no solo revertía el fenotipo tumoral de las células T4-2 crecidas en 3D rBM (Figuras 7E, 7F y 7G), sino que también inhibía su capacidad pro-angiogénica (Figuras 7C y 7D). Más aún, la adición de Ab bloqueante de uPAR a cultivos de agar blando afectó la capacidad de las células tumorales T4-2 de crecer independientemente de anclaje (Figura 7H). El modelo propuesto para la regulación de la dormición tumoral a través de interacciones $\alpha 5\beta 1$ integrina-FN/uPAR/EGFR, a través de la modulación de la polaridad tisular y la angiogénesis, se encuentra representado en la figura 8. Nosotros sugerimos que la estimulación o sobre-expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN/ uPAR/ EGFR induciría la pérdida de la arquitectura tisular a través de un mecanismo que involucraría la activación de las vías AKT/PI3K y MEK/ERK. Esta interacción a su vez llevaría a la estimulación de la expresión de moléculas pro-angiogénicas como VEGF e IL-8, llevando al switch angiogénico que permitirá el crecimiento del tumor previamente durmiente. A su vez, este modelo sugiere que la progresión tumoral podría inhibirse para inducir un estado de dormición por medio del bloqueo de la actividad o función de cualquiera de estas moléculas.

Figura 7. La unión de FN por la integrina $\alpha 5\beta 1$ regula la dormición tumoral a través de la activación cooperativa del uPAR y de la inducción de angiogénesis, y esto se encuentra relacionado recíprocamente a una arquitectura tisular desorganizada

A. Cuantificación de los niveles de uPA (pg/ml) liberados al CM por células S1 eGFP, S1 $\alpha 5$, T4-2 y T4 Rvt (ELISA). No se observan diferencias en la expresión de uPA, independientemente del estatus de la integrina $\alpha 5$ en las MECs. B. Las células S1 eGFP, S1 $\alpha 5$ y T4-2 fueron teñidas con un Ab anti- uPAR (N.3639) y analizadas por FACS. La intensidad de fluorescencia (niveles de uPAR en la superficie celular) fue representada en un histograma. La expresión de la integrina $\alpha 5$ induce un aumento de los niveles de uPAR en la superficie celular. C. Micrografías mostrando la invasión del gel de colágeno por las ECs en co-cultivos de HDMVECs con células S1 eGFP, S1 $\alpha 5$ y T4-2 co-incubadas con o sin Ab bloqueante de función de uPAR. Las MECs se crecieron en cultivo 3D rBM sin o con Ab bloqueante de uPAR (20 μ g/ml, N.3639) dentro de un inserto de cultivo (12 ds) y luego estos transwells fueron transferidos a una placa de 24 hoyos donde monocapas confluentes de HDMVECs habían sido recubiertas con un gel de colágeno de tipo I (1 mm de espesor). Luego de 2 días los geles de colágeno fueron fijados en 4% PFA, teñidos con 0.1% azul de toluidina y montados sobre un portaobjetos de vidrio para obtener micrografías. La formación de redes por las ECs en las diferentes condiciones experimentales fue analizada utilizando el software Sción Image, por esquelotonización de la fotografía de la red de ECs. Para cada set de datos se obtuvieron la media y SD. D. Cuantificación del promedio de formación de redes para C. E. Inmunofluorescencia para algunos marcadores de polaridad (integrina $\beta 4$, β -catenina y LM5) en cultivos 3D rBM de MECs co-incubadas con Ab bloqueante de función de uPAR. F. Tamaño de las colonias formadas por las células S1 eGFP y S1 $\alpha 5$ en cultivos 3D rBM +/- Ab bloqueante de uPAR (12 ds). G. Tamaño de las colonias formadas por las células T4-2 en cultivos 3D rBM +/- Ab bloqueante de uPAR (12 ds). H. Histograma mostrando el porcentaje de colonias positivas (>40 μ m) que crecieron luego de 21 días de cultivo de las células T4-2 en agar blando +/- Ab bloqueante de uPAR.



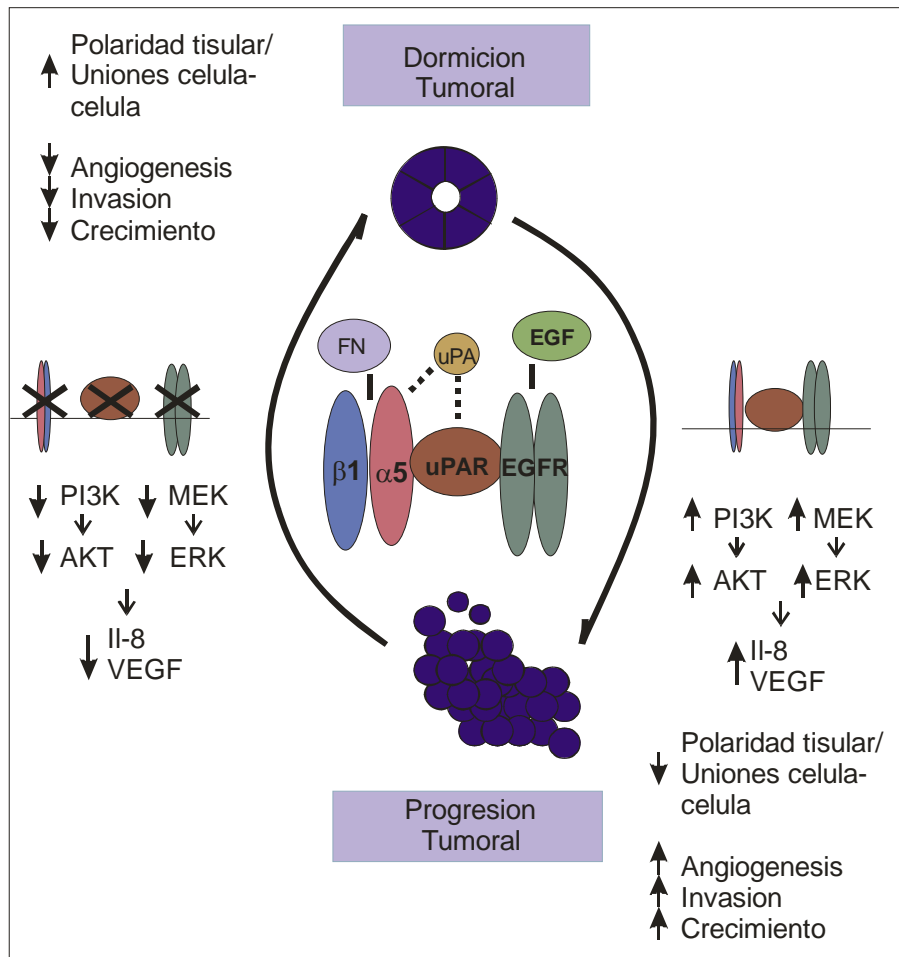


Figura 8. La interacción integrina $\alpha 5 \beta 1$ - FN regula la dormición tumoral a través de la activación cooperativa de uPAR y EGFR y de la inducción de angiogénesis, y esto se encuentra asociado recíprocamente a la disrupción de la arquitectura tisular e involucra la vías de señalización AKT/PI3K y MEK/ERK

Modelo propuesto: la estimulación de las interacciones entre la integrina $\alpha 5 \beta 1$ - FN/ uPAR/ EGFR induce las vías de señalización PI3K/ AKT y MEK/ ERK, llevando al aumento de la expresión de VEGF e IL-8, aumentando la supervivencia e induciendo la pérdida de polaridad, los cuales podrían promover el switch angiogénico, llevando finalmente a la transformación tumoral. La inhibición de cualquiera de estos receptores (integrina $\alpha 5 \beta 1$, uPAR o EGFR) podría potencialmente inducir la dormición tumoral gracias a la restauración de la estructura tisular normal y la inhibición de la angiogénesis.

Discusión

Debido a los efectos de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre la migración, invasión y supervivencia de las células pre-malignas S3-C, nos preguntamos si la expresión de la integrina $\alpha 5$ podría ser suficiente para transformar también a las células no malignas S1.

Encontramos que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ era suficiente para inducir la supervivencia de las células S1 en agar blando e inhibir la formación de estructuras normalmente polarizadas en 3D rBM, in vitro así como in vivo (inyecciones en ratones nude). A pesar de estas observaciones, la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ no fue suficiente para inducir la invasión de estas células in vitro o un fenotipo invasivo in vivo. Nuestros experimentos demostraron que la integrina $\alpha 5\beta 1$ activaría las vías de señalización dependientes de PI3K y ERK, las que llevarían al aumento de la supervivencia y el crecimiento, así como a la pérdida de la polaridad tisular (Figura A).

Mas aún, encontramos que podíamos revertir el fenotipo tumoral de las células T4-2 a un estado durmiente simplemente interfiriendo con la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ utilizando Abs bloqueantes de función. La inhibición de la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ -FN en las células T4-2 fue suficiente para disminuir profundamente su tumorigenicidad, previniendo la angiogénesis e induciendo necrosis y apoptosis in vivo.

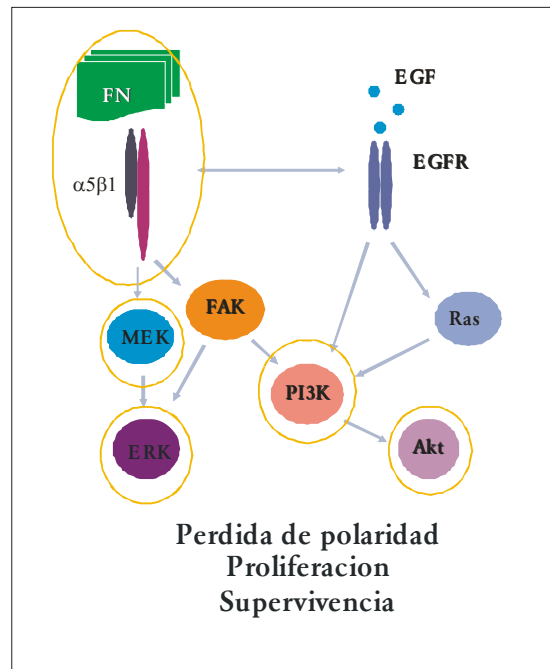


Figura A: La integrina $\alpha 5\beta 1$ activa las vías de señalización dependientes de PI3K/AKT- y MEK/ERK

Las interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN/ EGFR inducirían las vías de señalización PI3K/ AKT y MEK/ ERK llevando a la pérdida de la polaridad, y el aumento de la proliferación y la supervivencia, fundamentales para la transformación maligna.

Por lo tanto, propusimos que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría promover la formación de metástasis al desestabilizar la arquitectura tisular y facilitar la invasión, y al inducir la secreción de VEGF e IL-8 para inducir una respuesta angiogénica (Figura B).

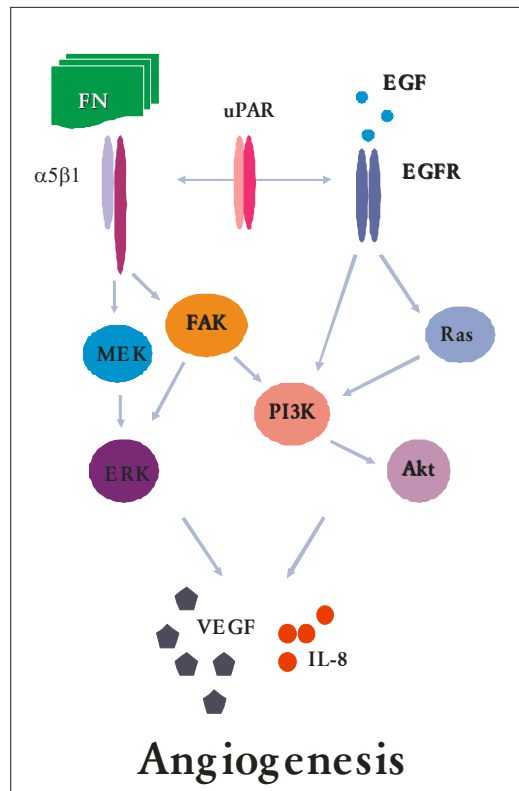


Figura B: La interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN induce la expresión de VEGF e IL-8

Las interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN/ EGFR inducirían las vías de señalización PI3K/ AKT y MEK/ ERK llevando al aumento de la expresión de VEGF e IL-8, los cuales promoverían el switch angiogénico necesario para la progresión tumoral.

En este capítulo identificamos un link recíproco entre la polaridad tisular, la señalización a través de interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ -EGFR-uPAR, la expresión de factores pro-angiogénicos y la dormición tumoral. Más específicamente, nuestros resultados sugieren que la unión de FN a la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría regular la dormición tumoral a través de la activación cooperativa de uPAR y la inducción de la angiogénesis, y esto pareciera estar asociado recíprocamente a la pérdida de la integridad tisular.

Previamente demostramos que podíamos inducir un estado de dormición tumoral inhibiendo la señalización de la integrina $\beta 1$, EGFR, PI3K o MEK en las células tumorales (colonias más pequeñas y normalización de la polaridad tisular; (Wang et al., 1998; Weaver et al., 1997). Acompañando esta reversión se observó una robusta regulación negativa de la expresión de FN y TN (Figura 1), lo que nos indujo a estudiar cuáles integrinas serían buenas candidatas para la regulación de la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular. Entre los heterodímeros $\alpha\beta$ que aumentan durante la transformación maligna y disminuyen luego de la reversión del fenotipo tumoral se encontraron las integrinas $\alpha 5$ y αv . Por lo tanto, estos datos sugerirían que la interacción de las integrinas $\alpha 5$ y αv con sus ligandos podría ejercer un rol fundamental en la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular. Para explorar más a fondo el rol de las integrinas $\alpha 5$ y αv en la inducción de la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular, llevamos a cabo experimentos utilizando Abs inhibitorios. De manera similar a la reversión a través de la inhibición de la integrina $\beta 1$, EGFR, PI3K o MEK, el Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ disminuyó significativamente el tamaño de las colonias e indujo la pérdida de la independencia de anclaje para el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales T4-2 en agar blando (Figura 2). Por lo tanto, estos datos coincidieron con la idea de que las interacciones integrin $\alpha 5\beta 1$ - FN y no las interacciones integrina $\alpha v\beta 3$ - TN serían fundamentales para la malignidad. Y por ende, su inhibición podría inducir la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular. Para analizar

más a fondo el rol de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la regulación de la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular, indujimos la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5$ en las MECs no malignas S1 (S1 $\alpha 5$) y MCF10A (datos no mostrados) (Figura 3). Tanto las células S1 $\alpha 2$ como las células S1 $\alpha 5$ formaron estructuras polarizadas en cultivos 3D rBM. Consistentemente con la noción de que la unión de FN a la integrina $\alpha 5\beta 1$ sería crítica para la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular, el agregado de FN exógena a estos cultivos indujo la pérdida de polarización y del control del crecimiento de las células S1 $\alpha 5$, pero no afectó el comportamiento de las células S1 $\alpha 2$. Por lo tanto, la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN sería crítica para la polarización tisular y la formación de estructuras “durmientes”.

La activación de ERK dependiente de integrina $\alpha 5\beta 1$ -EGFR- uPAR ha sido implicada fuertemente en la inducción de dormición tumoral en líneas de células tumorales agresivas (Aguirre-Ghiso et al., 2003; Liu et al., 2002). Por lo tanto, decidimos evaluar la capacidad de la integrina $\alpha 5\beta 1$ ligada a FN de mediar la activación de las vías de señalización MEK/ERK y PI3K/AKT. Observamos la activación sostenida tanto de ERK como de AKT en respuesta a la activación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por su unión en las células S1 $\alpha 5$ cells en las cuales la expresión de la integrina $\alpha 5$ había sido inducida por la ausencia de tet en el medio, mientras que solo se observó una activación transitoria en las células en las que la expresión de la integrina $\alpha 5$ había sido inhibida por la adición de tet al medio (Figura 4). Resultados similares se obtuvieron para las células tumorales T4-2

en comparación a células T4-2 que habían sido pre-incubadas con un Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ (Figura 4). Consistentemente con esta observación, la inhibición de MEK o PI3K fue suficiente para inducir la re-polarización de las células S1 $\alpha 5$. Esto sugiere que la unión de FN por la integrina $\alpha 5\beta 1$ a través de un cross-talk con EGFR podría activar vías de señalización dependientes de PI3K y ERK para modular la polaridad tisular y de esta manera modular la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular.

Consistentemente con la noción de que la integrina $\alpha 5\beta 1$ regula la arquitectura tisular para modular la dormición tumoral, las MECs control no malignas formaron predominantemente estructuras acinares/ ductales con elevados niveles de apoptosis al ser inyectadas en ratones nude (Figura 5), sugiriendo que el balance entre proliferación y muerte celular favorecería la muerte, mientras que las células S1 $\alpha 5$ dieron lugar a lesiones hiperplásicas y no apoptóticas. Las células tumorales T4-2 (las cuales poseen un alto nivel de expresión endógeno de la integrina $\alpha 5$) formaron grandes masas tumorales que eran altamente proliferativas y presentaban un bajo grado de apoptosis, mientras que la inhibición de la integrina $\alpha 5$ en estas células indujo la inhibición de la proliferación y el aumento de apoptosis y necrosis, resultando en la formación de grandes quistes acompañados por pequeñas porciones de tumores adyacentes (Figura 5). Y consistentemente con la modulación de la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular in vivo, observamos una respuesta angiogénica significativa asociada a la actividad de la integrina $\alpha 5\beta 1$, de manera tal que las células no malignas que

expresaban la integrina $\alpha 5$ activada indujeron un robusto fenotipo angiogénico, similar al observado en los tumores control, mientras que la inhibición de la función de la integrina $\alpha 5$ en las células tumorales inhibió completamente su angiogénesis.

La dormición tumoral ha sido asociada al switch angiogénico, y nuestras observaciones indicaron que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría estar mediando el switch angiogénico consistentemente con la regulación de la arquitectura tisular. Para estudiar el fenotipo angiogénico in vitro, y para descartar a su vez la posibilidad de que el Ab bloqueante de la integrina $\alpha 5$ tuviera efectos directos sobre las ECs in vivo, establecimos co-cultivos de ECs y MECs. Consistentemente con los datos obtenidos in vivo, la pérdida de la polaridad tisular inducida por la expresión de la integrina $\alpha 5$ en las células no malignas S1 indujo el fenotipo pro-angiogénico, mientras que la reversión fenotípica de las células tumorales T4-2 reprimió su capacidad angiogénica de forma significativa (Figura 6). Mas aún, la inhibición de la función de la integrina $\alpha 5$ utilizando Abs bloqueantes confirmó el rol de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el control del switch angiogénico que regularía la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular.

El switch angiogénico que regula la dormición tumoral estaría asociado al balance entre factores pro- y anti- angiogénicos (Udagawa et al., 2002). Consistentemente, en nuestros estudios observamos una correlación entre la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la polaridad tisular y la secreción de factores pro-angiogénicos. Las células tumorales que

expresan altos niveles de integrina $\alpha 5$ e inducen un robusto fenotipo angiogénico in vivo, también expresan altos niveles de VEGF e IL-8. De manera inversa, la expresión de VEGF e IL-8 fue reprimida al inducir la inhibición la integrina $\alpha 5$ y la formación de acinos polarizados, resultando en la inhibición de su capacidad angiogénica. De manera similar, las MECs no malignas expresando la integrina $\alpha 5$, pero no las que expresaban la integrina $\alpha 2$, mostraron un aumento significativo en la secreción de VEGF en concierto con su comportamiento angiogénico (Figura 6).

El uPAR ha sido fuertemente implicado en la regulación de la dormición tumoral mediada por el cross-talk integrina $\alpha 5\beta 1$ - EGFR (Liu et al., 2002). Basándonos en esta noción, nos preguntamos si existiría una asociación entre el uPAR, la integrina $\alpha 5\beta 1$, el EGFR, la angiogénesis y la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular. De manera interesante, a pesar de que los niveles de uPA fueron similares sin importancia de la línea celular estudiada, el análisis de FACS reveló una fuerte correlación entre la expresión de la integrina $\alpha 5$ y el uPAR. Mientras que las células no malignas poseían bajos niveles de uPAR en la superficie celular, la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5$ por estas células indujo un aumento de la expresión de uPAR (Figura 7). Más aún, la inhibición de la actividad de uPAR en las células S1 $\alpha 5$ y T4-2 normalizó la estructura tisular, restauró las uniones célula- célula e indujo la deposición polarizada de una BM. Y coincidentemente con la inducción de la dormición tumoral, la inhibición de uPAR inhibió significativamente la angiogénesis.

Por lo tanto, en este Capítulo hemos identificado un link recíproco entre la polaridad tisular, la señalización vía integrina $\alpha 5\beta 1$ - EGFR- uPAR, la expresión de factores pro-angiogénicos y la dormición tumoral. También demostramos que la expresión ectópica y la activación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por su unión a FN serían suficientes para comprometer la morfogénesis tisular en MECs no malignas. Estos datos sugieren que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría ejercer un rol crítico en la transformación maligna, y que su expresión y activación serían incompatibles con la morfogénesis normal.

CONCLUSIONES GENERALES

En la siguiente Tesis, nosotros:

1. Clonamos y caracterizamos una población pura de células pre malignas, a la cual denominamos S3-C, la cual serviría como un modelo de DCIS in vitro.
2. Establecimos un modelo de co-cultivo en 3D de MECs junto con ECs para estudiar la capacidad angiogénica de las MECs in vitro, y para intentar elucidar cuáles podrían ser algunos de los factores importantes implicados en el fenotipo angiogénico. Encontramos una correlación entre la pérdida de la arquitectura tisular, la progresión tumoral, la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y el switch angiogénico en la serie de MECs de nuestro modelo.
3. Demostramos que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ aumenta junto con la expresión de su ligando FN durante la progresión tumoral, y que esto se encontraría correlacionado con un aumento en la secreción de los factores pro-angiogénicos VEGF e IL-8, responsables del switch angiogénico.
4. Demostramos que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ – FN es responsable del mantenimiento del fenotipo maligno en nuestro sistema: la inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$ indujo la reversión del fenotipo tumoral de las células T4-2 in vitro e in vivo.
5. Comprobamos que la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células pre-malignas S3-C podría inducir su transformación maligna, y que esto se encontraba asociado a la inducción de la expresión del VEGFR-1 (flt-1), el cual participaría en un loop autocrino de supervivencia.

6. Más aún, demostramos que la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células no malignas S1 podría inducir su transformación. La pérdida de la polaridad tisular, el aumento de la supervivencia y proliferación celulares y la inducción del switch angiogénico inducidos por la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN en las MECs estarían asociados a un aumento de la señalización vía ERK y AKT y un aumento de la expresión del uPAR.
7. Finalmente, identificamos un link importante entre polaridad tisular, señalización vía integrina $\alpha 5\beta 1$ -EGFR-uPAR, expresión del fenotipo angiogénico y dormición tumoral.

DISCUSSION

Definición de un modelo in vitro para el estudio de la transformación maligna de la mama

El cáncer de mama es la enfermedad neoplásica más comunmente diagnosticada entre las mujeres. Se ha postulado que el desarrollo del cáncer de mama sería un proceso de múltiples etapas que seguiría una secuencia definida de eventos cualitativamente diferentes, los que llevarían al desarrollo de hiperplasias ductales y atípicas, las cuales representan los primeros estadios del crecimiento neoplásico, carcinomas in situ, carcinomas invasivos y finalmente metástasis (Russo & Russo, 2001) (Figura 1).

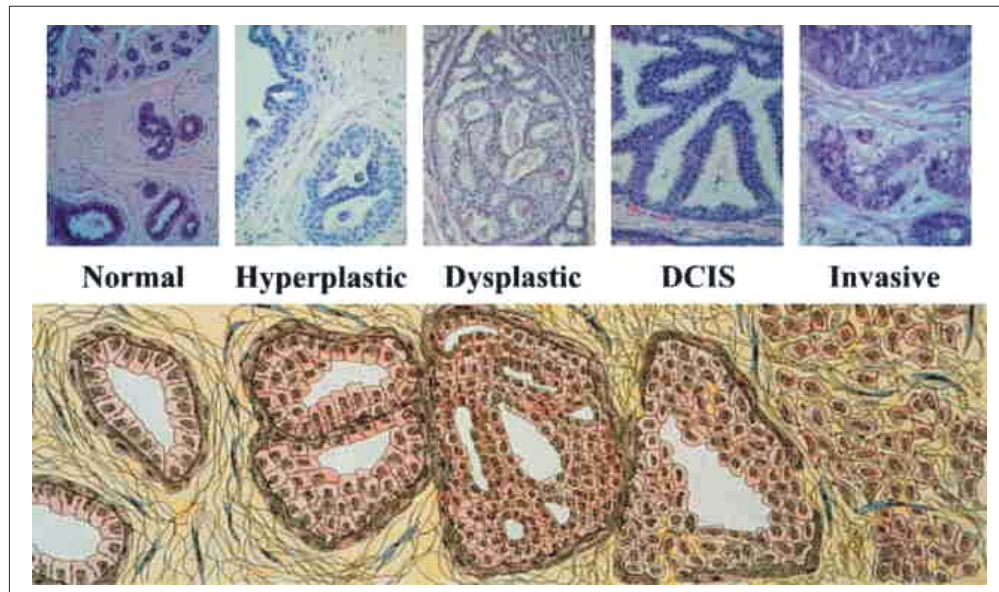


Figura 1. Progresión del cáncer de mama

Arriba: Tinción de H&E de secciones de tejido de mama normal, hiperplásica, displásica, DCIS y carcinoma invasivo. Abajo: representación esquemática de los acinos mamarios de cada uno de los estadios de la progresión tumoral, formados por MECs rodeadas de células mioepiteliales, dentro de una ECM incluyendo fibroblastos. Adaptado de Weaver et al, 1996 por V.M. Weaver (no publicado).

Resulta evidente que numerosos cambios moleculares acompañan la transición del fenotipo normal a uno pre-maligno y de éste a uno maligno in vivo. Y a pesar de que la mayoría de los cánceres de mama son de origen epitelial, la tumorigénesis es claramente un proceso complejo que involucra varios tipos celulares y factores humorales y un medio en constante cambio, los cuales no pueden ser fácilmente modelados en cultivo utilizando solamente células epiteliales (Bissell & Radisky, 2001). Debido a la falta de determinantes moleculares capaces de establecer qué lesiones poseen el potencial para transformarse en malignas, todas las lesiones ‘pre-malignas’, cuando son descubiertas, son tratadas de la misma manera, resultando en el sobre tratamiento de algunos pacientes.

Los estudios de perfiles moleculares como los análisis de expresión genética global, los perfiles de expresión proteica y las determinaciones de secuencias aberrantes recurrentes a lo amplio del genoma han comenzado a generar marcadores o perfiles asociados a estadios patológicos de la progresión tumoral (Buerger, 1999; Isola et al., 1999; Nishizaki et al., 1997; Nishizaki et al., 1997; Schoenberg Fejzo et al., 1998; Waldman et al., 2000). El mayor desafío para los investigadores es el de proveer información más allá de lo que se conoce actualmente por análisis morfológicos estándares. Para establecer la utilidad de estas metodologías en la identificación de lesiones pre-malignas de alto riesgo, sería necesario el estudio de grandes números de muestras de pacientes con un seguimiento clínico extendido. Pero el hecho de que las muestras de tejidos que acompañen la transformación maligna en un mismo paciente sean

extremadamente raras constituye un importante obstáculo en estos ensayos. La disponibilidad de muestras congeladas de tejidos de este tipo de pacientes necesaria para los estudios de expresión génica es aún más limitada. En ausencia de suficientes datos sobre el seguimiento y muestras de tejidos de estos pacientes, se requiere encontrar un método alternativo que permita evaluar la significancia del gran número de cambios moleculares asociados a los diferentes estadios patológicos de la enfermedad. Para esto podrían utilizarse modelos de cultivo de relevancia fisiológica, si y solo si pudiera comprobarse su relevancia en la progresión del cáncer in vivo. Se han hecho varios intentos para producir modelos pre-malignos modificando una única o unas pocas vías específicas por expresión de genes con propiedades oncogénicas, como Ras, T-antigen, hTERT o Erb-B2 (Dawson et al., 1996; Hahn et al., 1999; Kuperwasser et al., 2004; Muthuswamy et al., 2001). Dada la complejidad y heterogeneidad de la transformación neoplásica en la mama humana, este “targeted approach” serviría como un modelo útil (pero probablemente alejado de la realidad) de células pre-malignas. Por lo tanto, un modelo de transición ‘espontánea’ de pre-malignidad hacia malignidad sería particularmente útil para la disección de los determinantes moleculares de la progresión del cáncer de mama, ya que actualmente no existe ningún modelo como éste.

Una definición funcional de malignidad y pre-malignidad generalmente aceptada ha sido propuesta para lesiones obtenidas a partir de ratones transgénicos por un panel de expertos en patología (Borowsky, 2003; Cardiff, 2001): Si una lesión que aparece en un ratón genéticamente modificado crece de manera anormal dando lugar a tumores al ser

transplantada a la almohadilla de grasa mamaria vaciada del componente epitelial o en otro sitio no mamario como la piel de ratones nude, es considerada maligna. Si en cambio forma tumores solo en la almohadilla de grasa mamaria, pero no en sitios distantes, se la considera pre-maligna. Esta definición no es fácil de usar en el caso de tumores humanos, ya que existen varios tipos de tumores mamarios que no son capaces de crecer al ser transplantados a ratones nude. Unos pocos estudios han demostrado que podrían utilizarse los ratones SCID completamente inmunosuprimidos para crecer algunos tumores humanos con distintas probabilidades de éxito; pero a pesar de todo, este sistema no ha sido útil para el establecimiento de lesiones pre-malignas (Visonneau et al., 1998). Para líneas celulares humanas no existe un ensayo ampliamente aceptado para evaluar el comportamiento de células pre-malignas in vivo o en cultivo comparándolas con sus derivadas malignas. Cientos de líneas celulares malignas y unas pocas líneas celulares no malignas han sido descritas y se encuentran disponibles para su estudio, pero existe una falta de líneas celulares con características pre-malignas.

Por este motivo decidimos utilizar la serie celular de progresión de cáncer de mama HMT-3522 como un modelo de transición ‘espontánea’ de pre-malignidad a malignidad, para intentar definir los determinantes moleculares de la progresión del cáncer de mama.

En el Capítulo 1, definimos un modelo de cultivo celular compuesto por tres nuevas líneas celulares con características pre-malignas y aportamos evidencia detallada

de la posible utilidad de la línea celular S3-C como un modelo de DCIS in vitro (Figura 2). Confiamos en que este modelo será de utilidad para ayudarnos a entender cómo ocurre la progresión tumoral in vivo y para determinar las moléculas que son significativamente funcionales para la transición de un estado pre-maligno a uno maligno. En adición, la comparación entre las células S3-C y T4-2, así como sus contrapartes a ser aisladas en el futuro, podrían ser útiles para el descubrimiento de nuevos genes candidatos para utilizar como blancos en el tratamiento del cáncer de mama.

Para lograr esto, clonamos varias poblaciones ‘pre-malignas’ a partir de cultivos heterogéneos de células S2, utilizando como herramienta de screening el tamaño de las colonias y el nivel de organización de éstas en cultivos 3D rBM. De esta manera aislamos tres nuevas líneas celulares, S3-A, S3-B, y S3-C, a partir de colonias individuales de células S2, las cuales mantuvieron el tamaño, forma y organización en 3D rBM, y las cuales no fueron capaces de invadir a través de una rBM. Estas líneas celulares demostraron poseer un potencial tumorigénico intermedio entre las células S1 (no tumorigénicas) y las células T4-2 (tumorigénicas e invasivas). Más aun, demostramos la utilidad funcional de estas líneas celulares pre-malignas al probar que ciertas integrinas no solo se encontraban expresadas de manera diferencial entre las células S3 y las T4-2, sino que a su vez eran causales de la adquisición de invasividad en el estado maligno.

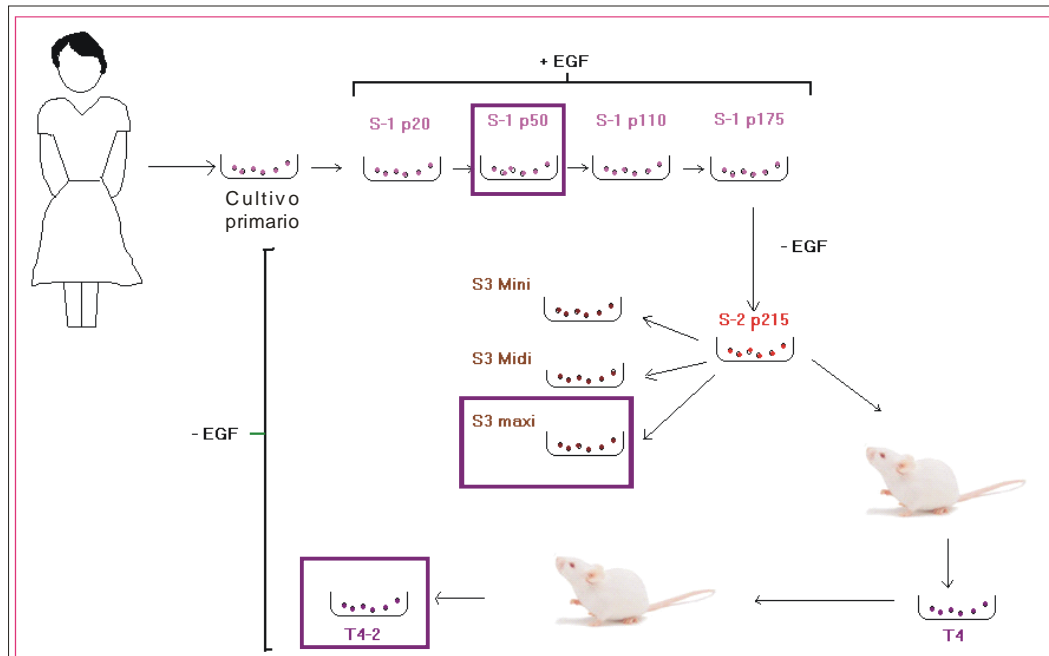


Figura 2. Serie celular de progresión de cáncer de mama HMT-3522

Las células no malignas S1 fueron derivadas de un mamoplastía y cultivadas in vitro en medio definido en presencia de EGF (20 ng/ ml). Luego de varios años de cultivo y utilizando un medio sin EGF, estas células dieron origen a las células pre-malignas S2, a partir de las cuales clonamos las líneas celulares S3-A, S3-B y S3-C. Finalmente, luego de subsiguientes años de cultivo, las células S2 dieron lugar a un tumor al ser transplantadas a un ratón nude, y las células aisladas a partir de este tumor fueron re-inyectadas en un ratón nude para dar lugar a la línea celular tumoral T4-2.

Las células pre-malignas aisladas y caracterizadas en este trabajo, junto con el sistema de cultivo en 3D rBM conformarían uno de los primeros modelos de pre-malignidad in vitro definidos clara y sistemáticamente, el cual debería ser de utilidad para estudios mecanísticos adicionales, como hemos demostrado. Dado que el sistema de cultivo en 3D rBM ha aportado modelos funcionales del comportamiento mamario normal y maligno tanto en sistemas celulares humanos como murinos (Bissell, 2003), y

que la selección de clones con características intermedias de diferenciación en 3D rBM puede generar células que asemejen el fenotipo de un DCIS (así como su genotipo; Ritzki et al 2005) in vivo, propusimos que este sistema serviría de punto de comienzo para modelar la progresión del cáncer de mama en cultivo. El co-cultivo de ECs junto con las MECs de nuestro sistema fue de gran utilidad para ayudarnos a demostrar el switch angiogénico que acompaña a la progresión tumoral. La adición de otros tipos celulares a este modelo de MECs en 3D, como células mioepiteliales y fibroblastos (Allinen et al., 2004; Gudjonsson et al., 2002), y eventualmente de células inmunes sería el próximo paso en el desarrollo de “tejidos pre-malignos” funcionales para modelar la progresión del cáncer de mama, relevantes para el entendimiento de lo que ocurre in vivo.

Transición pre-maligna a maligna

El cáncer de mama se caracteriza por perturbaciones en las interacciones epitelio-estroma. Consistentemente, los tumores y las líneas celulares mamarias exhiben alteraciones características en sus patrones de expresión de integrinas. Las integrinas han sido implicadas en varios aspectos de la progresión tumoral, incluyendo la supervivencia de las células tumorales, la inducción y activación de enzimas degradadoras de la matriz, la migración, y el anclaje en los sitios de metástasis. Y se cree que la expresión de varios receptores integrina en células de cáncer de mama estaría asociada con diferencias en el comportamiento metastásico (Lee & Juliano, 2002; Lee & Juliano, 2004).

Varios investigadores han demostrado que existe una respuesta desmoplástica asociada a la transformación maligna, y que ésta se caracteriza por la transdiferenciación de fibroblastos y la infiltración de células inmunes y ECs, y por alteraciones importantes en la composición y organización de la ECM, incluyendo la deposición de FN y TN (Schor & Schor, 2001; Sieweke et al., 1989)[Gailit, 1994 #418]; discutido en Ronnov-Jessen et al., 1996). Y consistentemente con lo observado en cánceres de mama in vivo, cuando las células en nuestro modelo progresan hacia la malignidad, muestran un aumento en la expresión de FN y de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Figura 1, Capítulo 2).

La integrina $\alpha 5\beta 1$ cumple una función fundamental en eventos biológicos complejos como la cicatrización de heridas, la adhesión y la invasión, propiedades que se encuentran alteradas en las células tumorales (Sheppard, 2000). Pero a pesar de la evidencia de que la FN y TN se encontrarían sobre-expresadas en el estroma de las lesiones de la mama, existen datos contradictorios acerca de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en estos tipos de cáncer, los cuales proponen que esta integrina podría perderse o no expresarse en el tumor primario (Su et al., 2002; Zutter et al., 1990). Una falla fundamental que encontramos en estos trabajos sería que estos autores utilizaron un solo tipo de Ab para cada una de las proteínas analizadas, sin considerar que las posibles diferencias entre los estados de activación de las integrinas podrían resultar en su no reconocimiento por Abs específicos. Estos autores tampoco estudiaron la presencia de ligandos específicos presentes en la ECM de las muestras analizadas. Por lo tanto, aún quedaría por determinar si las conclusiones obtenidas a partir de estos datos estarían

reflejando la heterogeneidad tumoral o las conformaciones alteradas de ciertos epitopes, como ha sido demostrado en el caso de la integrina $\beta 4$ (Diaz et al., 2004). En contraste, otros estudios como los de Koukoulis et al (1991) indicaron que mientras los niveles de expresión de la integrina $\alpha 5$ no parecieran encontrarse aumentados en tumores primarios, la integrina $\alpha 5$ se encontraba presente y elevada en la interfase entre el estroma rico en FN y el frente invasivo del tumor primario (Koukoulis et al., 1991). Otro factor importante a ser considerado cuando se analizan estos estudios sería la composición de la glándula mamaria: la proporción estroma/ epitelio es extremadamente alta, por lo tanto cuando se analizan glándulas mamarias enteras, el componente epitelial se “diluye”, haciendo su detección más difícil. Más aún, los niveles de expresión de una integrina no aportan la información necesaria acerca de su estado de activación y de la co-localización de sus ligandos. Un buen ejemplo de estos “caveats” es el estudio realizado por Meyer et al (1998), quienes demostraron que las líneas celulares mamarias que expresaban los receptores de VN, las integrinas $\alpha v\beta 1$ y $\alpha v\beta 5$, se adherían fuertemente a VN, mientras que las células mamarias normales MCF10A se adherían pobremente a este sustrato, más allá de exhibir los mismos niveles de expresión de los receptores de VN en su superficie celular (Meyer et al., 1998). Por lo tanto los datos antiguos deberían ser re-analizados.

Utilizando el modelo de pre-malignidad establecido en esta Tesis pudimos estudiar el rol de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la progresión del cáncer de mama. Obtuvimos evidencia que demostraría que la interacción entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la FN sería importante en la progresión del cáncer de mama, e identificamos algunos de los

mecanismos moleculares que podrían ser activados por esta interacción y que posiblemente serían responsables del mantenimiento del fenotipo tumoral. Estos mecanismos involucrarían la activación de AKT y ERK, y la expresión del uPAR, los cuales se demostró poseen importantes funciones en el cáncer de mama.

La integrina $\alpha 5\beta 1$ es el clásico receptor de FN (Figura 5), y cada vez más evidencia sugiere que la emergencia de la expresión de esta integrina se correlaciona con la progresión tumoral (Jia et al., 2004; Maschler et al., 2005). La FN y las integrinas cumplen una función crucial en una variedad de procesos morfogénéticos, en los que median la adhesión celular, la migración, y la transducción de señal. Inducen una organización transmembrana de moléculas de señalización y del citoesqueleto en complejos multimoleculares de más de 30 proteínas (Dedhar, 1995; Lafrenie & Yamada, 1998; Miyamoto et al., 1998). La organización de estos complejos es un proceso sinérgico que depende de la agregación y ocupación de las integrinas, así como de la fosforilación de tirosinas. Las integrinas también cooperan con receptores de factores de crecimiento para aumentar su señalización. La FN y las integrinas inducen varios efectos río abajo, incluyendo la estimulación de la actividad de factores de transcripción, la expresión de más de 30 genes (más de la mitad nuevos), y la expresión alterada de más de 100 proteínas. Así, FN e integrinas inducen una variedad de respuestas de señalización involucradas en la regulación de procesos cruciales para la morfogénesis normal, incluyendo la adhesión y la migración celular, y la expresión de genes específicos (Miyamoto et al., 1998). El estroma reactivo expresa niveles elevados de FN (Ioachim et

al., 2002), y las líneas de células tumorales, así como las células tumorales mamarias primarias también producen grandes cantidades de FN.

Nuestros datos demostraron que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN induciría la proliferación, la supervivencia y la invasión de las MECs por medio de la activación de la vía de señalización MEK/ERK, y por inducción de la expresión del VEGFR-1, el cual se encontraría involucrado en un loop autocrino de supervivencia (Figura 3).

El cross-talk entre el sistema de integrinas y el VEGFR es de fundamental importancia en ECs adheridas a vitronectina (ligando para la integrina $\alpha v\beta 3$), y la estimulación por VEGF de la síntesis de DNA y de la proliferación celular mediadas por VEGFR2 se han observado en una gran variedad de ECs (Soldi et al., 1999). El VEGF-A es considerado el más fundamental regulador de la angiogénesis y la vasculogénesis (Neufeld et al., 1999), y su expresión ha sido demostrada en células tumorales de varios cánceres humanos, incluyendo el cáncer de mama. El VEGF induce significativamente la actividad de la vía MAPK/ERK, la cual presumiblemente posee un papel central en la estimulación de la proliferación de las ECs. La respuesta mitogénica inducida por el VEGF también podría involucrar el cross-talk entre las vías ERK y JNK (discutido en Neufeld et al., 1999; Zachary & Glick, 2001). Más aún, la expresión de los VEGFRs flt-1 y KDR ha sido detectada en varios tipos de células no endoteliales, incluyendo células

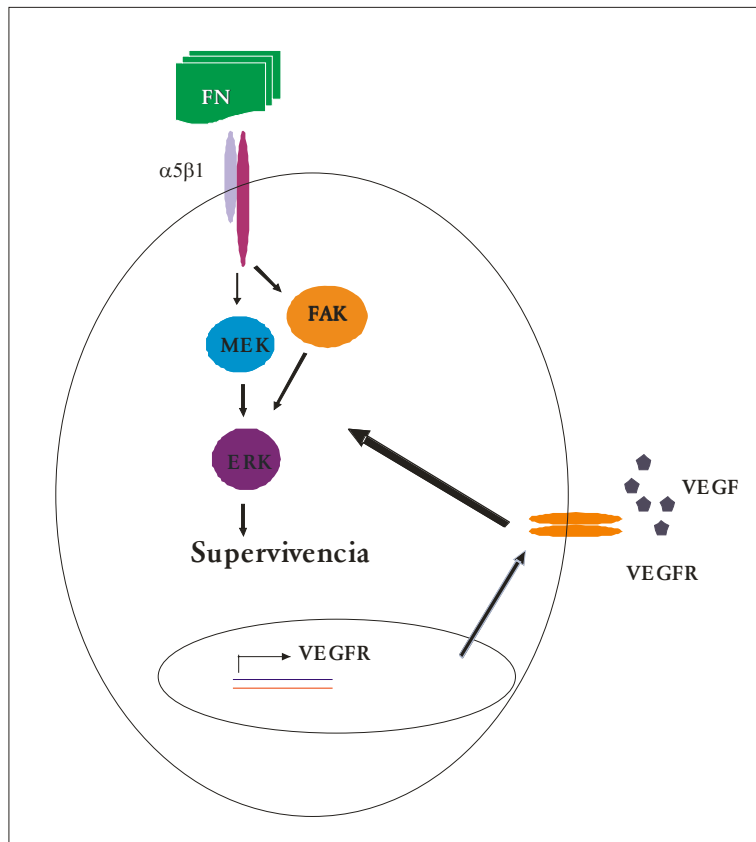


Figura 3. La interacción integrina $\alpha5\beta1$ - FN induce un loop autócrino de supervivencia que involucra la interacción entre *flt-1* y su ligando VEGF

La interacción integrina $\alpha5\beta1$ - FN induciría la expresión del VEGFR, el cual podría participar en un loop autocrino involucrando la estimulación de ERK por interacción *flt-1*- VEGF y llevando al aumento de la supervivencia de las células transformadas.

malignas como células de carcinomas de mama, melanoma y carcinomas ováricos, sugiriendo que el VEGF tendría un rol fisiológico en el cáncer, ejerciendo un efecto autócrino sobre las células malignas, mas allá de su rol en la angiogénesis (discutido en Arita et al., 2005) y (Mercurio et al., 2004). El *flt-1* ha sido también correlacionado con

un mayor riesgo de recurrencia local y de metástasis en pacientes con cáncer de mama (Dales et al., 2004).

Wulfing et al (2005) demostraron que mientras que las células mamarias normales y los DCIS puros no expresaban flt-1, ambos tipos celulares expresaban KDR y flt-4, pero solo las células pre-tumorales expresaban VEGF-A y VEGF-C (Wulfing et al., 2005). Interesantemente, opuesto al DCIS puro, DCISs que presentaban un carcinoma invasivo coexistente poseían una elevada expresión de flt-1, y esto era independiente del grado nuclear del tumor. Finalmente, mientras que el bFGF-R1 fue identificado tanto en células normales como en células de DCIS, en este caso la expresión de bFGF fue positiva solo en las células normales (Wulfing et al., 2005). Esto coincidiría con los descubrimientos de Teo et al (2002), quienes describieron la presencia de diferente densidad y fenotipo vascular en DCISs puros versus DCISs asociados a un carcinoma invasivo, mostrando los últimos altos números de vasos CD34+ y CD141+ y menor tinción para el FVIII (Teo et al., 2002).

Nuestros datos concordarían con esta hipótesis, ya que demostramos que el aumento de la supervivencia celular debido a la inducción de la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por las células pre-malignas S3-C induciría la expresión de flt-1 (Figura 5, Capítulo 2). Más aún, la inhibición de la interacción flt-1- VEGF interfirió con la supervivencia de las MECs transformadas e indujo la reversión del fenotipo tumoral en cultivos 3D rBM de las células T4-2 (Figura 6, Capítulo 2).

Rol de la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN en la progresión tumoral

El rol de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la cual posee un efecto tanto facilitatorio como inhibitorio sobre la migración celular, podría depender del tipo celular y de los componentes de la ECM (Kita et al., 2001). Y dependiendo del tipo celular, diferentes integrinas mediarán distintos eventos de señalización. En el caso de las células T4-2 de la serie celular HMT-3522, anticuerpos bloqueantes de la función de la integrina $\beta 1$ fueron capaces de ‘revertir’ los tumores para formar estructuras acinares en cultivo 3D rBM. Esto se asoció a la modulación negativa del EGFR en cultivos 3D rBM (pero no en monocapa), y se encontró que estaba mediado por la vía FAK/MAPK (Weaver et al., 1997).

En el Capítulo 2 de esta Tesis demostramos que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ inducía un aumento de la invasividad, migración y supervivencia de las células pre-malignas S3-C in vitro, así como un aumento de su potencial tumorigénico in vivo en ratones nude. A partir de nuestros datos propusimos que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría estar afectando el fenotipo celular vía la inducción del VEGFR flt-1, el cual podría funcionar en un loop autócrino de supervivencia (Figura 3). Encontramos que estos se correlacionaban con un switch angiogénico, caracterizado por el aumento de la expresión de VEGF e IL-8, la inducción de la angiogénesis in vitro e in vivo, y la inhibición de la capacidad angiogénica por reversión del fenotipo tumoral.

El switch angiogénico es considerado un paso crítico en la progresión tumoral y las metástasis (Folkman, 1992; Folkman & Shing, 1992). Y se ha demostrado que la angiogénesis se encuentra presente a partir del estado precanceroso de DCIS, durante el cual la expresión de VEGF se hace evidente (Wulfig et al., 2005).

Por lo tanto, la interacción VEGF- flt-1 podría influenciar la transición de un fenotipo pre-maligno a uno maligno. Nuestros estudios de expresión ectópica de integrinas demostraron que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN podría ser la responsable de la transformación maligna del DCIS, y que esta interacción, en cooperación con el VEGFR activado podría contribuir al fenotipo maligno por medio del aumento de la supervivencia y la proliferación celulares a través de vías de señalización dependientes de ERK, afectando así la arquitectura tisular. Esto demuestra la importancia de las interacciones epitelio- estroma en la definición del comportamiento normal o maligno de las MECs.

Dados los efectos de la expresión ectópica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre la migración, invasión y supervivencia de las células pre-malignas S3-C, decidimos analizar si la expresión de la integrina $\alpha 5$ sería suficiente para la transformación de las MECs no malignas S1.

En el Capítulo 3 demostramos que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ era suficiente para inducir la supervivencia de las células no malignas en agar blando y para interferir con la arquitectura tisular normal en 3D rBM en presencia de FN, in vitro así como in vivo. A pesar de esto, la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ per se no fue suficiente para estimular la invasión in vitro o el comportamiento maligno in vivo. Esto podría reflejar el hecho de que otras células presentes en el huésped (como células estromales incluyendo fibroblastos y células del sistema inmune como los macrófagos) podrían estar ejerciendo un control sobre la progresión tumoral. Nuestros experimentos demostraron que la integrina $\alpha 5\beta 1$ actuaba a través de la activación de las vías de señalización dependientes de PI3K y ERK (Figura 4).

De manera sorprendente, encontramos que podíamos revertir el fenotipo tumoral de las células T4-2 interfiriendo con la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ utilizando Ab bloqueantes (Figura 2, Capítulo 3). La inhibición de la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN en las células T4-2 fue suficiente para disminuir profundamente su tumorigenicidad, previniendo la angiogénesis e induciendo la apoptosis y necrosis tumorales in vivo (Figuras 5 y 6, Capítulo 3).

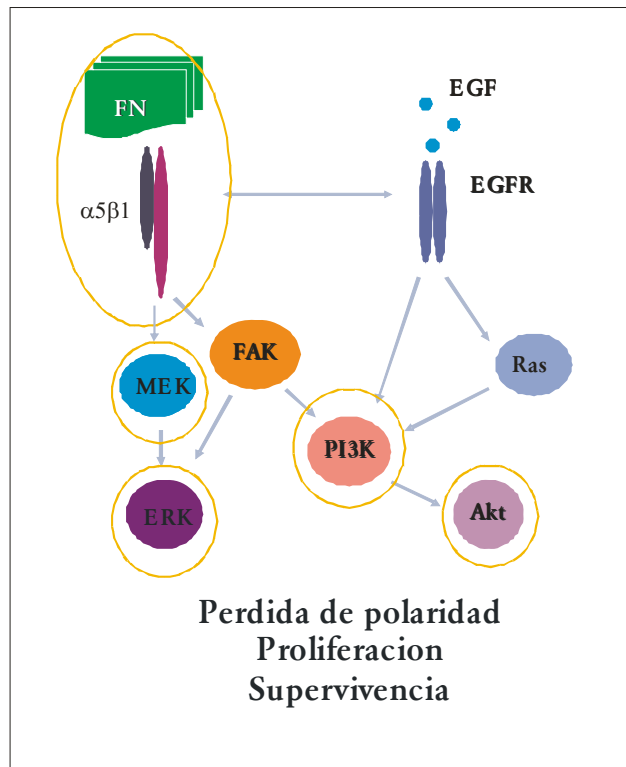


Figura 4. La interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN activa las vías de señalización dependientes de PI3K/AKT- y MEK/ERK

Las interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN/ EGFR inducirían las vías de señalización PI3K/ AKT y MEK/ ERK induciendo la pérdida de la polaridad y el aumento de la proliferación y la supervivencia, fundamentales para la transformación maligna.

Dormición tumoral

La dormición tumoral es una condición en la cual las células tumorales persisten en el huésped por extensos períodos de tiempo pero no crecen. Una de las ideas principales acerca de la dormición tumoral es que ésta se lograría a través del equilibrio entre proliferación y muerte debido a la importante apoptosis inducida por el sistema

inmune. En las primeras etapas del desarrollo tumoral, se considera que las células tumorales e inmunes se encuentran en un estado de equilibrio, y se han desarrollado modelos matemáticos que explican cómo el sistema inmune del huésped podría controlar el crecimiento o la dormición tumoral (Page & Uhr, 2005; Schirmacher, 2005). Alternativamente, la dormición tumoral podría ser el resultado de la falta de crecimiento de las células tumorales per se o a un balance entre proliferación y muerte.

Una segunda hipótesis propone al switch angiogénico como el regulador fundamental de la dormición tumoral. Trabajos pioneros realizados por Judah Folkman y colaboradores (Gimbrone et al., 1972) demostraron que la dormición tumoral podía alcanzarse con solo inhibir la angiogénesis. Y se ha determinado que en general existiría un estado pre-neoplásico discernible que podría perdurar varios años y que precedería al desarrollo del cáncer de mama (Kitadai et al., 2004). El “switch” de un estado pre-vascular pre-neoplásico a un estado neoplásico vascularizado podría derivar en un aumento de la tasa de crecimiento tumoral y en el desarrollo de metástasis. Una desventaja para el estudio de este switch es la limitada disponibilidad de muestras pre-neoplásicas reproducibles que logren representar todos los estadios durante el desarrollo tumoral. Utilizando un elegante modelo de transformación oncogénica de células β de páncreas, Folkman et al (1989) demostraron que la inducción de la angiogénesis precedería a la transformación de hiperplasia en neoplasia, y que esto podría deberse a un evento local por el cual algunos islotes de células escaparían al control ejercido por el

estroma normal sobre todas las poblaciones hiperplásicas y angiogénicas (Folkman et al., 1989).

Más aún, Udagawa et al (2002) encontraron que ciertas líneas celulares tumorales, al ser inyectadas en ratones, formaban lesiones microscópicas durmientes, las cuales mantenían su masa constante gracias a un balance entre proliferación y apoptosis, y que estos tumores durmientes eran avasculares. La inducción del crecimiento in vivo de estos tumores podía lograrse gracias a la expresión ectópica de Ras, el cual induciría la expresión de VEGF por las células tumorales, y el cual induciría a su vez una respuesta angiogénica que permitía el crecimiento tumoral (Udagawa et al., 2002).

Una tercera hipótesis se basa en la “Tissue organization field theory of carcinogenesis” (Teoría de la organización tisular como reguladora de la carcinogénesis) (Sonnenschein & Soto, 2000) y (Kenny & Bissell, 2003), la cual postula que el cáncer es una enfermedad de arquitectura tisular alterada. Por lo tanto, la dormición tumoral podría alcanzarse poniendo las células en el contexto correcto. De hecho, Mintz y colaboradores (1975) demostraron que se podían generar ratones “normales” a partir de células malignas de teratocarcinoma, lo que asociaría el compromiso a la malignidad con una alteración organizacional durante el desarrollo (Mintz & Illmensee, 1975). Alt-Holland et al (2005) demostraron que era posible reprogramar células con potencial neoplásico para que normalizaran su fenotipo cuando estas se encontraban presentes en un microambiente tisular normal, a través de claves estructurales y de orientación que les

servirían para dirigir su proliferación, diferenciación y apoptosis (Alt-Holland et al., 2005). Más aún, las interacciones célula- ECM son críticas para la organización tisular. Así, factores o condiciones que promuevan la diferenciación tisular, como por ejemplo moléculas de adhesión celulares, como integrinas y cadherinas que median la organización tisular y la diferenciación, inhibirían la expresión del fenotipo maligno. En trabajos anteriores demostramos que existe un cross-talk entre integrinas y receptores de factores de crecimiento, y que la inhibición de cualquiera de estas moléculas induce la dormición tumoral dependiente de la arquitectura tisular (Wang et al., 1998). De manera similar, Vaccariello y colegas (1999) mostraron que el fenotipo maligno de los keratinocitos transformados por Ras podía ser normalizado a través de la promoción de interacciones célula- célula (Vaccariello et al., 1999).

La dormición tumoral ha sido asociada a un déficit de uPAR, y los niveles de uPAR aumentan en el cáncer (Hildenbrand et al., 1999). Más aún, se ha demostrado que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ -uPAR a través del EGFR es necesaria para el crecimiento tumoral in vivo, y que la interferencia con la función de cualquiera de estos receptores podría inducir la dormición tumoral (Liu et al., 2002) en células de hepatocarcinoma.

Nosotros demostramos por primera vez que todos estos factores (estructura tisular, angiogénesis, proliferación, supervivencia y control inmune) podrían estar regulando la dormición tumoral de manera cooperativa. En el Capítulo 3, utilizamos las series celulares del modelo de progresión de cáncer de mama HMT3522 co-cultivadas

con ECs en combinación con ensayos en 3DrBM y manipulaciones in vivo en ratones nude, lo que nos permitió identificar un link recíproco entre la polaridad tisular, la señalización a través de interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ -EGFR-uPAR, la expresión de factores pro-angiogénicos y la dormición tumoral. También demostramos que la expresión ectópica y la activación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por su unión a FN eran suficientes para comprometer la morfogénesis tisular en MECs no malignas. Estos datos sugieren que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría ejercer un rol crítico en la transformación maligna, y que su expresión y activación serían incompatibles con la morfogénesis normal.

A partir de nuestro trabajo también puede inferirse un link putativo entre la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la supervivencia (Figura 3, Capítulo 2 y Figuras 2 y 3, Capítulo 3; crecimiento en agar blando). Nuestra observación de que la activación de AKT se encontraba sostenida en presencia de este link sugeriría que la supervivencia dependería de la señalización vía PI3K. Para explorar esta posibilidad deberán conducirse estudios adicionales.

Distintas moléculas pro-angiogénicas se encuentran reguladas positivamente durante la progresión tumoral, y esto ha sido relacionado al ambiente hipóxico creado por las células tumorales en constante proliferación (Xu et al., 2004). A su vez, las vías MEK/ERK y PI3K/AKT han sido asociadas positivamente con la producción de VEGF y/o IL-8 por distintas líneas de células tumorales (Bancroft et al., 2002; Chelouche-Lev et al., 2004; Sparmann & Bar-Sagi, 2004). Coincidentemente con la estimulación de la

función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ observamos un aumento en la secreción de las moléculas pro-angiogénicas VEGF e IL-8 (Figura 6, Capítulo 3). El modelo propuesto para este switch angiogénico se encuentra representado en la Figura 5.

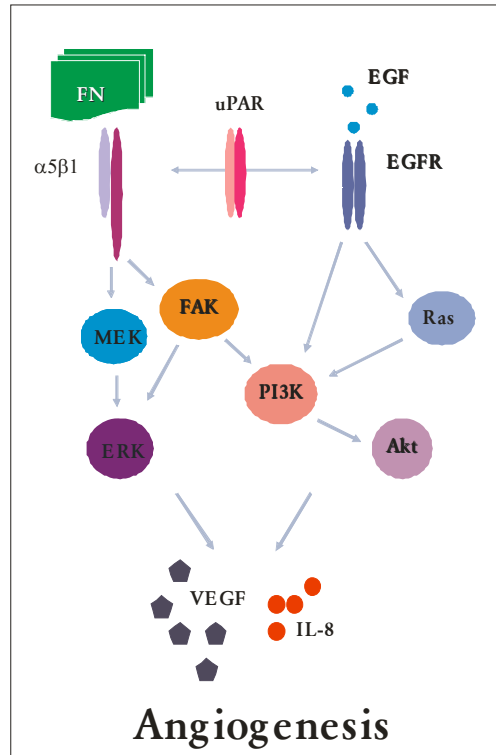


Figura 5. La interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN induce la expresión de VEGF e IL-8

Las interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN/ EGFR inducirían las vías de señalización PI3K/ AKT y MEK/ ERK llevando al aumento de la expresión de VEGF e IL-8, los cuales promoverían el switch angiogénico necesario para la progresión tumoral.

Finalmente, encontramos que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ se correlacionaba con el aumento de la expresión de uPAR en la superficie celular, y que ya fuera la inhibición de la función del uPAR, de la integrina $\alpha 5\beta 1$ o del EGFR, lograban reprimir

consistentemente la capacidad de las células tumorales de sobrevivir en ausencia de anclaje. Es importante notar que los mecanismos moleculares que gobiernan estos procesos aún deben ser examinados. Los resultados aquí presentados, que demostrarían una clara asociación entre uPAR, EGFR, y la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Figura 6), podrían explicar los resultados de Aguirre Ghiso y colaboradores, quienes demostraron que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - uPAR regularía la dormición tumoral a través del EGFR (Aguirre-Ghiso et al., 2003; Liu et al., 2002). Por lo tanto, esta vía también debería ser reprimida durante la dormición tumoral asociada a la arquitectura tisular.

Consistentemente con el link entre la expresión de uPAR y un fenotipo pre-maligno más agresivo y un pobre pronóstico, los datos aquí presentados ofrecen a su vez una explicación plausible para el aumento de uPAR en asociación con DCISs más agresivos, y sugieren que la expresión de uPAR en la enfermedad pre-maligna podría servir como un buen indicador para pronosticar el switch angiogénico. Estos datos también servirían para explicar por qué los tumores primarios con altos niveles de expresión de uPA y uPAR poseen un tan negativo pronóstico (Duffy, 1990); discutido en Han et al., 2005).

Dado que las interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN han sido implicadas en la ramificación morfogenética de la glándula mamaria durante el embarazo, la asociación entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la función del uPAR podría explicar los defectos en el desarrollo de las glándulas mamarias de ratones knock out para el plasminógeno o para el

PAI (Bajou et al., 2001; Bajou et al., 1998; Lund et al., 2000). Efectivamente, el link encontrado en este trabajo entre la arquitectura tisular y la regulación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría proveer una explicación plausible del fenotipo mótil observado durante el desarrollo de la glándula mamaria.

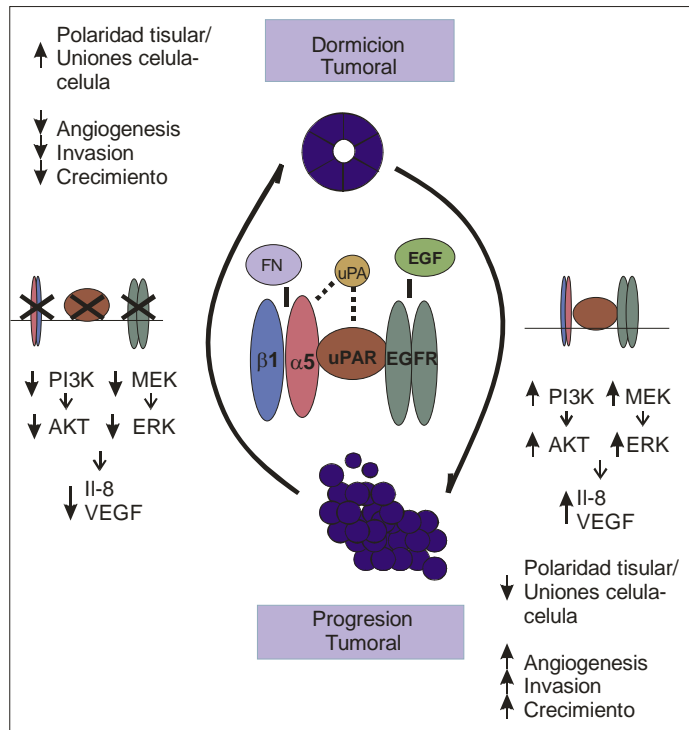


Figura 6. Regulación de la arquitectura tisular, la angiogénesis y la dormición tumoral vía interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - uPAR- EGFR

Modelo propuesto: la estimulación de las interacciones entre integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN/ uPAR/ EGFR induce las vías de señalización PI3K/ AKT y MEK/ ERK, llevando al aumento de la expresión de VEGF e IL-8, aumentando la supervivencia e induciendo la pérdida de polaridad, los cuales podrían promover el switch angiogénico, llevando finalmente a la transformación tumoral. La inhibición de cualquiera de estos receptores (integrina $\alpha 5\beta 1$, uPAR o EGFR) podría potencialmente inducir la dormición tumoral gracias a la restauración de la estructura tisular normal y la inhibición de la angiogénesis.

El mecanismo preciso que asocia la señalización de la integrina $\alpha 5\beta 1$, el uPAR y el EGFR a través de PI3K y ERK deberá ser definido en el futuro.

Nuestros resultados se apoyan en la hipótesis de que la inducción de VEGF podría estar mediada por PI3K y mTOR (como ha sido demostrado por varios autores [(Mayerhofer et al., 2005; Mayerhofer et al., 2002)]; y que la expresión de la IL-8 podría ser inducida a través de la activación de ERK y la inducción del factor de transcripción AP-1 (activator protein-1), como fue establecido previamente por Hoffman et al (2005), quienes reportaron efectos sinérgicos de c-Fos y NF- κ B en la activación transcripcional del gen de la IL-8 (Hoffmann et al., 2005). De hecho, numerosos genes inmunoregulatorios e inflamatorios presentan sitios de unión para el factor de transcripción AP-1, pero el mecanismo preciso por el cual AP-1 activa o reprime los genes de la respuesta inmune y en particular los roles de las subunidades individuales de AP-1 en las respuestas inflamatorias siguen siendo grandes interrogantes.

En conclusión, estos datos sugieren que la integrina $\alpha 5\beta 1$ estaría involucrada en la conversión de un fenotipo normal a uno pre-maligno, y que la inhibición de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría inducir la dormición tumoral. Y esto, junto con nuestras observaciones en el Capítulo 2 de que la integrina $\alpha 5\beta 1$ también poseería una función fundamental en la transición de pre-malignidad a malignidad, sugiere que la integrina $\alpha 5\beta 1$ tendría un rol muy prominente en la transformación maligna.

Este trabajo demostró también el link putativo entre uPA-uPAR y la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Figura 7, Capítulo 3), el cual podría estar involucrado en la pérdida de la arquitectura tisular y el desarrollo de metástasis. De hecho, la integrina $\alpha 5\beta 1$ se encuentra expresada en la enfermedad metastásica de la mama así como en otros tumores que metastatizan, y se ha postulado que esta integrina podría promover la angiogénesis a través de la regulación de la expresión de VEGF (Chen et al., 2004). Esta observación podría ser cierta también para la asociación que observamos entre la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la progresión tumoral y la expresión de IL-8. Más aún, nuestros resultados indicarían que la diferenciación tisular podría estar ligada funcionalmente a los mecanismos de dormición metastásica, sugiriendo que si fuéramos capaces de delinear los mecanismos moleculares por los cuales las células entran en dormición en un tejido, esto podría revelar nuevos puntos de vista sobre cómo se induce la dormición tumoral. A pesar de que en esta Tesis no pudimos estudiar el rol de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la formación de metástasis, nuestros datos demostraron que la expresión de este receptor induciría el aumento de la supervivencia, migración, invasión y angiogénesis y la expresión del uPAR, lo cual indicaría que la interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN podría poseer un rol fundamental en la enfermedad metastásica. Por lo tanto, pensamos que sería de gran importancia continuar con estos estudios.

Estos datos en su conjunto implican que no existiría un único factor que controla el estado tumoral, sino que se trataría de varios factores interconectados que se regularían mutuamente de manera constata. Creemos que estos resultados son prometedores, ya que

implicarían que la dormición tumoral podría ser inducida y mantenida por diferentes medios, aportando más opciones de tratamientos para combatir el cáncer (Figura 7).

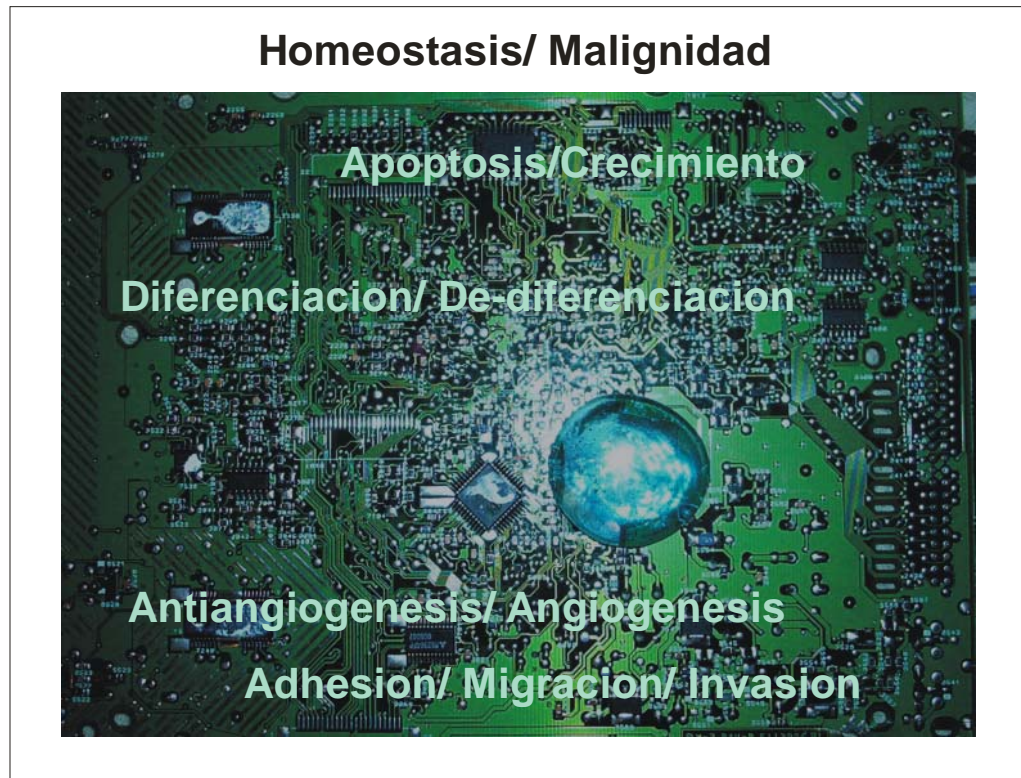


Figura 7. El equilibrio entre la homeostasis normal y la malignidad depende de varios factores

Representación del complejo circuito que controla la homeostasis tisular. Dependiendo del balance entre apoptosis y crecimiento, diferenciación y pérdida de diferenciación, anti-angiogénesis y angiogénesis, y adhesión, migración e invasión, un tejido podría mantener su homeostasis o perder su polaridad y transformarse en un tumor maligno.

Por último, me gustaría remarcar el hecho de que numerosos datos experimentales sugieren que en el epitelio mamario existirían células pluripotenciales auto-renovables. Estas células serían blancos probables para la transformación maligna y podrían encontrarse en el origen de los tumores mamarios. Debido a que distintas integrinas han

demostrado poseer funciones importantes en la determinación del destino de las células progenitoras (stem cells), una pregunta que esperamos poder contestar en el futuro es si las integrinas se encontrarían involucradas en el control de las poblaciones de células progenitoras en la glándula mamaria, y si su expresión se encontraría modificada en dichas células. Debido a limitaciones de tiempo y de enfoque, no nos fue posible investigar el rol de las células progenitoras en la progresión del cáncer de mama en nuestro modelo, pero creemos que esta sería otra manera interesante de continuar nuestros estudios.

REFERENCIAS

Aguirre Ghiso, J. A., Alonso, D. F., Farias, E. F., Gomez, D. E., & Bal de Kier Joffe, E. (1999). Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production: Its relationship with the invasive phenotype. *Eur J Biochem* 263, 295-304.

Aguirre-Ghiso, J. A., Estrada, Y., Liu, D., & Ossowski, L. (2003). ERK/MAPK Activity as a Determinant of Tumor Growth & Dormancy; Regulation by p38SAPK. *Cancer Res* 63, 1684-1695.

Akiyama, S., Olden, K., & Yamada, K. (1995). Fibronectin & integrins in invasion & metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 173-89.

Alford, D., & Taylor-Papadimitriou, J. (1996). Cell adhesion molecules in the normal & cancerous mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1, 207-18.

Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W., & Polyak, K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6, 17-32.

Allred, D. C., & Medina, D. (2000). Introduction: Models of Premalignant Breast Disease. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* 5, 339-340.

Allred, D. C., & Mohsin, S. K. (2000). Biological Features of Premalignant Disease in the Human Breast. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* 5, 351-364.

Alt-Holland, A., Zhang, W., Margulis, A., & Garlick, J. (2005). Microenvironmental control of premalignant disease: the role of intercellular adhesion in the progression of squamous cell carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 15, 84-96.

Arita, S., Kikkawa, F., Kajiyama, H., Shibata, K., Kawai, M., Mizuno, K., Nagasaka, T., Ino, K., & Nomura, S. (2005). Prognostic importance of vascular endothelial growth factor & its receptors in the uterine sarcoma. *International Journal of Gynecological Cancer* 15, 329-336.

Arroyo, A., Garcia-Pardo, A., & Sanchez-Madrid, F. (1993). A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti-beta 1 chain monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 268, 9863-9868.

Bachelder, R. E., Crago, A., Chung, J., Wendt, M. A., Shaw, L. M., Robinson, G., & Mercurio, A. M. (2001). Vascular Endothelial Growth Factor Is an Autocrine Survival Factor for Neuropilin-expressing Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res* 61, 5736-5740.

Bachelder, R. E., Wendt, M. A., & Mercurio, A. M. (2002). Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Breast Carcinoma Invasion in an Autocrine Manner by Regulating the Chemokine Receptor CXCR4. *Cancer Res* 62, 7203-7206.

Badve, S., A'Hern, R., Ward, A., Millis, R., Pinder, S., Ellis, I., Gusterson, B., & Sloane, J. (1998). Prediction of local recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast using five histological classifications: a comparative study with long follow-up. *Hum Pathol.* 29, 915-23.

Bai, M., Agnantis, N., Kamina, S., Demou, A., Zagorianakou, P., Katsaraki, A., & Kanavaros, P. (2001). In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 3, 276 - 283.

Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Schmitt, P. M., Albert, V., Praus, M., Lund, L. R., Frandsen, T. L., Brunner, N., Dano, K., Fusenig, N. E., Weidle, U., Carmeliet, G., Loskutoff, D., Collen, D., Carmeliet, P., Foidart, J. M., & Noel, A. (2001). The Plasminogen Activator Inhibitor PAI-1 Controls In Vivo Tumor Vascularization by Interaction with Proteases, Not Vitronectin: Implications for Antiangiogenic Strategies. *J. Cell Biol.* 152, 777-784.

Bajou, K., Noel, A., Gerard, R., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N., Carmeliet, P., Collen, D., & Foidart, J. (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion & vascularization. *Nat Med.* 4, 923-8.

Bancroft, C., Chen, Z., Yeh, J., Sunwoo, J., Yeh, N., Jackson, S., Jackson, C., & Van Waes, C. (2002). Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K & MEK signal kinases on NF-kappaB & AP-1 activation & IL-8 & VEGF expression in human head & neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer.* 99, 538-48.

Barcellos-Hoff, M. H., & Ravani, S. A. (2000). Irradiated Mammary Gland Stroma Promotes the Expression of Tumorigenic Potential by Unirradiated Epithelial Cells. *Cancer Res* 60, 1254-1260.

Bartsch, J., Staren, E., & Appert, H. (2003). Adhesion & migration of extracellular matrix-stimulated breast cancer. *J Surg Res.* 110, 287-94.

Bergers, G., & Coussens, L. (2000). Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev.* 10, 120-7.

- Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K., Folkman, J., & Hanahan, D. (1999). Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284, 808-12.
- Berry, M., Goode, A., Puddefoot, J., Vinson, G., & Carpenter, R. (2003). Integrin beta1-mediated invasion of human breast cancer cells: an ex vivo assay for invasiveness. *Breast Cancer* 10, 214-9.
- Bill, H. M., Knudsen, B., Moores, S. L., Muthuswamy, S. K., Rao, V. R., Brugge, J. S., & Miranti, C. K. (2004). Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Regulation of Integrin-Mediated Signaling & Cell Cycle Entry in Epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8586-8599.
- Bissell, M., Rizki, A, Mian, IS. (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 753-62.
- Bissell, M. J., Radisky, Derek C., Rizki, Aylin, Weaver, Valerie M., Petersen, Ole W. (2002). The organizing principle: microenvironmental influences in the normal & malignant breast. *Differentiation* 70, 537-46.
- Boocock, C., Charnock-Jones, DS, Sharkey, AM, McLaren, J, Barker, PJ, Wright, KA, Twentyman, PR, Smith, SK. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor & its receptors flt & KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 87, 506-16.
- Borowsky, A. (2003). Genetically engineering a mouse. *Comp Med.* 53, 249-50.
- Boudreau, N., Sympton, CJ, Werb, Z, Bissell, MJ. (1995). Suppression of ICE & apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267, 891-3.
- Boudreau, N., Werb, Z., & Bissell, M. J. (1996). Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization & withdrawal from the cell cycle. *PNAS* 93, 3509-3513.
- Brakebusch, C., Bouvard, D., Stanchi, F., Sakai, T., & Fassler, R. (2002). Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest.* 109, 999-1006.
- Briand, P., Petersen, OW, Van Deurs, B. (1987). A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated & propagated in chemically defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol.* 23, 181-8.
- Briand, P., Nielsen, KV, Madsen, MW, Petersen, OW. (1996). Trisomy 7p & malignant transformation of human breast epithelial cells following epidermal growth factor withdrawal. *Cancer Res.* 56, 2039-44.

Brooks, P., Strömblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, FH. & Cheresch, DA. (1995). Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth & angiogenesis in human skin. *J Clin Invest.* *96*, 1815-1822.

Brooks, P., Clark, RA, Cheresch, DA. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* *264*, 569-71.

Brown, P., Bloxidge, RE, Anderson, E, Howell, A. (1993). Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* *11*, 183-9.

Buerger, H., Otterbach, Friedrich, Simon, Ronald, Schäfer, Karl-Ludwig, Poremba, Christopher, Diallo, Raihanatou, Brinkschmidt, Christian, Dockhorn-Dworniczak, Barbara, Boecker, Werner (1999). Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *The Journal of Pathology* *189*, 521-526.

Cardiff, R. D. (2001). Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: Comparative pathology. *Microscopy Research & Technique* *52*, 224-230.

Chambers, A., Naumov, G., Varghese, H., Nadkarni, K., MacDonald, I., & Groom, A. (2001). Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am.* *10*, :243-55, vii.

Chelouche-Lev, D., Miller, C., Tellez, C., Ruiz, M., Bar-Eli, M., & Price, J. (2004). Different signalling pathways regulate VEGF & IL-8 expression in breast cancer: implications for therapy. *Eur J Cancer* *40*, 2509-18.

Chen, J., De, S., Brainard, J., & Byzova, T. (2004). Metastatic properties of prostate cancer cells are controlled by VEGF. *Cell Commun Adhes.* *11*, 1-11.

Chen, J., Diacovo, T. G., Grenache, D. G., Santoro, S. A., & Zutter, M. M. (2002). The α_2 Integrin Subunit-Deficient Mouse : A Multifaceted Phenotype Including Defects of Branching Morphogenesis & Hemostasis. *Am J Pathol* *161*, 337-344.

Chodak, G., Haudenschild, C., Gittes, R., & Folkman, J. (1980). Angiogenic activity as a marker of neoplastic & preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg.* *192*, 762-71.

Chung, J., Bachelder, R. E., Lipscomb, E. A., Shaw, L. M., & Mercurio, A. M. (2002). Integrin ($\alpha_6\beta_4$) regulation of eIF-4E activity & VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J. Cell Biol.* *158*, 165-174.

Colomer, R., Aparicio, J., Montero, S., Guzman, C., Larrodera, L., & Cortes-Funes, H. (1997). Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 76, 1215–1220.

Condeelis, J., & Segall, J. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 3, 921-30.

Cress, A., Rabinovitz, I., Zhu, W., & Nagle, R. (1995). The alpha 6 beta 1 & alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 219-28.

Dales, J., Garcia, S., Carpentier, S., Andrac, L., Ramuz, O., Lavaut, M., Allasia, C., Bonnier, P., & Taranger-Charpin, C. (2004). Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek & CD105 expression in breast cancer (n=905). *Br J Cancer* 90, 1216-21.

Damjanovich, L., Fulop, B., Adany, R., & Nemes, Z. (1997). Integrin expression on normal & neoplastic human breast epithelium. *Acta Chir Hung.* 36, 69-71.

Damsky, C., Tremble, P., & Werb, Z. (1992). Signal transduction via the fibronectin receptor: do integrins regulate matrix remodeling? *Matrix Suppl.* 1, 184-91.

Danen, E., Lafrenie, R., Miyamoto, S., & Yamada, K. (1998). Integrin signaling: cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, & regulation of gene expression. *Cell Adhes Commun.* 6, 217-24.

Daniel, C., & Silberstein, G. (1987). Postnatal development of the rodent mammary gland. In *The mammary gland: development, regulation, & function.*, D. C. Neville MC, ed. (New York: Plenum Press), pp. 3–36.

Dawson, P., Wolman, S., Tait, L., Heppner, & GH, M., FR. (1996). MCF10AT: a model for the evolution of cancer from proliferative breast disease. *Am J Pathol.* 148, 313-9.

Dedhar, S. (1995). Integrin mediated signal transduction in oncogenesis: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 165-72.

Delannoy-Courdent, A., Mattot, V., Fafeur, V., Fauquette, W., Pollet, I., Calmels, T., Vercamer, C., Boilly, B., Vandebunder, B., & Desbiens, X. (1998). The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity & cell motility, & impairs normal tubulogenesis & cancerous scattering in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 111, 1521-1534.

Delcommenne, M., & Streuli, C. H. (1995). Control of Integrin Expression by Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* 270, 26794-26801.

Demicheli, R., Retsky, M., Swartzendruber, D., & Bonadonna, G. (1997). Proposal for a new model of breast cancer metastatic development. *Ann Oncol.* 8, 1075-80.

Diaz, L. K., Zhou, X., Welch, K., Sahin, A., & Gilcrease, M. Z. (2004). Chromogenic In Situ Hybridization for $\alpha_6\beta_4$ Integrin in Breast Cancer: Correlation with Protein Expression. *J Mol Diagn* 6, 10-15.

Dickson, R. B. (1996). Biochemical control of breast development. In *Disease of the Breast*, J. R. Harris, Lippman, .E., Morrow, M. & Hellman, S., ed. (Philadelphia, pp. 15-27.

Djonov, V., Andres, A.-C., & Ziemiecki, A. (2001). Vascular remodelling during the normal & malignant life cycle of the mammary gland. *Microscopy Research & Technique* 52, 182-189.

Dosne Pasqualini, C. (1996). A retrospective view of tumor immunology. *Medicina (B Aires)*. 56, 3-12.

Duffy, M. (1990). Plasminogen activators & cancer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1, 681-7.

Edwards, G., & Streuli, C. (1995). Signalling in extracellular-matrix-mediated control of epithelial cell phenotype. *Biochem Soc Trans.* 23, 464-8.

Engels, K., Fox, S. B., Whitehouse, R. M., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (1997). Distinct Angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. *The Journal of Pathology* 181, 207-212.

Fata, J., Werb, Z., & Bissell, M. (2004). Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix & its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res* 6, 1 - 11.

Felding-Habermann, B. (2003). Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 20, 203-213.

Fendrick, J., Raafat, A., & Haslam, S. (1998). Mammary gland growth & development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny & regulation in the mouse. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 7-22.

Fidler, I. (1990). Host & tumour factors in cancer metastasis. *Eur J Clin Invest.* 20, 481-6.

Fidler, I. (2002). The organ microenvironment & cancer metastasis. *Differentiation.* 70, 498-505.

- Folkman, J. (1992). The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 3, 65-71.
- Folkman, J. (1974). Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1974, 331-58.
- Folkman, J., & Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345-9.
- Folkman, J., & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 10931-10934.
- Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., & Hanahan, D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339, 58-61.
- Foos, G., & Hauser, C. (2000). Altered Ets transcription factor activity in prostate tumor cells inhibits anchorage-independent growth, survival, & invasiveness. *Oncogene* 19, 5507-16.
- Friedrichs, K., Ruiz, P., Franke, F., Gille, I., Terpe, H., & Imhof, B. (1995). High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res.* 55, 901-6.
- Frisch, S., & Screaton, R. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 555-62.
- Fujita, S., Suzuki, H., Kinoshita, M., & Hirohashi, S. (1992). Inhibition of cell attachment, invasion & metastasis of human carcinoma cells by anti-integrin beta 1 subunit antibody. *Jpn J Cancer Res.* 83, 1317-26.
- Fujita, S., Watanabe, M., Kubota, T., Teramoto, T., & Kitajima, M. (1995). Alteration of expression in integrin beta 1-subunit correlates with invasion & metastasis in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 91, 145-9.
- George, E., Georges-Labouesse, E., Patel-King, R., Rayburn, H., & Hynes, R. (1993). Defects in mesoderm, neural tube & vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119, 1079-1091.
- Gimbrone, M. A., Jr., Leapman, S. B., Cotran, R. S., & Folkman, J. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* 136, 261-276.
- Goldman, C. K., Kendall, R. L., Cabrera, G., Soroceanu, L., Heike, Y., Gillespie, G. Y., Siegal, G. P., Mao, X., Bett, A. J., Huckle, W. R., Thomas, K. A., & Curiel, D. T. (1998). Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, & mortality rate. *PNAS* 95, 8795-8800.

Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., Stanley, E. R., Segall, J. E., & Condeelis, J. S. (2005). Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop. *Cancer Res* 65, 5278-5283.

Gould, V., Koukoulis, G., & Virtanen, I. (1990). Extracellular matrix proteins & their receptors in the normal, hyperplastic & neoplastic breast. *Cell Differ Dev.* 32, 409-16.

Graeven, U., Fiedler, W., Karpinski, S., Ergan, S. I., Kilic, N., Rodeck, U., Schmiegel, W., & Hossfeld, D. K. (1999). Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor & its receptors FLT-1 & KDR. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology* 125, 621-629.

Grunstein, J., Roberts, W. G., Mathieu-Costello, O., Hanahan, D., & Johnson, R. S. (1999). Tumor-derived Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Is a Critical Factor in Tumor Expansion & Vascular Function. *Cancer Res* 59, 1592-1598.

Gudjonsson, T., Ronnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M. J., & Petersen, O. W. (2002). Normal & tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity & basement membrane deposition. *J Cell Sci* 115, 39-50.

Gui, G., Puddefoot, J., Vinson, G., Wells, C., & Carpenter, R. (1997). Altered cell-matrix contact: a prerequisite for breast cancer metastasis? *Br J Cancer.* 75, 623-33.

Hahn, W., Counter, C., Lundberg, A., Beijersbergen, R., Brooks, M., & Weinberg, R. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-8.

Han, B., Nakamura, M., Mori, I., Nakamura, Y., & Kakudo, K. (2005). Urokinase-type plasminogen activator system & breast cancer (Review). *Oncol Rep.* 14, 105-12.

Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer.. *Cell* 100, 57-70.

Hannigan, G., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J., & Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion & anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379, 91-6.

Hart, I. R. (1999). Perspective: tumour spread - the problems of latency. *The Journal of Pathology* 187, 91-94.

- Hashizume, R., Koizumi, H., Ihara, A., Ohta, T., & Uchikoshi, T. (1996). Expression of beta-catenin in normal breast tissue & breast carcinoma: a comparative study with epithelial cadherin & alpha-catenin. *Histopathology* 29, 139-46.
- Haslam, S., & Woodward, T. (2001). Tumour-stromal interactions: Reciprocal regulation of extracellular matrix proteins & ovarian steroid activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res* 3, 365 - 372.
- Herron, G., Banda, M., Clark, E., Gavrilovic, J., & Werb, Z. (1986). Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase & stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261, 2814-2818.
- Hildenbrand, R., Dilger, I., Horlin, A., & Stutte, H. (1995). Urokinase & macrophages in tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 72, 818-23.
- Hildenbrand, R., Wolf, G., Bohme, B., Bleyl, U., & Steinborn, A. (1999). Urokinase plasminogen activator receptor (CD87) expression of tumor-associated macrophages in ductal carcinoma in situ, breast cancer, & resident macrophages of normal breast tissue. *J Leukoc Biol* 66, 40-49.
- Hoffmann, E., Thiefes, A., Buhrow, D., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Resch, K., & Kracht, M. (2005). MEK1-dependent Delayed Expression of Fos-related Antigen-1 Counteracts c-Fos & p65 NF- κ B-mediated Interleukin-8 Transcription in Response to Cytokines or Growth Factors. *J. Biol. Chem.* 280, 9706-9718.
- Hovey, R. C., Trott, J. F., & Vonderhaar, B. K. (2002). Establishing a Framework for the Functional Mammary Gland: From Endocrinology to Morphology. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* 7, 17-38.
- Howeedy, A., Virtanen, I., Laitinen, L., Gould, N., Koukoulis, G., & Gould, V. (1990). Differential distribution of tenascin in the normal, hyperplastic, & neoplastic breast. *Lab Invest.* 63, 798-806.
- Howlett, A., Bailey, N., Damsky, C., Petersen, O., & Bissell, M. (1995). Cellular growth & survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. *J Cell Sci* 108, 1945-1957.
- Hu, Y., Sun, H., Drake, J., Kittrell, F., Abba, M. C., Deng, L., Gaddis, S., Sahin, A., Baggerly, K., Medina, D., & Aldaz, C. M. (2004). From Mice to Humans: Identification of Commonly Deregulated Genes in Mammary Cancer via Comparative SAGE Studies. *Cancer Res* 64, 7748-7755.

- Hwang, E., & Esserman, L. (1999). Management of ductal carcinoma in situ. *Surg Clin North Am*, 9, 1007-30, viii.
- Hynes, R. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- Hynes, R. (1992). Integrins: versatility, modulation, & signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- Ioachim, E., Charchanti, A., Briasoulis, E., Karavasilis, V., Tsanou, H., Arvanitis, D., Agnantis, N., & Pavlidis, N. (2002). Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV & laminin in breast cancer: their prognostic value & role in tumour invasion & progression. *Eur J Cancer* 38, 2362.
- Isola, J., Chu, L., DeVries, S., Matsumura, K., Chew, K., Ljung, B. M., & Waldman, F. M. (1999). Genetic Alterations in ERBB2-amplified Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 5, 4140-4145.
- Jensen, R., Dupont, W., & Page, D. (1993). Diagnostic criteria & cancer risk of proliferative breast lesions. *J Cell Biochem Suppl.*, 59-64.
- Jia, Y., Zeng, Z.-Z., Markwart, S. M., Rockwood, K. F., Ignatoski, K. M. W., Ethier, S. P., & Livant, D. L. (2004). Integrin Fibronectin Receptors in Matrix Metalloproteinase-1-Dependent Invasion by Breast Cancer & Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res* 64, 8674-8681.
- Jiang, T., & Chuong, C. (1992). Mechanism of skin morphogenesis. I. Analyses with antibodies to adhesion molecules tenascin, N-CAM, & integrin. *Dev Biol.*: 150, 82-98.
- Jin, H., & Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development & as treatment targets. *Br J Cancer* 90, 561-5.
- Kazi, A. S., Lotfi, S., Goncharova, E. A., Tliba, O., Amrani, Y., Krymskaya, V. P., & Lazaar, A. L. (2004). Vascular endothelial growth factor-induced secretion of fibronectin is ERK dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L539-545.
- Kenny, P., & Bissell, M. (2003). Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues. *Int J Cancer*, 107, 688-95.
- Kern, F., & Lippman, M. (1996). The role of angiogenic growth factors in breast cancer progression. *Cancer Met Rev* 15, 213-219.

Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., & Varner, J. A. (2000). Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin. *Am J Pathol* 156, 1345-1362.

Kita, D., Takino, T., Nakada, M., Takahashi, T., Yamashita, J., & Sato, H. (2001). Expression of Dominant-negative Form of Ets-1 Suppresses Fibronectin-stimulated Cell Adhesion & Migration Through Down-Regulation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Expression in U251 Glioma Cell Line. *Cancer Res* 61, 7985-7991.

Kitadai, Y., Onogawa, S., Kuwai, T., Matsumura, S., Hamada, H., Ito, M., Tanaka, S., Yoshihara, M., & Chayama, K. (2004). Angiogenic switch occurs during the precancerous stage of human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 11, 315-9.

Klein, S., de Fougères, A. R., Blaikie, P., Khan, L., Pepe, A., Green, C. D., Kotliansky, V., & Giancotti, F. G. (2002). $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Activates an NF- κ B-Dependent Program of Gene Expression Important for Angiogenesis & Inflammation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5912-5922.

Kostler, W., Brodowicz, T., Hejna, M., Wiltschke, C., & Zielinski, C. (2000). Detection of minimal residual disease in patients with cancer: a review of techniques, clinical implications, & emerging therapeutic consequences. *Cancer Detect Prev.* 24, 376-403.

Koukoulis, G., Howedy, A., Korhonen, M., Virtanen, I., & Gould, V. (1993). Distribution of tenascin, cellular fibronectins & integrins in the normal, hyperplastic & neoplastic breast. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 25, 285-95.

Koukoulis, G., Virtanen, I., Korhonen, M., Laitinen, L., Quaranta, V., & Gould, V. (1991). Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, & neoplastic breast. Correlations with their functions as receptors & cell adhesion molecules. *Am J Pathol.* 139, 787-99.

Kranz, A., Mattfeldt, T., & Waltenberger, J. (1999). Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression & activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* 84, 293-298.

Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J. W., Carey, L., Richardson, A., & Weinberg, R. A. (2004). From The Cover: Reconstruction of functionally normal & malignant human breast tissues in mice. *PNAS* 101, 4966-4971.

Lafrenie, R., & Yamada, K. (1996). Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem.* 61, 543-53.

- Lafrenie, R. M., & Yamada, K. M. (1998). Integrins & Matrix Molecules in Salivary Gland Cell Adhesion, Signaling, & Gene Expression. *Ann NY Acad Sci* 842, 42-48.
- Laukaitis, C. M., Webb, D. J., Donais, K., & Horwitz, A. F. (2001). Differential Dynamics of $\alpha 5$ Integrin, Paxillin, & α -Actinin during Formation & Disassembly of Adhesions in Migrating Cells. *J. Cell Biol.* 153, 1427-1440.
- Lee, J., & Juliano, R. (2002). The $\alpha 5 \beta 1$ integrin selectively enhances epidermal growth factor signaling to the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1542, 23-31.
- Lee, J., & Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- & growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells.* 17, 188-202.
- Leppa, S., Heino, J., & Jalkanen, M. (1995). Increased glycosylation of beta 1 integrins affects the interaction of transformed S115 mammary epithelial cells with laminin-1. *Cell Growth Differ.* 6, 853-61.
- Li, N., Zhang, Y., Naylor, M., Schatzmann, F., Maurer, F., Wintermantel, T., Schuetz, G., Mueller, U., Streuli, C., & Hynes, N. (2005). Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation & maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J.* 24, 1942-53.
- Lim, J. C., Al-Masri, H., Salhadar, A., Xie, H. B., Gabram, S., & Wojcik, E. M. (2004). The significance of the diagnosis of atypia in breast fine-needle aspiration. *Diagnostic Cytopathology* 31, 285-288.
- Liotta, L. A., & Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *411*, 375-379.
- Liu, D., Aguirre Ghiso, J., Estrada, Y., & Ossowski, L. (2002). EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell.* 1, 445-57.
- Liu, H., Radisky, D. C., Wang, F., & Bissell, M. J. (2004). Polarity & proliferation are controlled by distinct signaling pathways downstream of PI3-kinase in breast epithelial tumor cells. *J. Cell Biol.* 164, 603-612.
- Lochter, A., Srebrow, A., Sympton, C. J., Terracio, N., Werb, Z., & Bissell, M. J. (1997). Misregulation of Stromelysin-1 Expression in Mouse Mammary Tumor Cells Accompanies Acquisition of Stromelysin-1-dependent Invasive Properties. *J. Biol. Chem.* 272, 5007-5015.

- Lund, L., Bjorn, S., Sternlicht, M., Nielsen, B., Solberg, H., Usher, P., Osterby, R., Christensen, I., Stephens, R., Bugge, T., Dano, K., & Werb, Z. (2000). Lactational competence & involution of the mouse mammary gland require plasminogen. *Development* *127*, 4481-4492.
- Ly, D. P., Zazzali, K. M., & Corbett, S. A. (2003). De Novo Expression of the Integrin $\alpha_5\beta_1$ Regulates $\alpha_v\beta_3$ -mediated Adhesion & Migration on Fibrinogen. *J. Biol. Chem.* *278*, 21878-21885.
- Madsen, M., Lykkesfeldt, A., Laursen, I., Nielsen, K., & Briand, P. (1992). Altered gene expression of c-myc, epidermal growth factor receptor, transforming growth factor- α , & c-erb-B2 in an immortalized human breast epithelial cell line, HMT-3522, is associated with decreased growth factor requirements. *Cancer Res.* 1992 Mar 1; *52*(5):1210-7.
- Maffini, M. V., Soto, A. M., Calabro, J. M., Ucci, A. A., & Sonnenschein, C. (2004). The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci* *117*, 1495-1502.
- Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D. v., Sordat, I., Beug, H., & Reichmann, E. (2005). Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression & localization. *24*, 2032-2041.
- Mason, I. (1994). The ins & outs of fibroblast growth factors. *Cell* *78*, 547-552.
- Mayerhofer, M., Aichberger, K. J., Florian, S., Krauth, M.-T., Hauswirth, A. W., Derdak, S., Sperr, W. R., Esterbauer, H., Wagner, O., Marosi, C., Pickl, W. F., Deininger, M., Weisberg, E., Druker, B. J., Griffin, J. D., Sillaber, C., & Valent, P. (2005). Identification of mTOR as a novel bifunctional target in chronic myeloid leukemia: dissection of growth-inhibitory & VEGF-suppressive effects of rapamycin in leukemic cells. *FASEB J.*, 04-1973fje.
- Mayerhofer, M., Valent, P., Sperr, W. R., Griffin, J. D., & Sillaber, C. (2002). BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor & its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1 α , through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase & the mammalian target of rapamycin. *Blood* *100*, 3767-3775.
- Medina, D. (2000). Mouse models for mammary cancer. In *Methods in mammary gland biology & breast cancer research*, M. M. Ip, Asch, Bonnie B., ed. (New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 3-17.
- Mercurio, A., Bachelder, R., Bates, R., & Chung, J. (2004). Autocrine signaling in carcinoma: VEGF & the $\alpha_6\beta_4$ integrin. *Semin Cancer Biol.* *14*, 115-22.

Mercurio, A., Bachelder, R., Chung, J., O'Connor, K., Rabinovitz, I., Shaw, L., & Tani, T. (2001). Integrin laminin receptors & breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 299-309.

Meredith, J. J., Fazeli, B., & Schwartz, M. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*. 4, 953-61.

Meyer, T., & Hart, I. (1998). Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer* 34, 214-21.

Meyer, T., Marshall, J., & Hart, I. (1998). Expression of alphav integrins & vitronectin receptor identity in breast cancer cells. *Br J Cancer*. 77, 530-6.

Miller, F., Soule, H., Tait, L., Pauley, R., Wolman, S., Dawson, P., & Heppner, G. (1993). Xenograft model of progressive human proliferative breast disease. *J Natl Cancer Inst*. 85, 1725-32.

Mintz, B., & Illmensee, K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3585-9 72, 3585-9.

Miyamoto, S., KATHZ, B.-Z., LAFRENIE, R. M., & YAMADA, K. M. (1998). Fibronectin & Integrins in Cell Adhesion, Signaling, & Morphogenesis. *Ann NY Acad Sci* 857, 119-129.

Morini, M., Mottolose, M., Ferrari, N., Ghiorzo, F., Buglioni, S., Mortarini, R., Noonan, D., Natali, P., & Albini, A. (2000). The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, & gelatinase B (MMP-9) activity. *Intl. J. of Cancer* 87, 336-42.

Mortarini, R., Gismondi, A., Maggioni, A., Santoni, A., Herlyn, M., & Anichini, A. (1995). Mitogenic activity of laminin on human melanoma & melanocytes: different signal requirements & role of beta 1 integrins. *Cancer Res*. 55, 4702-10.

Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 839-849.

Muschler, J., & Horwitz, A. (1991). Down-regulation of the chicken alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor during development. *Development* 113, 327-37.

Muschler, J., Levy, D., Boudreau, R., Henry, M., Campbell, K., & Bissell, M. J. (2002). A Role for Dystroglycan in Epithelial Polarization: Loss of Function in Breast Tumor Cells. *Cancer Res* 62, 7102-7109.

- Muthuswamy, S., Li, D., Lelievre, S., Bissell, M., & Brugge, J. (2001). ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation & induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol.* *3*, 785-92.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) & its receptors. *FASEB J.* *13*, 9-22.
- Neville, M. C., McFadden, T. B., & Forsyth, I. (2002). Hormonal Regulation of Mammary Differentiation & Milk Secretion. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* *7*, 49-66.
- Nielsen, B., Sehested, M., Timshel, S., Pyke, C., & Dano, K. (1996). Messenger RNA for urokinase plasminogen activator is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer. *Lab Invest.* *74*, 168-77.
- Nielsen, B. S., Rank, F., Lopez, J. M., Balbin, M., Vizoso, F., Lund, L. R., Dano, K., & Lopez-Otin, C. (2001). Collagenase-3 Expression in Breast Myofibroblasts as a Molecular Marker of Transition of Ductal Carcinoma in Situ Lesions to Invasive Ductal Carcinomas. *Cancer Res* *61*, 7091-7100.
- Nishizaki, T., Chew, K., Chu, L., Isola, J., Kallioniemi, A., Weidner, N., & Waldman, F. M. (1997). Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *International Journal of Cancer* *74*, 513-517.
- Nishizaki, T., DeVries, S., Chew, K., Goodson III, W. H., Ljung, B.-M., Thor, A., & Waldman, F. M. (1997). Genetic alterations in primary breast cancers & their metastases: Direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* *19*, 267-272.
- Nollet, F., Berx, G., & van Roy, F. (1999). The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development & progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun.* *2*, 77-85.
- Oda, K., Hori, S., Itoh, H., Osamura, R., Tokuda, Y., Kubota, M., & Tajima, T. (1992). Immunohistochemical study of transforming growth factor beta, fibronectin, & fibronectin receptor in invasive mammary carcinomas. *Acta Pathol Jpn.* *42*, 645-50.
- Ory, D. S., Neugeboren, B. A., & Mulligan, R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *PNAS* *93*, 11400-11406.

- Osborne, M. P. (1996). Breast development & anatomy. In *Disease of the Breast*, J. R. Harris, Lippman, E., Morrow, M. & Hellman, S., ed. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), pp. 1-14.
- Page, D., & Dupont, W. (1990). Anatomic markers of human premalignancy & risk of breast cancer. *Cancer* 66, 1326-35.
- Page, D., & Dupont, W. (1990). Premalignant conditions & markers of elevated risk in the breast & their management. *Surg Clin North Am.* 70, 831-51.
- Page, K., & Uhr, J. (2005). Mathematical models of cancer dormancy. *Leuk Lymphoma.* 46, 313-27.
- Park, C. C., Morel, J. C. M., Amin, M. A., Connors, M. A., Harlow, L. A., & Koch, A. E. (2001). Evidence of IL-18 as a Novel Angiogenic Mediator. *J Immunol* 167, 1644-1653.
- Pecheur, I., Peyruchaud, O., Serre, C.-M., Guglielmi, J., Volland, C., Bourre, F., Margue, C., Cohen-Solal, M., Buffet, A., Kieffer, N., & Clezardin, P. (2002). Integrin $\alpha_v\beta_3$ expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB J.* 16, 1266-1268.
- Pena, L., Nieto, A., Perez Alenza, M., Rodriguez, A., Sanchez, M., & Castano, M. (1994). Expression of fibronectin & its integrin receptor $\alpha_5\beta_1$ in canine mammary tumours. *Res Vet Sci.* 57, 358-64.
- Petersen, O., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A., & Bissell, M. (1992). Interaction with Basement Membrane Serves to Rapidly Distinguish Growth & Differentiation Pattern of Normal & Malignant Human Breast Epithelial Cells. *PNAS* 89, 9064-9068.
- Pignatelli, M., Cardillo, M., Hanby, A., & Stamp, G. (1992). Integrins & their accessory adhesion molecules in mammary carcinomas: loss of polarization in poorly differentiated tumors. *Hum Pathol.* 23, 1159-66.
- Prince, J., Klinowska, T., Marshman, E., Lowe, E., Mayer, U., Miner, J., Aberdam, D., Vestweber, D., Gusterson, B., & Streuli, C. (2002). Cell-matrix interactions during development & apoptosis of the mouse mammary gland in vivo. *Dev Dyn.* 223, 497-516.
- Provenzano, E., Hopper, J., Giles, G., Marr, G., Venter, D., & Armes, J. (2004). Histological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast: an Australian population-based study. *Pathology* 36, 221-9.

- Qian, F., Zhang, Z., Wu, X., Li, Y., & Xu, Q. (2005). Interaction between integrin alpha(5) & fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* *333*, 1269-75.
- Qin, J., Vinogradova, O., & Plow, E. F. (2004). Integrin Bidirectional Signaling: A Molecular View. *PLoS Biology* *2*, e169.
- Reginato, M., Mills, K., Paulus, J., Lynch, D., Sgroi, D., Debnath, J., Muthuswamy, S., & Brugge, J. (2003). Integrins & EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol.* *5*, 733-40.
- Rha, S., Yang, W., Kim, J., Roh, J., Min, J., Lee, K., Kim, B., & Chung, H. (1998). Different expression patterns of MMP-2 & MMP-9 in breast cancer. *Oncol Rep.* *5*, 875-9.
- Riethmuller, G., & Klein, C. (2001). Early cancer cell dissemination & late metastatic relapse: clinical reflections & biological approaches to the dormancy problem in patients. *Semin Cancer Biol.* *11*, 307-11.
- Ronnov-Jessen, L., Petersen, O. W., & Bissell, M. J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.* *76*, 69-125.
- Rossi, F., & Blau, H. (1998). Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Biotechnol.* *9*, 451-6.
- Rossi, F., Guicherit, O., Spicher, A., Kringstein, A., Fatyol, K., Blakely, B., & Blau, H. (1998). Tetracycline-regulatable factors with distinct dimerization domains allow reversible growth inhibition by p16. *Nat Genet.* *20*, 389-93.
- Rousselle, P., Lunstrum, G., Keene, D., & Burgeson, R. (1991). Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.* *114*, 567-576.
- Russo, J., Lynch, H., & Russo, I. H. (2001). Mammary Gland Architecture as a Determining Factor in the Susceptibility of the Human Breast to Cancer. *The Breast Journal* *7*, 278-291.
- Russo, J., & Russo, I. (1987). Development of the human mammary gland. In *The Mammary Gland. Development, Regulation, & Function*, M. C. a. D. Neville, C.W., ed. (New York: Plenum Press), pp. 67-92.
- Russo, J., & Russo, I. H. (2001). The Pathway of Neoplastic Transformation of Human Breast Epithelial Cells. *Radiation Research* *155*, 151-154.

Sakakura, T., Sakagami, Y., & Nishizuka, Y. (1982). Dual origin of mesenchymal tissues participating in mouse mammary gland embryogenesis. *Dev Biol.* *91*, 202-7.

Schirmacher, V. (2001). T-cell immunity in the induction & maintenance of a tumour dormant state. *Semin Cancer Biol.* *11*, 285-95.

Schoenberg Fejzo, M., Godfrey, T., Chen, C., Waldman, F., & Gray, J. W. (1998). Molecular cytogenetic analysis of consistent abnormalities at 8q12-q22 in breast cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* *22*, 105-113.

Schor, S., & Schor, A. (2001). Tumour-stromal interactions: Phenotypic & genetic alterations in mammary stroma - implications for tumour progression. *Breast Cancer Res* *3*, 373 - 379.

Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E., Perruzzi, C. A., Sergiou, A. P., & Detmar, M. (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: Regulation through alpha 1beta 1 & alpha 2beta 1 integrins. *PNAS* *94*, 13612-13617.

Serre, C., Clezardin, P., Frappart, L., Boivin, G., & Delmas, P. (1995). Distribution of thrombospondin & integrin alpha V in DCIS, invasive ductal & lobular human breast carcinomas. Analysis by electron microscopy. *Virchows Arch.* *427*, 365-72.

Shachaf, C., Kopelman, A., Arvanitis, C., Karlsson, A., Beer, S., Mandl, S., Bachmann, M., Borowsky, A., Ruebner, B., Cardiff, R., Yang, Q., Bishop, J., Contag, C., & Felsher, D. (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation & tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature.* *431*, 1112-7.

Shaw, L., Chao, C., Wewer, U., & Mercurio, A. (1996). Function of the integrin alpha 6 beta 1 in metastatic breast carcinoma cells assessed by expression of a dominant-negative receptor. *Cancer Res.* *56*, 959-63.

Shaw, L. M. (1999). Integrin Function in Breast Carcinoma Progression. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* *4*, 367-376.

Sheppard, D. (2000). In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* *19*, 203-9.

Sieweke, M., Stoker, A., & Bissell, M. (1989). Evaluation of the cocarcinogenic effect of wounding in Rous sarcoma virus tumorigenesis. *Cancer Res.* *49*, 6419-24.

Silberstein, G. B. (2001). Postnatal mammary gland morphogenesis. *Microscopy Research & Technique* *52*, 155-162.

- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., & Bissell, M. J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens & growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* *128*, 3117-3131.
- Smith, K., Fox, S., Whitehouse, R., Taylor, M., Greenall, M., Clarke, J., & Harris, A. (1999). Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma & its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor & survival. *Ann Oncol* *10*, 707-713.
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., & Bussolino, F. (1999). Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* *18*, 882-92.
- Sonnenschein, C., & Soto, A. (2000). Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped & replaced. *Mol Carcinog.* *29*, 205-11.
- Sparmann, A., & Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth & angiogenesis. *Cancer Cell* *6*, 447-58.
- Speirs, V., & Atkin, S. L. (1999). Production of VEGF & expression of the VEGF receptors Flt-1 & KDR in primary cultures of epithelial & stromal cells derived from breast tumours. *British Journal of Cancer* *80*, 898-903.
- Stahl, S., Weitzman, S., & Jones, J. (1997). The role of laminin-5 & its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci* *110*, 55-63.
- Sternlicht, M., Bissell, M., & Werb, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* *19*, 1102-13.
- Sternlicht, M., Lochter, A., Sympton, C., Huey, B., Rougier, J., Gray, J., Pinkel, D., Bissell, M., & Werb, Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* *98*, 137-46.
- Streuli, C., Bailey, N., & Bissell, M. (1991). Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction & morphological polarity. *J. Cell Biol.* *115*, 1383-1395.
- Stupack, D. G. (2005). Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *J. Cell Biol.* *12*, 1021-1030.

Su, J., Gui, L., Zhou, Y., & Zha, X. (2002). Expression of focal adhesion kinase & alpha5 & beta1 integrins in carcinomas & its clinical significance. *World J Gastroenterol.* 8, 613-8.

Sympson, C., Talhouk, R., Alexander, C., Chin, J., Clift, S., Bissell, M., & Werb, Z. (1994). Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis & the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression [published erratum appears in *J Cell Biol* 1996 Feb;132(4):following 752]. *J. Cell Biol.* 125, 681-693.

Taddei, I., Faraldo, M. M., Teulière, J. r. m., Deugnier, M.-A., Thiery, J. P., & Glukhova, M. A. (2003). Integrins in Mammary Gland Development & Differentiation of Mammary Epithelium. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* 8, 383-394.

Takizawa, T., Nishinarita, S., Kitamura, N., Hayakawa, J., Kang, H., Tomita, Y., Mitamura, K., Yamagami, K., & Horie, T. (1995). Interaction of the cell-binding domain of fibronectin with VLA-5 integrin induces monokine production in cultured human monocytes. *Clin Exp Immunol.* 101, 376-82.

Tani, N., Higashiyama, S., Kawaguchi, N., Madarame, J., Ota, I., Ito, Y., Ohoka, Y., Shiosaka, S., Takada, Y., & Matsuura, N. (2003). Expression level of integrin alpha 5 on tumour cells affects the rate of metastasis to the kidney. *Br J Cancer* 88, 327-33.

Teo, N., Shoker, B., Jarvis, C., Martin, L., Sloan, J., & Holcombe, C. (2002). Vascular density & phenotype around ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the breast. *Br J Cancer* 86, 905-911.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.

Thomasset, N., Lochter, A., Sympson, C. J., Lund, L. R., Williams, D. R., Behrendtsen, O., Werb, Z., & Bissell, M. J. (1998). Expression of Autoactivated Stromelysin-1 in Mammary Glands of Transgenic Mice Leads to a Reactive Stroma During Early Development. *Am J Pathol* 153, 457-467.

Tlsty, T. (2001). Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol.* 11, 97-104.

Tsao, H., Cosimi, A., & Sober, A. (1997). Ultra-late recurrence (15 years or longer) of cutaneous melanoma. *Cancer* 79, 2361-70.

Udagawa, T., Fernandez, A., Achilles, E.-G., Folkman, J., & D'Aamato, R. J. (2002). Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *FASEB J.* *16*, 1361-1370.

Unger, M., & Weaver, V. (2003). The tissue microenvironment as an epigenetic tumor modifier. *Methods Mol Biol.* *223*, 315-47.

Vaccariello, M. J., Wang, A. Y., Fusenig, N. E., & Garlick, J. A. (1999). Cell Interactions Control the Fate of Malignant Keratinocytes in an Organotypic Model of Early Neoplasia. *Journal of Investigative Dermatology* *113*, 384-91.

Varner, J., & Cheresh, D. (1996). Integrins & cancer. *Curr Opin Cell Biol.* *8*, 724-30.

Visonneau, S., Cesano, A., Torosian, M., Miller, E., & Santoli, D. (1998). Growth characteristics & metastatic properties of human breast cancer xenografts in immunodeficient mice. *Am J Pathol.* *152*, 1299-311.

Vitolo, D., Ciocci, L., Ferrauti, P., Cicerone, E., Gallo, A., De Vincentiis, M., & Baroni, C. (2000). alpha5 integrin distribution & TGFbeta1 gene expression in supraglottic carcinoma: their role in neoplastic local invasion & metastasis. *Head Neck* *22*, 48-56.

Vitolo, D., Zerbe, T., Kanbour, A., Dahl, C., Herberman, R., & Whiteside, T. (1992). Expression of mRNA for cytokines in tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian adenocarcinoma & invasive breast cancer. *Int J Cancer* *51*, 573-80.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. (2004). Cancer genes & the pathways they control. *Nat Med.* *10*, 789-99.

von Schlippe, M., Marshall, J., Perry, P., Stone, M., Zhu, A., & Hart, I. (2000). Functional interaction between E-cadherin & alphav-containing integrins in carcinoma cells. *J Cell Sci* *113*, 425-437.

Waldman, F. M., DeVries, S., Chew, K. L., Moore, D. H., II, Kerlikowske, K., & Ljung, B.-M. (2000). Chromosomal Alterations in Ductal Carcinomas In Situ & Their In Situ Recurrences. *J Natl Cancer Inst* *92*, 313-320.

Wang, D., Sun, L., Zborowska, E., Willson, J. K. V., Gong, J., Verrarahavan, J., & Brattain, M. G. (1999). Control of Type II Transforming Growth Factor-beta Receptor Expression by Integrin Ligation. *J. Biol. Chem.* *274*, 12840-12847.

Wang, F., Hansen, R. K., Radisky, D., Yoneda, T., Barcellos-Hoff, M. H., Petersen, O. W., Turley, E. A., & Bissell, M. J. (2002). Phenotypic Reversion or Death of Cancer

Cells by Altering Signaling Pathways in Three-Dimensional Contexts. *J Natl Cancer Inst* 94, 1494-1503.

Wang, F., Weaver, V. M., Petersen, O. W., Larabell, C. A., Dedhar, S., Briand, P., Lupu, R., & Bissell, M. J. (1998). Reciprocal interactions between beta 1-integrin & epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: A different perspective in epithelial biology. *PNAS* 95, 14821-14826.

Wang, H., Fu, W., Im, J. H., Zhou, Z., Santoro, S. A., Iyer, V., DiPersio, C. M., Yu, Q.-C., Quaranta, V., Al-Mehdi, A., & Muschel, R. J. (2004). Tumor cell $\alpha_3\beta_1$ integrin & vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest & metastasis. *J. Cell Biol.* 164, 935-941.

Wang, P., Gilmore, A. P., & Streuli, C. H. (2004). Bim Is an Apoptosis Sensor That Responds to Loss of Survival Signals Delivered by Epidermal Growth Factor but Not Those Provided by Integrins. *J. Biol. Chem.* 279, 41280-41285.

Weaver, V., Fischer, A., Peterson, O., & Bissell, M. (1996). The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model & a three-dimensional culture assay. *Biochem Cell Biol.* 74, 833-51.

Weaver, V., Lelievre, S., Lakins, J., Chrenek, M., Jones, J., Giancotti, F., Werb, Z., & Bissell, M. (2002). beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal & malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2, 205-16.

Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C., & Bissell, M. J. (1997). Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture & In Vivo by Integrin Blocking Antibodies. *J. Cell Biol.* 137, 231-245.

Wei, Y., Czekay, R.-P., Robillard, L., Kugler, M. C., Zhang, F., Kim, K. K., Xiong, J.-p., Humphries, M. J., & Chapman, H. A. (2005). Regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin conformation & function by urokinase receptor binding. *J. Cell Biol.* 168, 501-511.

Weidner, N., Folkman, J., Pozza, F., Bevilacqua, P., Allred, E., Moore, D., Meli, S., & Gasparini, G. (1992). Tumor angiogenesis: a new significant & independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 84, 1875-87.

Weidner, N., Semple, J., Welch, W., & Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis & metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 324, 1-8.

- Werb, Z., Ashkenas, J., MacAuley, A., & Wiesen, J. (1996). Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution & carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.* 29, 1087-97.
- Wey, M. J., Fan, F., Gray, M. J., Bauer, T. W., McCarty, M. F., Somcio, R., Liu, W., Evans, D. B., Wu, Y., Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration & invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer* 104, 427-438.
- White, D. E. A., Kurpios, N., Zuo, D., Hassell, J. A., Blaess, S., Mueller, U., Muller, & J., W. (2004). Targeted disruption of $\beta 1$ -integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* 6, 159-170.
- Wickstrom, S. A., Alitalo, K., & Keski-Oja, J. (2004). An Endostatin-derived Peptide Interacts with Integrins & Regulates Actin Cytoskeleton & Migration of Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 20178-20185.
- Wiseman, B., & Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development & breast cancer. *Science* 296, 1046-9.
- Wiseman, B. S., Sternlicht, M. D., Lund, L. R., Alexander, C. M., Mott, J., Bissell, M. J., Soloway, P., Itohara, S., & Werb, Z. (2003). Site-specific inductive & inhibitory activities of MMP-2 & MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* 162, 1123-1133.
- Wong, C. W., Lee, A., Shientag, L., Yu, J., Dong, Y., Kao, G., Al-Mehdi, A. B., Bernhard, E. J., & Muschel, R. J. (2001). Apoptosis: An Early Event in Metastatic Inefficiency. *Cancer Res* 61, 333-338.
- Wulfing, P., Kersting, C., Buerger, H., Mattsson, B., Mesters, R., Gustmann, C., Hinrichs, B., Tio, J., Bocker, W., & Kiesel, L. (2005). Expression patterns of angiogenic & lymphangiogenic factors in ductal breast carcinoma in situ. *Br J Cancer.* 92, 1720-8.
- Xu, L., Pathak, P. S., & Fukumura, D. (2004). Hypoxia-Induced Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase & Phosphatidylinositol 3'-Kinase Signaling Pathways Contributes to Expression of Interleukin 8 in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res* 10, 701-707.
- Yamada, K., & Even-Ram, S. (2002). Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat Cell Biol.* 4, E75-6.

- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors & blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.
- Yang, J., Rayburn, H., & Hynes, R. (1993). Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* 119, 1093-1105.
- Yu, W., Kim, J., & Ossowski, L. (1997). Reduction in Surface Urokinase Receptor Forces Malignant Cells into a Protracted State of Dormancy. *J. Cell Biol.* 137, 767-777.
- Zachary, I. (2001). Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1375-1386.
- Zachary, I., & Glik, G. (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res.* 49, 568-81.
- Zahir, N., Lakins, J. N., Russell, A., Ming, W., Chatterjee, C., Rozenberg, G. I., Marinkovich, M. P., & Weaver, V. M. (2003). Autocrine laminin-5 ligates {alpha}6{beta}4 integrin & activates RAC & NF{kappa}B to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J. Cell Biol.* 163, 1397-1407.
- Zhang, X., Groopman, J. E., & Wang, J. F. (2005). Extracellular matrix regulates endothelial functions through interaction of VEGFR-3 & integrin alpha5beta1. *Journal of Cellular Physiology* 202, 205-214.
- Zhukova, L., Zhukov, N., & Lichinitser, M. (2003). Expression of Flt-1 & Flk-1 receptors for vascular endothelial growth factor on tumor cells as a new prognostic criterion for locally advanced breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 135, 478-481.
- Zutter, M., Krigman, H., & Santoro, S. (1993). Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast. Analysis by in situ hybridization. *Am J Pathol.* 1993 May;142(5):1439-48. 142, 1439-48.
- Zutter, M., Mazoujian, G., & Santoro, S. (1990). Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am J Pathol.* 137, 863-70.
- Zutter, M., Sun, H., & Santoro, S. (1998). Altered integrin expression & the malignant phenotype: the contribution of multiple integrated integrin receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 191-200.
- Zutter, M. M., Santoro, S. A., Wu, J. E., Wakatsuki, T., Dickeson, S. K., & Elson, E. L. (1999). Collagen Receptor Control of Epithelial Morphogenesis & Cell Cycle Progression. *Am J Pathol* 155, 927-940.

INDICE

INTRODUCCION	11
<i>La glándula mamaria</i>	12
<i>Interacciones epitelio- estroma en la mama normal</i>	18
<i>Integrinas y ECM en la mama normal</i>	20
<i>Cáncer de mama</i>	29
<i>Integrinas y ECM en el cáncer de mama</i>	33
<i>Integrina alfa5 beta1</i>	38
<i>Angiogénesis</i>	42
<i>Integrina $\alpha5\beta1$, supervivencia tumoral y metástasis</i>	48
<i>VEGF y sus receptores como un mecanismo de supervivencia autocrino</i>	54
<i>Dormición tumoral</i>	56
<i>Modelo experimental</i>	61
MATERIALES Y METODOS	67
<i>Sustratos y anticuerpos</i>	68
<i>Cultivo celular en monocapa 2D</i>	70
<i>Cultivos celulares en 3D rBM</i>	71
<i>Reversión fenotípica en 3D rBM</i>	72
<i>Ensayo de co-cultivo en 3D</i>	72
<i>Clonado de poblaciones puras de células HMT-3522 premalignas</i>	73
<i>Ensayo de proliferación celular</i>	74
<i>Inmunofluorescencia indirecta, adquisición y análisis de imágenes</i>	75
<i>Citometría de flujo</i>	76
<i>Ensayo de migración</i>	76
<i>Ensayo de invasión</i>	77
<i>Zimografía en gelatina</i>	78
<i>Ensayo de independencia de anclaje</i>	78
<i>Construcciones de cDNA</i>	79
<i>Expresión génica ectópica</i>	80

<i>Estudios in vivo</i>	81
<i>Procesamiento de los tumores</i>	81
<i>Inmunohistoquímica</i>	82
<i>ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assays)</i>	82
<i>Extracción de RNA a partir de células en cultivo</i>	83
<i>Preparación de cDNA</i>	85
<i>RT-PCR semi-cuantitativa</i>	85
<i>Estudios de bloqueo de función en cultivos 3D rBM</i>	86
<i>Extracción de proteínas</i>	86
<i>Inmunoblots</i>	87
RESULTADOS	89

Capítulo 1: Modelo de transformación maligna en 3D rBM

<i>Introducción</i>	90
<i>Resultados</i>	
<i>Aislamiento de una población premaligna y homogénea de MECs de tipo DCIS</i>	96
<i>Caracterización fenotípica: las células S3 poseen una pérdida parcial de su diferenciación en cultivos 3DrBM</i>	98
<i>Las líneas celulares S3 son no migratorias</i>	101
<i>Las células S3-C son no invasivas y dependientes de anclaje para su crecimiento y supervivencia</i>	103
<i>La actividad MMP es necesaria para la adquisición de invasividad y la transición de un fenotipo premaligno a uno maligno</i>	106
<i>Las células S3 poseen un potencial tumorigénico intermedio in vivo</i>	108
<i>Las células S3-C son angiogénicas in vivo e in vitro</i>	111
<i>Distintos niveles de expresión de integrinas se correlacionan con la transición de un fenotipo premaligno a uno maligno</i>	114

<i>Discusión</i>	119
------------------	-----

*Capítulo 2: La integrina $\alpha 5\beta 1$ induce la supervivencia de las células epiteliales pre-malignas a través de un loop autocrino que involucra la interacción entre VEGF y *flt-1**

<i>Introducción</i>	123
---------------------	-----

Resultados

La transformación maligna se encuentra asociada a la pérdida del control del crecimiento y a la disrupción de la morfología tisular 128

Las células pre-malignas S3-C no expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ pero depositan su ligando FN 129

La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ aumenta la migración y la invasión inducida por EGF de las células pre-malignas S3-C 132

La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ permite el crecimiento independiente de anclaje de las células pre-malignas S3-C 134

Las células pre malignas S3-C expresando la integrina $\alpha 5\beta 1$ forman tumores in vivo 134

*El bloqueo de *flt-1* inhibe la supervivencia de las células S3-C $\alpha 5$ en agar blando* 144

*La interacción integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN induce la sobre-expresión de *flt-1* al estimular la activación de ERK inducida por VEG* 147

<i>Discusión</i>	149
------------------	-----

Capítulo 3: La dormición tumoral depende de interacciones integrina $\alpha 5\beta 1$ - FN (-uPAR-uPA) que regulan el switch angiogénico

<i>Introducción</i>	153
---------------------	-----

<i>Resultados</i>	
<i>La integrina $\alpha5\beta1$ y la dormición tumoral modulada por la arquitectura tisular</i>	156
<i>La integrina $\alpha5\beta1$ perturba la arquitectura tisular y promueve el crecimiento in vitro</i>	163
<i>La integrina $\alpha5\beta1$ modula el comportamiento tisular a través de la regulación de PI3K y MEK</i>	166
<i>La integrina $\alpha5\beta1$ modula la expresión del fenotipo maligno in vivo</i>	170
<i>La integrina $\alpha5\beta1$ modula la polaridad tisular y la angiogénesis in vivo</i>	171
<i>La integrina $\alpha5\beta1$ modula la angiogénesis en cultivo</i>	174
<i>La inducción del fenotipo pro-angiogénico en cultivo e in vivo se encuentra asociada a la secreción de VEGF e IL-8</i>	175
<i>Cross-talk entre la integrina $\alpha5\beta1$ -uPAR-EGFR, polaridad tisular y angiogénesis</i>	178
<i>Discusión</i>	183
CONCLUSIONES GENERALES	192
DISCUSION	195
<i>Definición de un modelo in vitro para el estudio de la transformación maligna de la mama</i>	196
<i>Transición pre-maligna a maligna</i>	202
<i>Rol de la interacción integrina $\alpha5\beta1$- FN en la progresión tumoral</i>	209
<i>Dormición tumoral</i>	212
REFERENCIAS	224

ABREVIATURAS

3D rBM: membrana basal reconstituída tridimensional

Ab: anticuerpo

AKT: proteína kinasa B (PKB)

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico (basic fibroblast growth factor)

BM: membrana basal (basement membrane)

CM: medio condicionado (conditioned medium)

CSF-1: factor estimulante de colonias 1 (colony stimulating factor 1)

Ctrl: control

DCIS: carcinoma ductal in situ

DAPI: 4'-6-Diamidino-2-fenilindol

ds: días

EC: célula endotelial (endothelial cell)

ECM: matriz extracelular (extracellular matrix)

EGF: factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor)

eGFP: enhanced green fluorescence protein

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor)

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

EMT: transición epitelio-mesénquima (epithelial to mesenchymal transition)

ERK: kinasa regulada extracelularmente (extracellular regulated kinase)

FGF: factor de crecimiento fibroblástico (fibroblast growth factor)

FITC: isotiocianato de fluoresceína

flt-1 o VEGFR-1: receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo 1 (vascular endothelial growth factor receptor 1)

FN: fibronectina

H&E: hematoxilina y eosina

HDMVEC: célula endotelial humana de la vasculatura dérmica (human dermal microvascular endothelial cell)

hr: hora

HUVEC: célula endotelial de vena umbilical humana (human umbilical vein endothelial cells)

IL-8: interleuquina 8

LM 5: laminina 5
MEC: célula epitelial mamaria (mammary epithelial cell)
MEK: kinasa de ERK
min: minuto/s
MMP: metaloproteinasa de matriz
O.D.: densidad óptica
ON: toda la noche (over night)
PAI: inhibidor del activador del plasminógeno
PCNA: antígeno nuclear de proliferación (proliferation cell nuclear antigen)
PE: ficoeritrina (phyco-erythrin)
PFA: paraformaldehído
Pg: plasminógeno
PI: yoduro de propidio (propidium iodide)
PI3K: Fosfatidil inositol 3 fosfato kinasa
PKC: Protein kinasa C
rflt-1: flt-1 recombinante (recombinant flt-1)
RT: temperatura ambiente (room temperature)
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa reversa (reverse transcriptase- polymerase chain reaction)
RTK: receptor tirosina kinasa
Rvt: revertido
S1: células epiteliales mamarias no malignas de la serie HMT-3522
S1 eGFP: células S1 control expresando eGFP ectópica
S1 α 5: células S1 expresando ectópicamente la integrina α 5 unida a eGFP
S1 α 2: células S1 expresando ectópicamente la integrina α 2 unida a eGFP
S2: células epiteliales mamarias pre malignas heterogéneas de la serie HMT-3522
S3: células epiteliales mamarias pre malignas homogéneas de la serie HMT-3522
S3-C eGFP: células S3-C control expresando eGFP ectópica
S3-C α 5: células S3-C expresando ectópicamente la integrina α 5 unida a eGFP
s.c.: subcutáneo/a
T4-2: células epiteliales mamarias malignas de la serie HMT-3522

TEB: terminal end bud

Tet: tetraciclina

TGF β : factor de crecimiento tumoral beta (tumor growth factor beta)

TIMP: inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz

TN: tenascina

U.A.: unidades arbitrarias

uPA: activador del plasminógeno de tipo urokinasa (urokinase- type plasminogen activator)

uPAR: receptor del activador del plasminógeno de tipo urokinasa (urokinase- type plasminogen activator receptor)

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (vascular endothelial growth factor)

vol: volumen