

Tesis Doctoral

# Cross-talks entre las vías de señalización del transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (Stat3) y el receptor de progesterona en células de cáncer de mama

Proietti, Cecilia Jazmín

2006

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Proietti, Cecilia Jazmín. (2006). Cross-talks entre las vías de señalización del transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (Stat3) y el receptor de progesterona en células de cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Proietti, Cecilia Jazmín. "Cross-talks entre las vías de señalización del transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (Stat3) y el receptor de progesterona en células de cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica



---

***Cross-talks* entre las vías de señalización de la  
proteína Transductora de Señales y Activadora de  
la Transcripción 3 (Stat3) y el Receptor de  
Progesterona en células de cáncer de mama**

**Tesis Doctoral**  
**CECILIA JAZMÍN PROIETTI**

**Director**  
**Dra. Patricia V. Elizalde**

**Instituto de Biología y Medicina Experimental  
(IBYME)  
CONICET**

---

Agosto 2006

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica



---

**Cross-talks between Signal Transducer and  
Activator of Transcription 3 (Stat3) and  
Progesterone Receptor signaling pathways  
in breast cancer cells**

**Doctoral Thesis**  
**CECILIA JAZMÍN PROIETTI**

**Mentor**  
**Dra. Patricia V. Elizalde**

**Instituto de Biología y Medicina Experimental  
(IBYME)  
CONICET**

---

August 2006

Parte de los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral dieron origen a la siguiente publicación:

**Progestins Induce Transcriptional Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) Via Jak and Src-Dependent Mechanism in Breast Cancer Cells.**

**Proietti CJ**, Salatino M, Rosembliit C, Carnevale R, Pecci A, Kornblihtt AR, Molinolo A, Frahm I, Charreau EH, Schillaci R, and Elizalde PV.

*Molecular and Cellular Biology* 2005 Jun;25(12):4826-40.



# **INDICE**

<b><u>ABREVIATURAS</u></b>	<b>8</b>
<b><u>RESUMEN</u></b>	
<b>Español</b>	<b>10</b>
<b>Inglés</b>	<b>13</b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	
<b>Cáncer de mama</b>	<b>16</b>
<b>1. Receptor de Progesterona</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Receptor de Progesterona y Cáncer de mama</b>	<b>19</b>
<b>2. Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stats)</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Stat3 como reguladora de la transformación celular</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Stats y Receptores de hormonas esteroideas</b>	<b>25</b>
<b>3. Modelo experimental de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por progestágenos</b>	<b>27</b>
<b><u>OBJETIVOS GENERALES</u></b>	<b>30</b>
<b><u>RESULTADOS</u></b>	
<b>El MPA induce la fosforilación en tirosina de Stat3 actuando a través del RP clásico y mediante un mecanismo dependiente de la activación de Jak1, Jak2 y Src</b>	<b>32</b>
<b>El MPA induce asociación entre Stat3 y RP</b>	<b>41</b>
<b>El MPA induce la translocación nuclear de Stat3</b>	<b>43</b>
<b>El MPA induce la unión de Stat3 al ADN</b>	<b>47</b>
<b>El MPA induce la activación transcripcional de Stat3 a través de una vía dependiente de Jak1, Jak2 y Src</b>	<b>50</b>

<b>La actividad de Stat3 es un requisito en la proliferación inducida por MPA, en las células C4HD</b>	<b>52</b>
<b>El bloqueo <i>in vivo</i> de la expresión de Stat3 resulta en la inhibición del crecimiento del tumor C4HD</b>	<b>59</b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>65</b>
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	
<b>1. Animales</b>	<b>81</b>
<b>2. Tumores</b>	
<b>3. Líneas celulares</b>	<b>81</b>
<b>4. Hormona</b>	<b>82</b>
<b>5. Medios de cultivo y suero fetal bovino</b>	<b>82</b>
<b>6. Soluciones utilizadas para los cultivos</b>	<b>83</b>
<b>7. Cultivos celulares</b>	<b>83</b>
<b>8. Ensayos de transfecciones transientes</b>	<b>84</b>
<b>9. Bloqueo de la expresión de Stat3 <i>in vivo</i></b>	<b>86</b>
<b>10. Análisis histopatológico</b>	<b>87</b>
<b>11. Obtención de extractos proteicos totales</b>	<b>87</b>
<b>12. <i>Western blot</i></b>	<b>88</b>
<b>13. Inmunoprecipitación: Análisis de la formación de heterodímeros</b>	<b>89</b>
<b>14. Preparación de extractos citosólicos y nucleares</b>	<b>90</b>
<b>15. Ensayos de corrimiento de movilidad electroforética</b>	<b>91</b>
<b>16. Microscopía confocal</b>	<b>92</b>
<b>17. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo</b>	<b>92</b>
<b>18. Ensayos de apoptosis</b>	<b>93</b>
<b>19. Estadística</b>	<b>93</b>
<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b>95</b>



# **ABREVIATURAS**

Akt: También referida como PKB (*Protein kinase B*) o Rac  
DMEM/F-12: Medio de Eagle modificado por Dulbecco  
DN: Dominante negativo  
EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico  
ES: Error Standard  
FC: Factor de crecimiento  
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína  
HPF: Campo de Alto Poder (*High Power Field*)  
HRT: Terapia de reemplazo hormonal  
IP: Inmunoprecipitación  
IP: Ioduro de Propidio  
JAKs: *Janus activated kinases*  
MPA: Acetato de medroxiprogesterona  
PBS: *Buffer* fosfato salino  
PI-3Kinase: Fosfatidil Inositol 3 quinasa  
RE: Receptor de estrógenos  
RP: Receptor de progesterona  
RP-B: isoforma B del Receptor de progesterona  
RTK-I: Receptor con actividad intrínseca de tirosina quinasa tipo I  
SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio  
SFB: Suero fetal bovino  
SFBch: Suero fetal bovino libre de esteroides por adsorción con carbón activado o “charcolizado”.  
SH2: Dominio *SRC homology 2*  
SIE: Elemento inducible en *sis*, secuencia específica de unión de Stat3 al ADN.  
STATs: Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción  
VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular  
W: Western blot



# **RESUMEN**

***Cross-talks* entre las vías de señalización de la proteína Transductora de Señales y Activadora de la Transcripción 3 (Stat3) y el Receptor de Progesterona en células de cáncer de mama.**

Se han descrito interacciones entre las vías de los receptores de hormonas esteroideas y de las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stats). En este trabajo, se exploró la capacidad de los progestágenos de modular la activación transcripcional de Stat3 en un modelo experimental de carcinogénesis hormonal en donde el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) indujo adenocarcinomas mamarios en ratones hembras de la cepa BALB/c y en la línea celular de cáncer de mama humano, T47D. Se encontró que las células epiteliales C4HD, del modelo tumoral C4HD inducido por MPA, expresan Stat3 y que el tratamiento de las células C4HD con MPA aumenta la expresión de la proteína Stat3. Además, el MPA induce un efecto no genómico, rápido de fosforilación en tirosina de Stat3, Jak1 y Jak2 en las células C4HD y en las T47D. El tratamiento con MPA de las células C4HD también resultó en una rápida fosforilación en tirosina de c-Src. Estos efectos fueron completamente inhibidos por el antagonista de progestágenos RU486. El bloqueo de las actividades de Jak1 y Jak2 mediante la transfección transiente de las células C4HD con vectores dominantes negativos (DN) para Jak1 o Jak2, o la inhibición de la actividad de c-Src con el inhibidor selectivo de quinasas de la familia Src, PP2, bloqueó la capacidad del MPA de inducir la fosforilación de Stat3. El tratamiento de las células C4HD con MPA indujo la unión de Stat3 al ADN. También, el MPA promovió una fuerte activación transcripcional de Stat3 en las células C4HD y en las T47D, la cual fue inhibida por RU486 y por el bloqueo de las actividades de Jak1, Jak2 y Src. Para investigar la correlación entre la activación de Stat3 inducida por MPA y el crecimiento celular, las células C4HD fueron transfectadas con un vector de expresión para una forma DN de Stat3, Stat3Y705-F, o con un mutante de Stat3 constitutivamente activo, Stat3-C. Mientras que la expresión del mutante Stat3Y705-F ejerció un efecto inhibitorio en el crecimiento celular inducido por MPA de las células C4HD, la transfección con el vector de Stat3 constitutivamente activo, provocó proliferación independiente del MPA. Finalmente, se investigó el efecto de bloquear la

activación de Stat3 en el crecimiento *in vivo* de los tumores mamarios C4HD. La inhibición de la activación de Stat3 mediante la transfección de las células C4HD con el vector de expresión para DN Stat3Y705-F, inhibió significativamente la habilidad de estas células de formar tumores en ratones singeneicos. Estos resultados demuestran por primera vez, que los progestágenos son capaces de inducir la activación transcripcional de Stat3, la cual es un requisito obligatorio para la estimulación del crecimiento inducido por MPA de las células tumorales mamarias, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Palabras claves: Cáncer de mama, receptor de progesterona, Stat3, Jaks, Src, inhibición del crecimiento *in vivo*.





# **ABSTRACT**

**Cross-talks between Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) and Progesterone Receptor signaling pathways in breast cancer cells.**

Interactions between steroid hormone receptors and signal transducers and activators of transcription (Stats)-mediated signaling pathways have already been described. In the present study, we explored the capacity of progestins to modulate Stat3 transcriptional activation in an experimental model of hormonal carcinogenesis in which the synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (MPA) induced mammary adenocarcinomas in female Balb/c mice, and in the human breast cancer cell line T47D. We found that C4HD epithelial cells, from the MPA-induced mammary tumor model, expressed Stat3 and that MPA treatment of C4HD cells up-regulated Stat3 protein expression. In addition, MPA induced rapid, nongenomic, Stat3, Jak1, and Jak2 tyrosine phosphorylation in C4HD and T47D cells. MPA treatment of C4HD cells also resulted in rapid c-Src tyrosine phosphorylation. These effects were completely abolished by the progestin antagonist RU486. Abrogation of Jak1 and Jak2 activity by transient transfection of C4HD cells with dominant negative (DN) Jak1 or DN Jak2 vectors, or inhibition of Src activity by preincubation of cells with the Src family kinase inhibitor PP2, blocked MPA capacity to induce Stat3 phosphorylation. Treatment of C4HD cells with MPA induced Stat3 binding to DNA. In addition, MPA promoted strong Stat3 transcriptional activation in C4HD and T47D cells, which was inhibited by RU486 and by blockage of Jak1, Jak2 and Src activities. To investigate the correlation between MPA-induced Stat3 activation and cell growth, C4HD cells were transiently transfected with a DN Stat3 expression vector, Stat3Y705-F, or with a constitutively activated Stat3 mutant, Stat3-C. While expression of Stat3Y705-F mutant had an inhibitory effect on MPA-induced growth of C4HD cells, transfection with the constitutively activated Stat3-C vector resulted in MPA-independent proliferation. Finally, we addressed the effect of targeting Stat3 in *in vivo* growth of C4HD breast tumors. Blockage of Stat3 activation by transfection of C4HD cells with the DN Stat3Y705-F expression vector significantly inhibited these cells' ability to form tumors in syngeneic mice. Our results have for the first time demonstrated that progestins are able to induce Stat3 transcriptional activation, which is in turn an obligatory requirement for progestin stimulation of both *in vitro* and *in vivo* breast cancer growth.

Keywords: Breast cancer, progesterone receptor, Stat3, Jaks, Src, *in vivo* targeting.

### *Agradecimientos*

*En primer lugar quiero agradecer a mi directora la Dra. Patricia Elizalde, por ser jefa, directora y formadora, por enseñarme a razonar como científica, por su cariño, por su verdadero compromiso diario con nuestro progreso en el laboratorio.*

*Al Dr. Charreau, por el apoyo que nos brinda desde CONICET.*

*A mis amigas Marian y Wendy, por la inyección diaria y justa de risa y análisis.*

*A Rox, por su afectuoso y dulce apoyo.*

*A cada uno de mis compañeros de lab, Cinthia (mi siempre bien dispuesta coequipper), Martigniano, Romina y Caro por su humanidad, generosidad y alegría.*

*A mis amigos vecinos Vicky, Petu, Juli, Kari, Ceci 214, Gusti. A Vani, Loli, Débora, Lili, Pato, Ceci 216 y Gri, por la onda y la energía. A Viole y Ana Rosa.*

*A la Agencia y al CONICET por el sustento económico para el desarrollo de mi tesis.*

*Al IBYME y a toda su gente, por prestar, aconsejar y ayudar. A Leo.*

*A los profesores de la Universidad de Buenos Aires, quiero agradecerles la excelente educación pública y gratuita que me brindaron.*

*A Adalí Pecci, y a Alberto Kornblihtt, por las lúcidas interpretaciones, los consejos y los aportes de ideas. A los Dres. Alfredo Molinolo e Isabel Frahm por los análisis histopatológicos. A la Dra. Sapia por el uso del citómetro de flujo. A Alberto Carbia-Nagashima por su asistencia en los ensayos de transfecciones transientes e inmunoprecipitaciones de Stat3. A Naty Lope por su ayuda en el bioterio.*

*A mis amigas del alma, Sole, Negri, Malú, por ser la cumbre de la amistad.*

*A Nissette, por acompañarme a ver.*

*Quiero agradecerle sobretodo a mamá, por estar, siempre al pie del cañón.*

*A papá. A Seba, Titi, Tío Pedro, Ani y Ale. A Lalá.*

*A Emilio, por ayudarme a ser feliz en el proceso de vivir.*



# **INTRODUCCIÓN**

## CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad con una altísima incidencia. Según el *National Cancer Institute*, se esperan, para el año 2006, 210.648 nuevos casos de cáncer de mama, y se estima que esta enfermedad producirá la muerte a 41034 mujeres. Por razones tanto humanitarias como económicas, la investigación en todos los aspectos de la función de la glándula mamaria y del proceso de transformación neoplásica es considerada prioritaria.

Datos epidemiológicos recientes revelaron que la incidencia de cáncer de mama no sólo aumenta con la edad sino que la mayor velocidad de incremento se observa durante los años reproductivos (Pike & Spicer, 2000; Bernstein, 2002), observándose un marcado pico de incidencia en la etapa de la pre-menopausia. Este aumento en la incidencia estaría causado por los efectos acumulativos provocados por la proliferación repetitiva que inducen los esteroides sexuales ováricos sobre el epitelio mamario (Henderson & Feigelson, 2000). Con cada sucesivo ciclo menstrual, la proliferación de las células del epitelio mamario, dirigida por los esteroides sexuales, puede resultar en la progresiva adquisición de mutaciones somáticas en el linaje celular, lo cual conduciría a la transformación y progresión neoplásica. Esta hipótesis está avalada por la observación de que una menarca tardía (Apter & Vihko, 1983; Apter *et al*, 1989) o una menopausia temprana (Trichopoulos *et al*, 1972; Pike & Ross, 2000) se correlacionan con una reducción del riesgo de cáncer de mama. En ambas situaciones, se minimiza la exposición del epitelio mamario a los esteroides sexuales a lo largo de la vida. De los esteroides ováricos, los estrógenos fueron considerados tradicionalmente los principales esteroides sexuales involucrados en la proliferación del epitelio mamario y por extensión, en la progresión de dicho linaje al fenotipo neoplásico (Henderson & Feigelson, 2000; Bernstein & Ross, 1993; Key, 1999). Basándose en el efecto antiproliferativo que la progesterona tiene en el endometrio, en contraposición a los estrógenos, se asumió que dicho esteroide ejercería similares efectos inhibitorios en el epitelio mamario y, por lo tanto, no contribuiría significativamente a la iniciación o progresión tumoral (Lydon *et al*, 2000). Con estas evidencias, no obstante, ha sido difícil explicar por qué el índice proliferativo del epitelio mamario era más alto durante la fase luteal del ciclo menstrual dominada por la

progesterona (King, 1993), por qué la inclusión de la progesterona en los protocolos de terapia de reemplazo hormonal (HRT) incrementó la densidad de las células epiteliales mamarias con respecto a la administración de estrógenos solos (Hofseth *et al*, 1999; Haslam *et al*, 2002), por qué los progestágenos combinados en anticonceptivos orales podían prevenir el cáncer de ovario y endometrio pero no el de mama (Pike & Spicer, 2000) y por qué un gran número de ensayos clínicos mostraron un leve pero significativo aumento en el riesgo de cáncer de mama cuando el acetato de medroxiprogesterona (MPA) fue incluido en los regímenes de HRT (Magnusson *et al*, 1999; Ross *et al*, 2000). En particular, el ensayo *Women's Health Initiative Randomized Trial*, cuyo objetivo fue determinar la relación entre el uso de estrógenos y progesterona y el cáncer de mama en más de 16000 mujeres postmenopáusicas en Estados Unidos, debió ser detenido antes de la finalización del protocolo previsto. Esta determinación se tomó debido a que las estadísticas para cáncer de mama invasivo, excedieron los límites permitidos para este efecto adverso (Chlebowski *et al*, 2003). Finalmente, los resultados del estudio clínico *The Million Women Study*, cuyo objetivo fue investigar la relación entre distintos patrones de uso de HRT e incidencia de cáncer de mama y mortalidad en más de un millón de mujeres inglesas, permitió interpretar, efectivamente, que el uso de HRT que incluía a la progesterona, está asociado a un aumento en el riesgo de cáncer de mama respecto al que incluye sólo estrógenos (Beral, 2003).

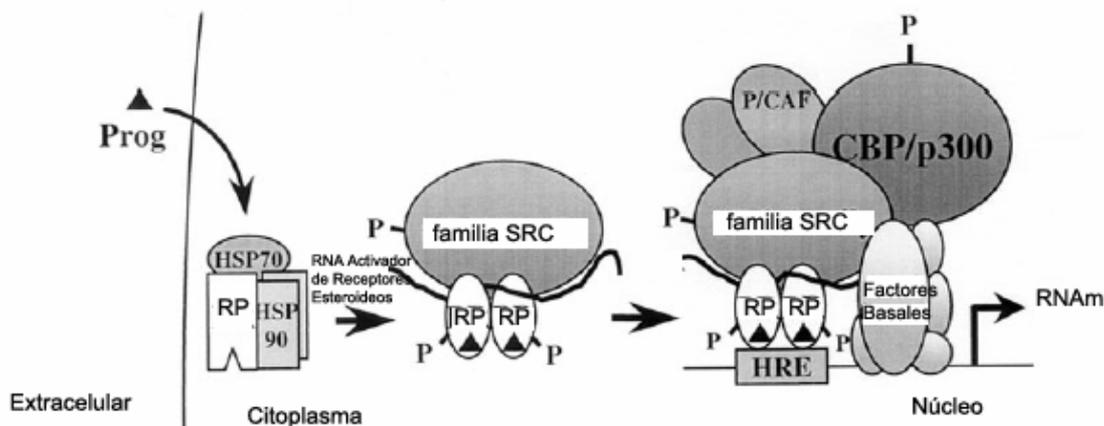
Los efectos de la progesterona en la glándula mamaria son sin duda controversiales debido a la complejidad estructural y funcional de este órgano. Dependiendo del modelo experimental, del contexto celular y la duración del tratamiento, la progesterona puede ejercer efectos proliferativos o antiproliferativos en el crecimiento del epitelio mamario. Se ha hipotetizado que, luego de una ronda de proliferación, el pulso inicial de progesterona actúa como un factor iniciador para las acciones de factores secundarios involucrados en vías proliferativas, de diferenciación, o apoptóticas. Serían entonces, los múltiples factores secundarios que regulan el crecimiento y desarrollo de un tumor de mama, en combinación con la progesterona, los que contribuyen con esta variedad de efectos (Lange *et al*, 1999).

El concepto primitivo que consideraba a los estrógenos inductores y a la progesterona protectora en el carcinoma mamario, se encuentra actualmente y, a la luz de las explicaciones antes citadas, en proceso de revisión.

Al presente, uno de los aspectos más importantes en el estudio de la influencia hormonal en el carcinoma mamario es dilucidar la participación de los progestágenos en su iniciación y progresión.

## 1. EL RECEPTOR DE PROGESTERONA

El receptor de progesterona (RP), miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas con actividad de factores de transcripción, media la mayoría de los efectos fisiológicos de la progesterona. Luego de la interacción con su ligando (la progesterona), el complejo receptor/ligando se disocia de las proteínas chaperonas, transloca al núcleo, dimeriza e interactúa directa o indirectamente con el genoma para activar o silenciar la transcripción de aquellos genes que regula, lo que da como resultado la elaboración de la respuesta fisiológica de la célula blanco (Figura 1).



**Figura 1:** Modelo de acción del receptor de progesterona. El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas chaperonas (Hsp 70 y 90). Al unirse a la hormona, el RP se fosforila y se disocia de las proteínas chaperonas. Transloca del citoplasma al núcleo, se fosforila nuevamente en varios residuos, dimeriza y tras el reclutamiento de las proteínas necesarias, se une a los elementos respondedores a hormonas (HRE) presentes en los promotores de los genes cuya transcripción regula. SRC: *Steroid receptor coactivator*, CBP/p300: *cAMP-response-element-binding (CREB)-binding protein/300-kD protein*, P/CAF: *p300/CBP Associated Factor* (Rowan & O'Malley, 2000).

Hasta el momento se han descrito dos isoformas RP-A, de 94 kDa, y RP-B, de 120 kDa, que son sintetizadas a partir del mismo gen. Estos subtipos de receptores resultan de sitios alternativos en el inicio de la traducción a partir de un mismo RNA mensajero

(Conneely *et al*, 1987) o a partir de la transcripción alternativa desde dos promotores distintos (Kastner *et al*, 1990). Estas isoformas son estructuralmente idénticas excepto por una porción de 164 aminoácidos presente en la región del N-terminal del RP-B y ausente en el RP-A. A pesar de que ambas tienen similar afinidad por el ADN, se ha descrito que regulan la expresión de diferentes genes, que tienen actividades transcripcionales distintas y que reclutan correguladores diferentes (Richer *et al*, 2002).

El mecanismo por el cual los receptores de hormonas esteroideas unidos a sus ligandos, afectan la velocidad de transcripción dirigida por la RNA polimerasa II involucra la interacción de los receptores con componentes del complejo de pre-iniciación. Esta interacción puede ser directa, o puede ocurrir indirectamente a través del reclutamiento secuencial de varios coactivadores. Los coactivadores constituyen un grupo diverso de moléculas que otorgan múltiples funciones estructurales y enzimáticas al promotor (Rowan & O'Malley, 2000). Son reclutados al complejo RP-ligando y tienen la capacidad de facilitar el ensamblado del complejo de pre-iniciación y de aumentar la transactivación dependiente del receptor (Figura 1)(Li & O'Malley, 2003).

### **1.1 Receptor de Progesterona y cáncer de mama**

A pesar de los significativos avances logrados con respecto a la funcionalidad y estructura del RP *in vitro*, el progreso con respecto a la respuesta fisiológica atribuible a este receptor nuclear ha estado bastante retrasado debido a la superposición con las funciones de los estrógenos, muchas de las cuales dependen de la activación de RP. Experimentos muy recientes realizados utilizando ratones *Knock-out* y *Knock-in* del RP demostraron que la señal proliferativa de la progesterona no sólo es esencial en la morfogénesis y función normal de la glándula mamaria, sino también en el aumento de incidencia de tumores mamarios (Ismail *et al*, 2003). En estos experimentos se observó que ratones normales para la expresión de RP pero que poseían una alta cantidad de progesterona circulante, tenían una mayor incidencia de tumores mamarios, al tratarlos con el carcinógeno dimetil-benzantraceno (DMBA), en comparación a los ratones *Knock-out* del RP. Además, este estudio no sólo manifestó la importancia de la progesterona como un mitógeno endócrino mamario, sino también avaló las conclusiones obtenidas de aquellos

estudios en los que se discute la relación riesgo-beneficio asociada a los regímenes de HRT post-menopáusico que incluyen a la progesterona.

La regulación transcripcional mediada por el RP abarca varios niveles de complejidad y mecanismos intrincados involucrando acciones genómicas (efectos transcripcionales directos) y efectos rápidos o no genómicos. Estos últimos fueron descubiertos a partir del hallazgo de vías de regulación génica mediadas por el RP pero que no son dependientes de la unión del receptor al ADN. La participación de los efectos no genómicos de los progestágenos en la regulación del desarrollo del cáncer de mama, permanece muy poco investigada. Los trabajos pioneros de Auricchio y sus colaboradores, abrieron el camino a la exploración en este campo. Así, estos autores demostraron que el tratamiento con progestágenos de las células de cáncer de mama T47D, inducía la activación rápida de la vía Src/Ras/Erks y, como consecuencia, un aumento de la proliferación celular (Ballare *et al*, 2003;Castoria *et al*, 1999;Migliaccio *et al*, 1998). Edwards y sus colaboradores también mostraron la capacidad del RP de activar la quinasa c-Src y exploraron los mecanismos moleculares de la interacción entre RP y c-Src (Boonyaratanakornkit *et al*, 2001).

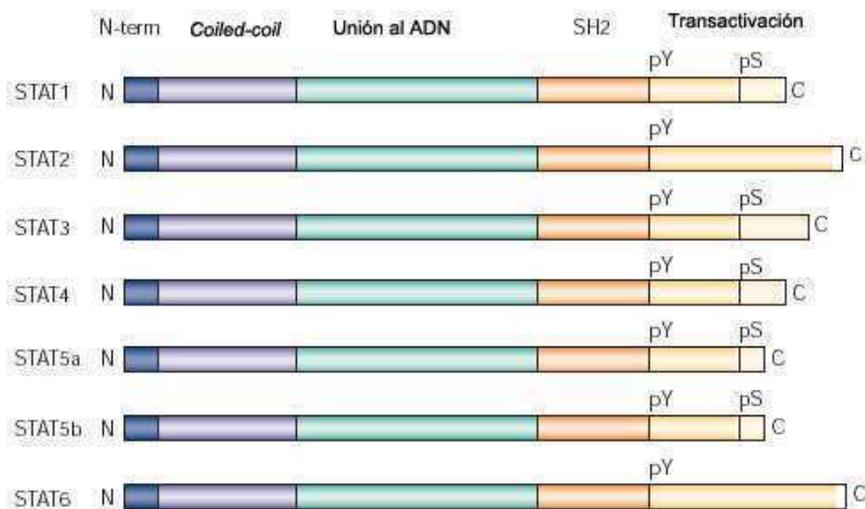
La identificación de las vías moleculares que median la señal de la progesterona será esencial para proveer un contexto molecular a la visión actual de la progesterona como mitógeno endócrino mamario y para proveer nuevos blancos para el diagnóstico del cáncer de mama, su pronóstico, y las medidas terapéuticas a aplicar.

## **2. PROTEÍNAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STATS)**

Los mecanismos por los cuales los progestágenos estimulan el crecimiento de las células de cáncer de mama no han sido descifrados completamente. Pero existen líneas de evidencia que demuestran que la convergencia entre las vías de señalización de los progestágenos y de los factores de crecimiento (FC), media los efectos proliferativos de los progestágenos en las células tumorales mamarias (Boonyaratanakornkit *et al*, 2001;Lange *et al*, 1998;Migliaccio *et al*, 1998;Balana *et al*, 2001;Balana *et al*, 1999;Labriola *et al*, 2003;Salatino *et al*, 2004).

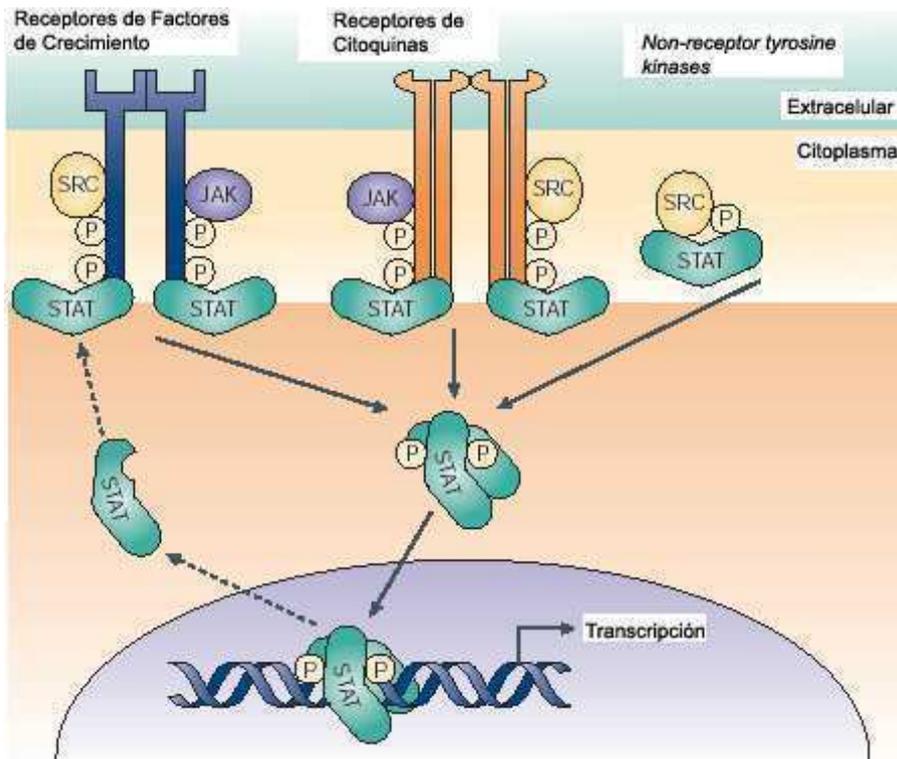
Los miembros de la familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stats) han sido involucrados en las interacciones entre las vías de las hormonas esteroideas y de los FC. Tal tipo de regulación podría constituir un mecanismo adecuado para que proteínas de amplia expresión (como es el caso de las Stats y de los receptores nucleares de hormonas esteroideas) resulten en funciones fisiológicas específicas en tipos celulares individuales (Bamberger *et al*, 1996).

Se han identificado 7 genes codificantes para Stats en mamíferos: Stat1, Stat2, Stat3, Stat5a, Stat5b y Stat6 (Bromberg & Darnell, Jr., 2000). Además, reacciones de *splicing* alternativo o de proteólisis, generan formas adicionales de Stat1 (Stat1 $\alpha$  o p91 y Stat1 $\beta$  o p84) y Stat3 (Stat3 $\alpha$  y Stat3 $\beta$ ). Las proteínas resultantes contienen entre 750 y 850 aminoácidos y la estructura de sus 6 dominios es altamente homóloga y conservada (Figura 2).



**Figura 2:** Representación esquemática de los dominios estructurales de los miembros de la familia de proteínas Stats. El dominio N-terminal está involucrado en las interacciones proteína-proteína. El dominio de unión al ADN hace contacto directo con sitios consenso TT(N<sub>4-6</sub>)AA en los promotores de los genes regulados. La interacción entre el dominio SH2 de un monómero y el residuo fosfotirosina de otro media la formación del dímero activo. El dominio de transactivación está involucrado en la activación transcripcional de los genes blanco a través de interacciones con correuladores. El dominio carboxilo terminal contiene un sitio de fosforilación en serina que estimula la activación transcripcional en algunos miembros de la familia (Yu & Jove, 2004).

Las Stats funcionan como moléculas señalizadoras en el citoplasma y como factores de transcripción luego de su translocación al núcleo (Bromberg & Darnell, Jr., 2000; Yu & Jove, 2004). La unión de FC (Olayioye *et al*, 1999; Ren & Schaefer, 2002; Silvennoinen *et al*, 1993) o de citoquinas (péptidos solubles que estimulan distintas respuestas de células que participan en la inmunidad y la inflamación) a sus receptores resulta en la activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor o de las quinasas intracelulares asociadas al receptor, como quinasas de la familia de Janus (Jaks) o de Src (Darnell, Jr. *et al*, 1994; Taga & Kishimoto, 1997). Estas quinasas fosforilan las colas citoplasmáticas de los receptores en residuos tirosina específicos, que proveen sitios de anclaje para el reclutamiento de monómeros de Stats por sus dominios *SRC homology 2* (SH2). Las Stats reclutadas son fosforiladas en residuos tirosina específicos en el dominio carboxilo terminal y forman homo o heterodímeros activos por interacción recíproca a través del residuo fosfotirosina (pTyr) y del dominio SH2, que deben ser mutuamente compatibles. Las Stats pueden también ser fosforiladas en serina en el dominio de transactivación. Las Stats fosforiladas dimerizan y translocan al núcleo, donde, a través de su dominio de unión al ADN, reconocen su secuencia específica en el ADN y regulan la transcripción génica (Figura 3). Debido a que las Stats pueden conservar la habilidad de unirse a la misma secuencia altamente conservada, hay una notable superposición en el sitio de reconocimiento en el ADN entre Stat1, Stat3 y Stat5 (Leonard & O'Shea, 1998; Decker *et al*, 1997).



**Figura 3:** Vías de señalización que convergen en la activación de Stats. La unión de FC o de citoquinas a sus receptores resulta en la activación de la actividad tirosina quinasa del receptor o de las quinasas Jaks o Src. Las Stats fosforiladas dimerizan, translocan al núcleo y se unen al ADN resultando en la transcripción génica. La activación de las Stats puede, dependiendo del contexto celular y de las condiciones de crecimiento de las células, producir proliferación, diferenciación, o apoptosis (Yu & Jove, 2004).

El patrón de activación de las Stats suele ser específico del ligando y del tipo celular. Además, su actividad está finamente regulada en términos de la duración e intensidad, por varias familias de proteínas (Starr *et al*, 1997; Shuai, 2000; Neel & Tonks, 1997). Dado que la actividad de las Stats está regulada por varias modificaciones post-traduccionales, y por interacciones proteína-proteína, estos factores de transcripción son capaces de integrar señales de múltiples redes de señalización. Debido a la gran variedad de ligandos y FC capaces de activarlas, es que las Stats están involucradas en un gran espectro de eventos celulares, incluyendo diferenciación, proliferación, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune (Silva, 2004).

## 2.1 Stat3 como reguladora de la transformación celular

Stat3 regula una serie de vías importantes en la tumorigénesis. Se han encontrado sitios de unión de Stat3 en los promotores de genes cuyos productos están involucrados en la progresión del ciclo celular y la apoptosis (c-fos, c-Myc, ciclina D1) (Bromberg *et al*, 1999; Leslie *et al*, 2006) y en la angiogénesis tumoral (Vascular Endothelial Growth Factor o VEGF) (Niu *et al*, 2002). Se probó además que Stat3 participa en los procesos de invasión y metástasis y evasión tumoral del sistema inmune (Grandis *et al*, 2000; Yu & Jove, 2004) (Dauer *et al*, 2005; Wang *et al*, 2004). Los mecanismos a través de los cuales las Stats promueven eventos pro-tumorigénicos constituyen un área de activa investigación. La fosforilación de las Stats está exquisitamente regulada y perturbar el delicado balance de las Stats activas en las células podría predisponer a la malignización mediante la desregulación de la apoptosis o la proliferación.

Se ha encontrado activación constitutiva y persistente de Stat3 en una gran variedad de tumores humanos, entre ellos de mama, y en líneas celulares establecidas a partir de tumores humanos (Bowman & Jove, 1999). En particular, hasta 2004, los reportes indicaban que Stat3 está constitutivamente activa en el 82% de cánceres de próstata (Mora *et al*, 2002), en el 69% de cánceres de mama (Dolled-Filhart *et al*, 2003), en el 82% al 100% de carcinomas de cabeza y cuello (Nagpal *et al*, 2002) y en el 71% de carcinomas nasofaríngeos (Hsiao *et al*, 2003). Además, se ha demostrado que Stat3 es requerida para la transformación de los fibroblastos NIH 3T3 por una serie de oncogenes (Bromberg *et al*, 1998; Turkson *et al*, 1999) y para la proliferación tumoral. De hecho, una forma mutante constitutivamente activa de Stat3, Stat3-C, (que dimeriza espontáneamente por puentes cisteína-cisteína en vez de por interacciones pTyr-SH2) es suficiente para inducir formación tumoral en ratones *nude* cuando se inoculan células transfectadas con Stat3-C (Bromberg *et al*, 1999). Tales hallazgos reafirman la concepción de Stat3 como un mediador en el proceso de transformación maligna.

Los efectos de Stat3 activa son muy diferentes según el tipo celular; en particular Stat3 puede ser una señal de muerte para las células epiteliales secretoras de la mama normal (Watson, 2001) en comparación con los efectos opuestos de Stat3 en carcinomas mamarios. Una de las razones de estos efectos paradójicos puede deberse a que, mientras

que la activación de Stats es un proceso transiente y modulado finamente en células normales, la sobreexpresión o activación persistente de tirosina quinasas en cáncer puede provocar la activación constitutiva de Stats. De hecho, hasta ahora, no se han reportado mutaciones naturales de Stat3 que resulten en su activación persistente. Por lo cual, es probable que la generalizada activación de Stat3 en líneas celulares de cáncer y en tejidos sea debido a un malfuncionamiento de los eventos de señalización río arriba de Stat3. Esto produce cambios permanentes en la expresión de genes que controlan procesos biológicos fundamentales, que pueden estar desregulados en células cancerosas, cambiando el fenotipo celular (Yu & Jove, 2004).

## 2.2 Stats y los Receptores de hormonas esteroideas

Las Stats constituyen un punto de convergencia importante para muchas vías de señalización. En particular, se demostró que las interacciones entre las vías de las Stats y de los receptores de hormonas esteroideas, tienen una naturaleza bidireccional, en donde los receptores de hormonas esteroideas regulan la transcripción dependiente de Stats; y de manera inversa, las Stats modulan la transcripción mediada por hormonas esteroideas. (De Miguel *et al*, 2003; Stoecklin *et al*, 1999; Zhang *et al*, 1997; Lechner *et al*, 1997; Takeda *et al*, 1998; Lechner *et al*, 1997).

En particular, el grupo de K. Horwitz ha demostrado interacciones funcionales entre progestágenos y Stats (Lange *et al*, 1998; Richer *et al*, 1998) en donde el tratamiento de la línea celular de cáncer de mama humano T47D con el progestágeno sintético R5020 indujo un aumento en los niveles de expresión de Stat3 y de Stat5. Estos autores probaron también la existencia de una asociación constitutiva entre Stat5 y RP-B en células Hela transfectadas con un vector de expresión para esa isoforma del RP (Richer *et al*, 1998), sugiriendo un mecanismo para la coordinación de la proliferación y diferenciación estimuladas por el RP y Stat5. Este grupo propone que, junto con la regulación ejercida por la progesterona en las interacciones proteína-proteína (RP-Stat), la hormona podría estar también regulando la expresión de receptores de citoquinas y FC involucrados en la señalización de Stats (Lange *et al*, 1999).

Otro ejemplo de asociación de receptores de hormonas esteroideas y Stats es el hallazgo de la formación de un complejo entre el receptor de glucocorticoides (GR) y Stat5 en la transcripción del gen de la  $\beta$ -caseína. El grupo de B. Groner probó que esta interacción resulta en un aumento sinérgico en la activación transcripcional mediada por Stat5 y en una disminución en la función del GR en el elemento respondedor a glucocorticoides (GRE) (Stoecklin *et al*, 1999; Cella *et al*, 1998).

La integración de diferentes vías de señalización constituye un medio para aumentar la versatilidad de las respuestas a estímulos extracelulares (Lucas & Granner, 1992; Doppler, 1994; Bamberger *et al*, 1996). Tal es el caso del GR, que, unido a su ligando, junto con Stat3 activo, forman un complejo que es capaz de señalar uniéndose, tanto al GRE, como al elemento respondedor a Stat3 en el ADN (Zhang *et al*, 1997). Las implicancias biológicas de estas interacciones son amplias, debido a los roles de las Stats y los receptores de hormonas esteroideas en múltiples procesos celulares, como proliferación y diferenciación, control del ciclo celular, apoptosis y desarrollo.

También se describió previamente la habilidad del  $17\beta$ -estradiol en promover la translocación nuclear de Stat3 y Stat5 como un efecto no genómico del receptor de estrógenos (RE) (Bjornstrom & Sjoberg, 2002).

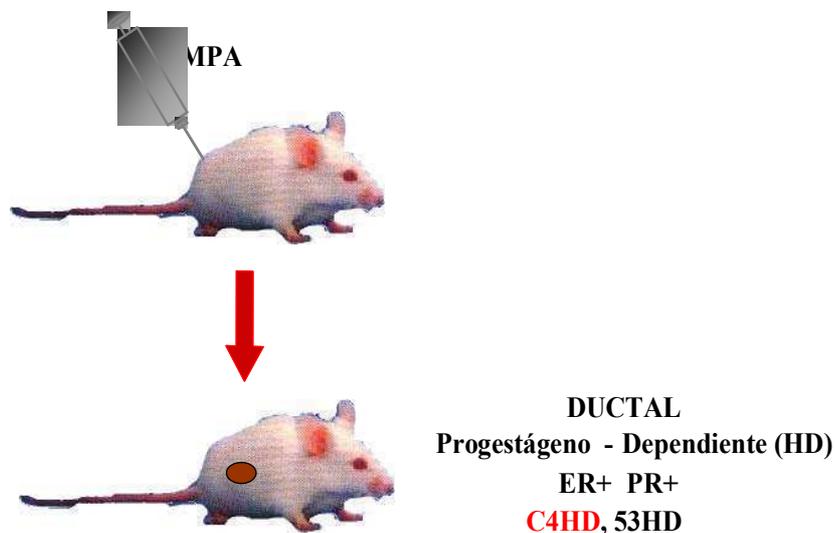
En particular, la regulación de Stat3 por progestágenos se comprobó en el mesometrio decidual de ratas durante la preñez, en donde la progesterona aumentó el *pool* citoplasmático de Stat3 (Liu & Ogle, 2002). Este efecto fue inhibido por el antagonista de progestágenos RU486, lo que prueba que la expresión de Stat3 es, en este modelo, el resultado de la acción de la progesterona.

Resultados consistentes con estas líneas de evidencia se obtuvieron también de un análisis de la expresión de Stat3 fosforilada en líneas celulares de cáncer de mama y en tejidos de cáncer de mama invasivo, que mostraron que los altos niveles de fosforilación de Stat3 están significativamente asociados a la expresión del RP (Hsieh *et al*, 2005).

Por todo lo expuesto, se desprende que tanto el RP como las Stats son moléculas claves en el desarrollo del cáncer de mama, por eso decidimos estudiar su relación en esta enfermedad.

### 3. MODELO EXPERIMENTAL DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS MURINOS INDUCIDOS POR PROGESTÁGENOS

En este trabajo de investigación se ha utilizado el modelo experimental murino de carcinogénesis hormonal desarrollado por la Dra. Claudia Lanari (Lanari *et al*, 1986a) (Figura 4). En este modelo, la administración prolongada del progestágeno sintético MPA a ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c resultó en la aparición de adenocarcinomas mamarios. En particular el tumor C4HD (Figura 4) es de histología ductal con capacidad de dar metástasis en pulmón y nódulos linfáticos, expresa altos niveles de RE y de RP (Molinolo *et al*, 1987), sobreexpresa el Receptor con actividad intrínseca de tirosina quinasa tipo I (RTK-I) ErbB2 y expresa niveles no detectables de Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR o ErbB1) (Lanari *et al*, 1989;Kordon *et al*, 1993;Lanari *et al*, 1986a;Lanari *et al*, 1986b;Lanari *et al*, 1989). Este tumor se mantiene actualmente por pasajes singeneicos en ratones hembras vírgenes de la cepa BALB/c tratados con un *depot* de MPA (40 mg) y manifiesta un comportamiento progestágeno-dependiente (HD) en su crecimiento (Lanari *et al*, 1989).

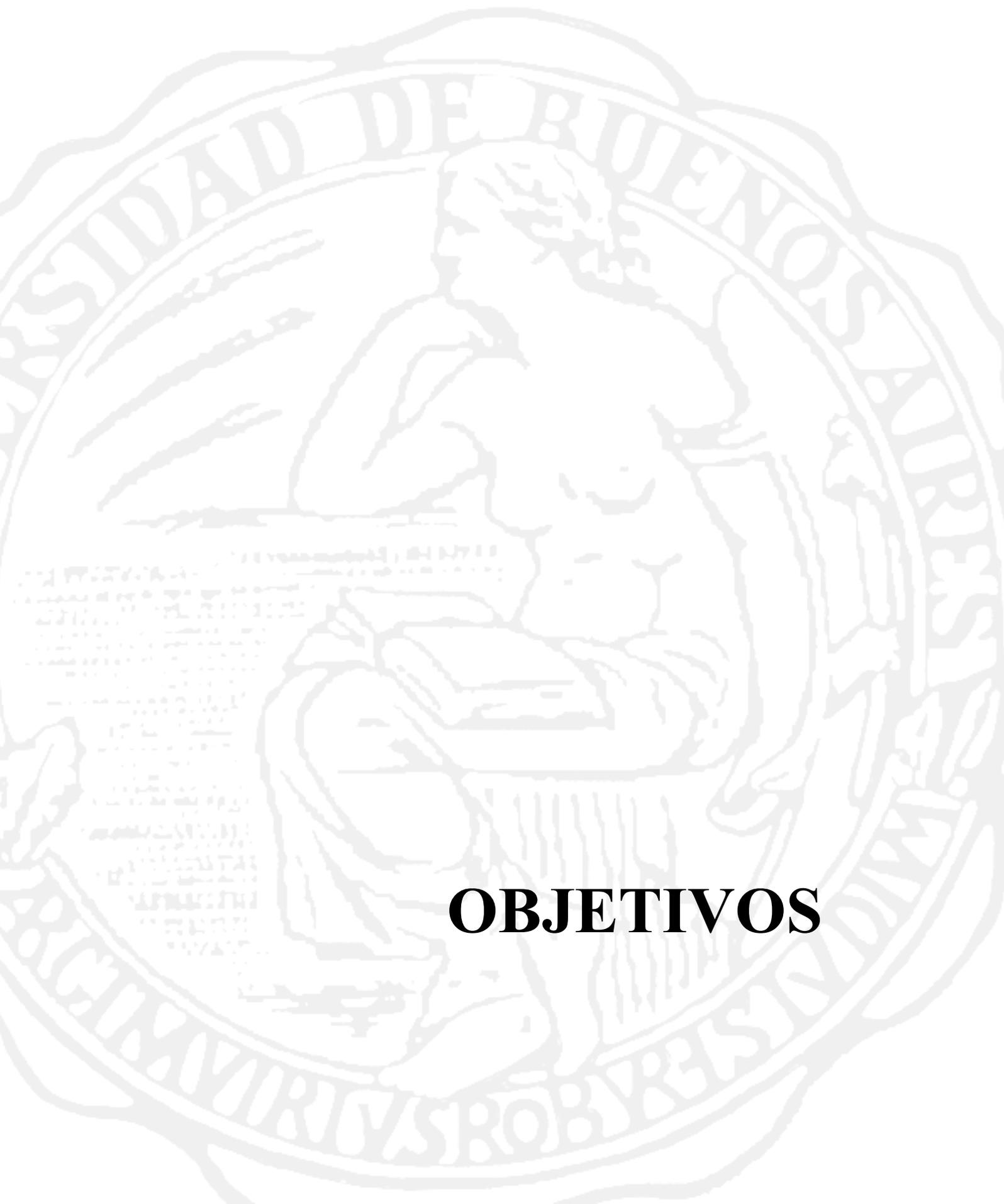


**Figura 4: Modelo de carcinogénesis mamaria inducida por MPA.**

La administración prolongada de MPA a hembras vírgenes BALB/c indujo la aparición de tumores. En su mayoría se desarrollaron tumores de histología ductal, con un perfil progestágeno-dependiente (C4HD, 53HD).

Las alteraciones morfológicas que preceden la formación de estos tumores son comparables a las lesiones preneoplásicas del cáncer de mama humano (Molinolo *et al*, 1987) por lo que resultan un modelo experimental apropiado para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de dicha enfermedad.

A partir del tumor C4HD, se obtuvieron cultivos primarios de células epiteliales que retuvieron las características del tumor parental a nivel de expresión de receptores y de crecimiento progestágeno-dependiente.



# **OBJETIVOS**

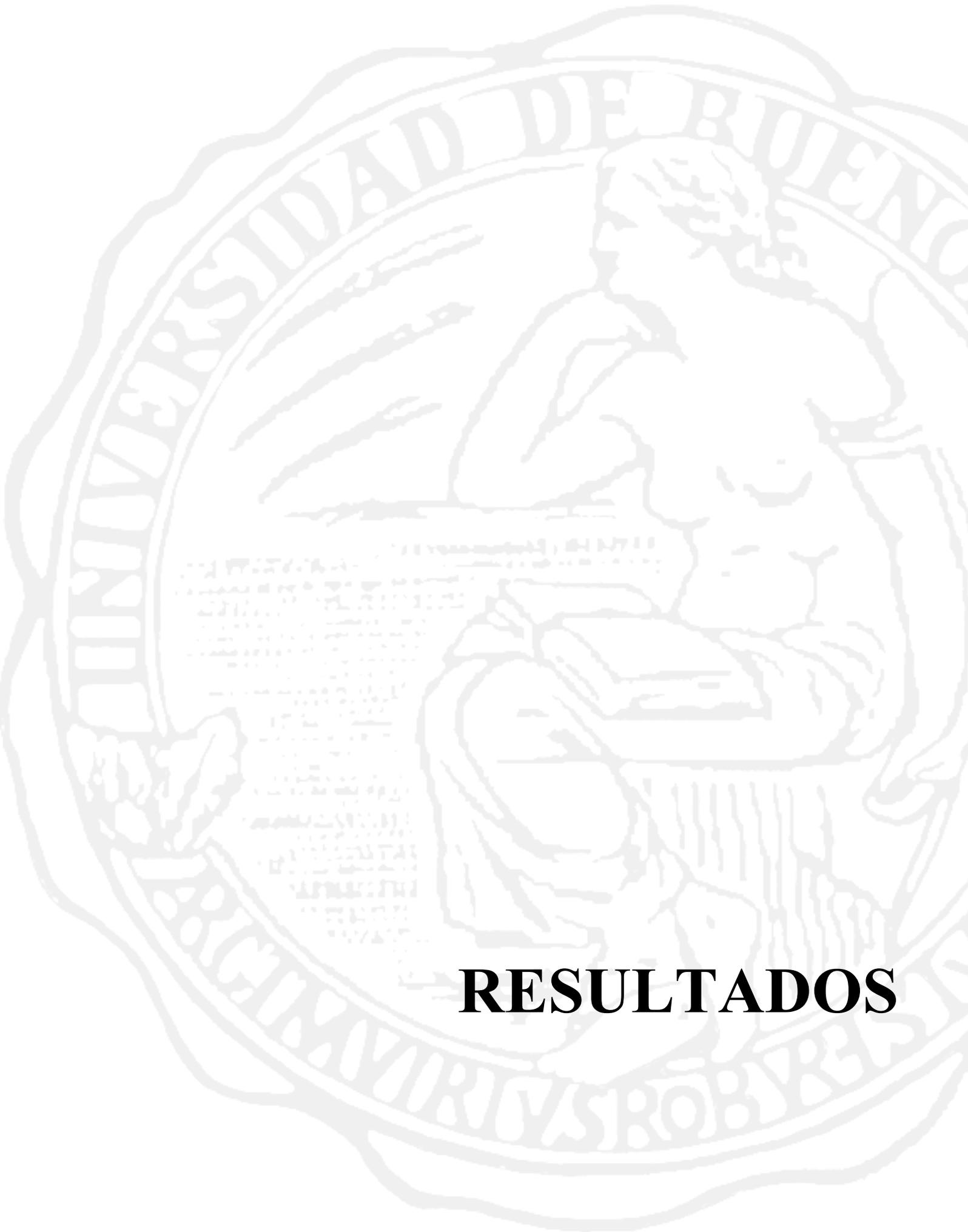
El **objetivo general** de este trabajo fue estudiar las interacciones entre la vía del RP y de Stat3 en células de cáncer de mama.

- Los **objetivos particulares** propuestos fueron:

**Objetivo 1:** Evaluar la capacidad del MPA de activar Stat3 en las células tumorales mamarias murinas C4HD y en las células tumorales mamarias humanas T47D.

**Objetivo 2:** Explorar los mecanismos moleculares involucrados en la activación de Stat3 por MPA.

**Objetivo 3:** Investigar la participación de Stat3 en la proliferación inducida por MPA de las células C4HD.

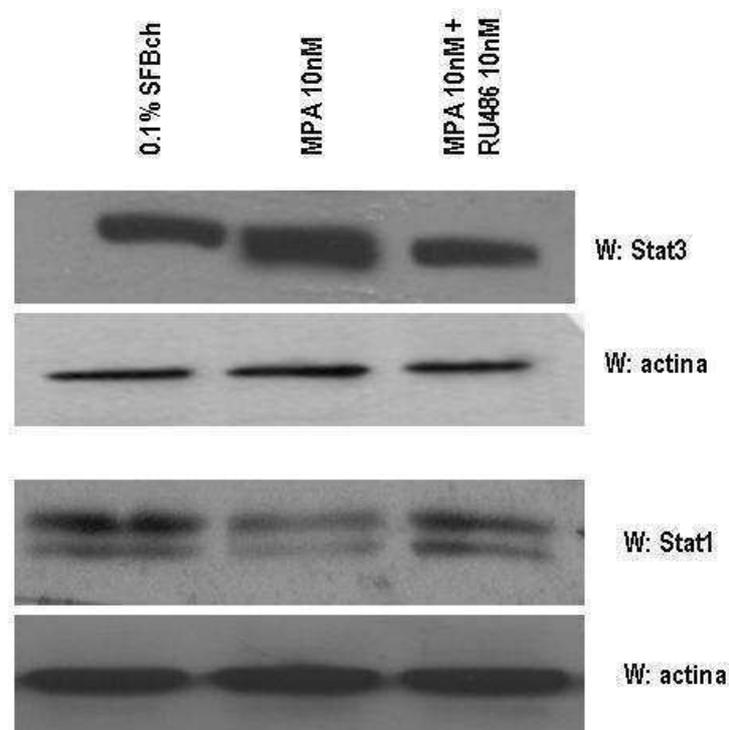


# **RESULTADOS**

### El MPA induce la fosforilación en tirosina de Stat3 actuando a través del RP clásico y mediante un mecanismo dependiente de la activación de Jak1, Jak2 y Src

En primer término, en este trabajo se investigó la expresión y la fosforilación en tirosina de Stat3 en cultivos primarios de células C4HD. Como se muestra en la figura 5, las células C4HD expresan Stat3 a nivel proteico y el tratamiento con MPA (10nM) durante 48hs, resultó en un aumento de 2 a 3 veces en su expresión. Tal regulación positiva en la expresión de Stat3 por progestágenos ya fue reportada en la línea celular de cáncer de mama humano, T47D (Richer *et al*, 1998). El antagonista de progestágenos RU486 inhibió completamente el efecto estimulador del MPA sobre la expresión de Stat3 (Figura 5, primer panel).

Las células C4HD también expresan Stat1 (Figura 5, tercer panel). Sin embargo, el MPA no sólo no ejerció efecto sobre la expresión de Stat1 sino que en algunos experimentos, incluso, la redujo levemente (Figura 5, tercer panel).



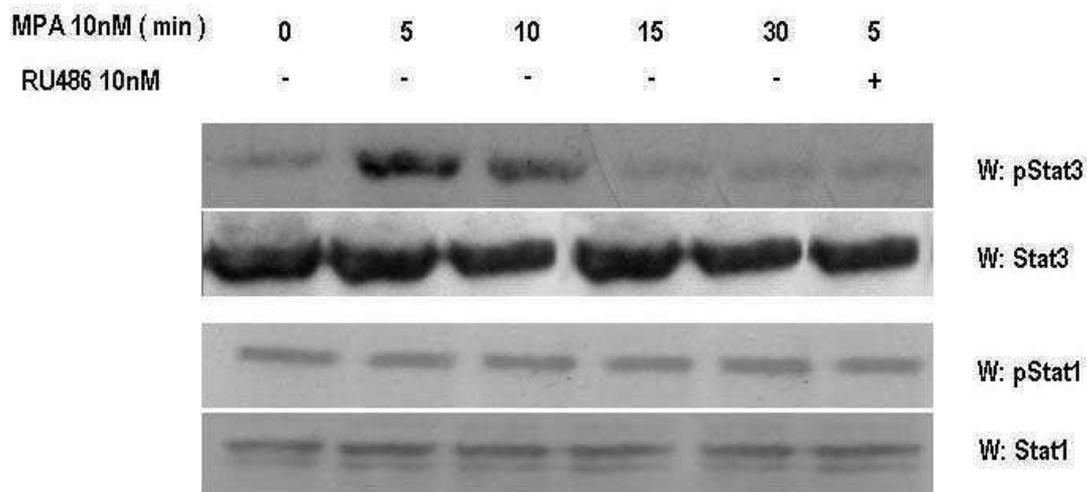
**Figura 5. El MPA aumenta la expresión de Stat3.**

Cultivos primarios de células C4HD fueron tratados por 48 h en medio con SFBch suplementado con 10 nM MPA o MPA+10 nM RU486. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-Stat3 o con un anticuerpo anti-Stat1. Se realizó un ensayo de

Western Blot usando un anticuerpo anti-actina empleando idénticos extractos celulares como control de especificidad del efecto del MPA. Este es un experimento representativo de un total de cuatro en donde el error Standard (ES) estuvo dentro del 10%. W: *Western blot*.

También se encontró, mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo específico anti fosfo-Stat3, que el tratamiento de las células C4HD con MPA durante 5 a 10 minutos, indujo la fosforilación de Stat3 en el residuo tirosina 705 (Figura 6A, primer panel). Este efecto fue completamente inhibido en presencia de RU486 (Figura 6A, primer panel).

Por el contrario, Stat1 presenta niveles de fosforilación basales en el residuo tirosina 701, que no son afectados por el tratamiento con MPA (Figura 6A, tercer panel).

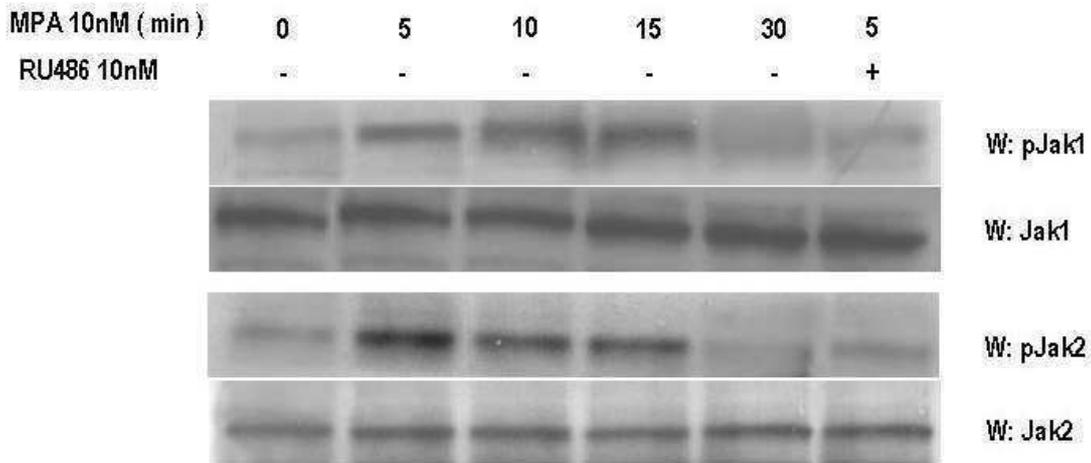


**Figura 6A. EL MPA induce fosforilación en tirosina de Stat3 en las células C4HD.**

Cultivos de células C4HD fueron tratados con 10nM MPA o MPA+10 nM RU486 durante los tiempos indicados. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con los anticuerpos anti-fosfotirosina 705 Stat3 y anti-fosfotirosina 701 Stat1. Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con los anticuerpos anti-Stat3 y Stat1. Este experimento fue repetido seis veces con resultados similares. W: *Western blot*.

La participación de los miembros de la familia de quinasas en tirosina Janus (Jaks) en la fosforilación de Stats mediada por citoquinas ha sido bien descrito (Aaronson & Horvath, 2002) pero no se ha explorado la participación de las Jaks en la activación de Stat3 inducida por progestágenos. Se probó que Jak1 y Jak2 están expresadas en las células C4HD (Figura 6B, segundo y cuarto panel). El tratamiento con MPA indujo una intensa fosforilación en tirosina de Jak1 y de Jak2, observada desde los 5 minutos de

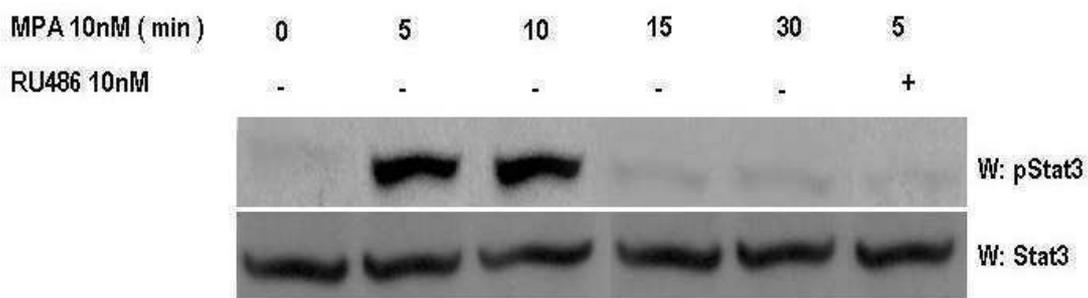
tratamiento, la cual fue inhibida por el antiprogéstágeno RU486 (Figura 6B, primer y tercer panel, respectivamente).



**Figura 6B. El MPA induce fosforilación en tirosina de Jak1 y Jak2 en las células C4HD.**

Cultivos de células C4HD fueron tratados con 10nM MPA o MPA+10 nM RU486 durante los tiempos indicados. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con los anticuerpos anti-fosfotirosina 1022/1023 Jak1, y anti-fosfotirosina 1007/1008 Jak2. Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con los anticuerpos anti- Jak1 y Jak2. Este experimento fue repetido seis veces con resultados similares. W: *Western blot*.

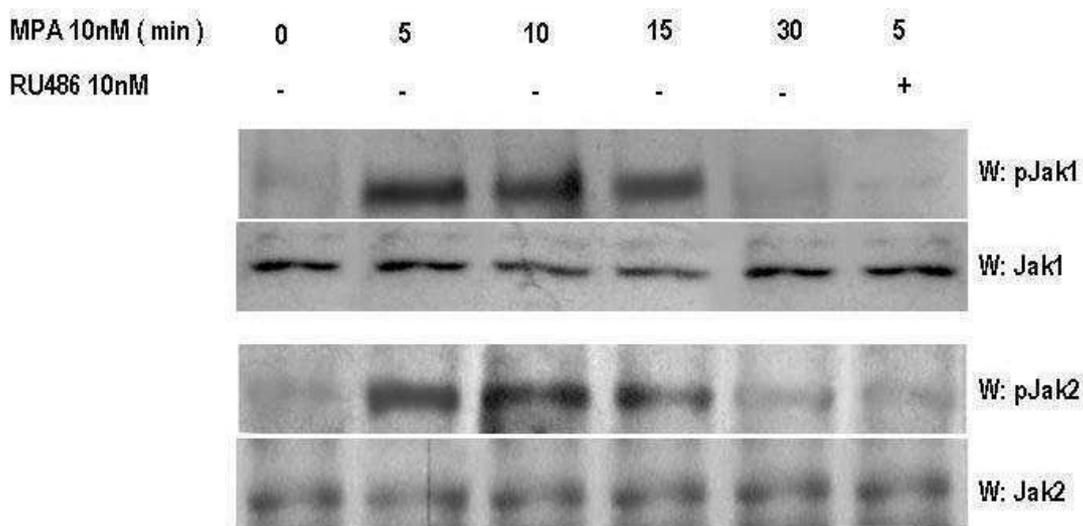
Experimentos similares fueron llevados a cabo en las células T47D, que expresan altos niveles de RP y por lo tanto, se han convertido en el modelo principal de estudio de las acciones de la progesterona y de los progéstágenos sintéticos en células humanas. Como se muestra en la figura 7A, el MPA fue capaz de inducir la fosforilación en tirosina de Stat3 en las células T47D, y este efecto fue bloqueado por RU486.



**Figura 7A. El MPA induce fosforilación en tirosina de Stat3 en las células T47D.**

Células T47D fueron tratadas con 10nM MPA o MPA+10 nM RU486 durante los tiempos indicados. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con el anticuerpo anti-fosfotirosina 705 Stat3. Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con el anticuerpo anti-Stat3. Este experimento fue repetido seis veces con resultados similares. W: *Western blot*.

El tratamiento con MPA de las células T47D resultó además en la fosforilación en tirosina de Jak1 y Jak2, la cual fue bloqueada por RU486 (Figura 7B). A pesar de que la fosforilación en tirosina de Stat3 fue muy transiente, la activación de las Jaks se mantuvo durante como mínimo 15 minutos y volvió a los niveles basales a los 30 minutos de tratamiento con MPA, tanto en las células C4HD (Figura 6B) como en la línea T47D (Figura 7B).

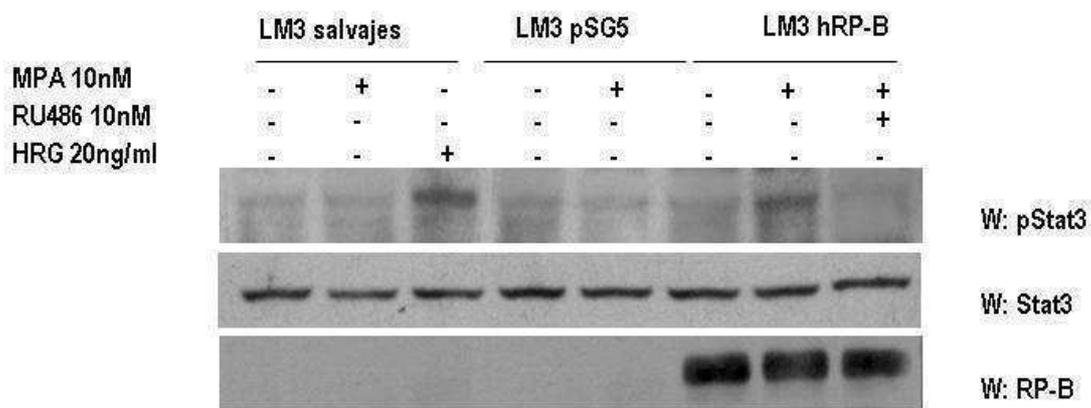


**Figura 7B. El MPA induce fosforilación en tirosina de Jak1 y Jak2 en las células T47D.**

Células T47D fueron tratadas con 10nM MPA o MPA+10 nM RU486 durante los tiempos indicados. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con los anticuerpos, anti-fosfotirosina 1022/1023 Jak1, y anti-fosfotirosina 1007/1008 Jak2. Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con los anticuerpos anti-Jak1 y Jak2. Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

Con el objetivo de evaluar si el RP clásico es el mediador de la fosforilación de Stat3 inducida por MPA, se trabajó con la línea tumoral mamaria murina LM3, de gran capacidad metastásica, que carece de expresión de RP (Puricelli *et al*, 2002). Nuestro grupo ha demostrado previamente que, en la línea tumoral LM3, el tratamiento con heregulina (HRG), ligando de los RTKs-I, induce la fosforilación de Stat3 en tirosina

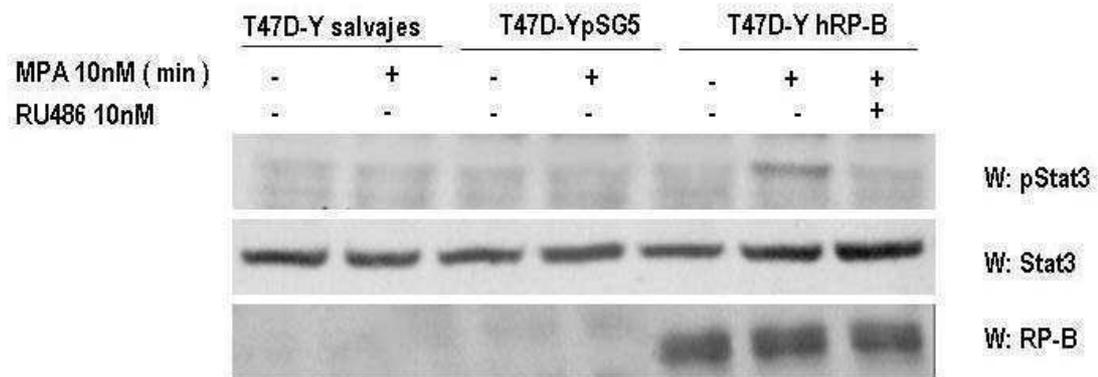
con un pico máximo a los 10 minutos y que permanece en esos niveles hasta los 30 minutos (Puricelli *et al*, 2002). Éste constituyó el control positivo de activación de Stat3 en esta línea celular. El tratamiento con MPA no fue capaz de inducir la fosforilación de Stat3 en las células LM3 salvajes (Figura 8A). Por el contrario, cuando las células LM3 fueron transfectadas de manera transiente con un vector de expresión para la isoforma B del receptor de progesterona humano (hRP-B), el tratamiento con MPA resultó en la fosforilación en tirosina de Stat3, que fue inhibida por RU486 (Figura 8A).



**Figura 8A. El RP clásico es el mediador de la fosforilación de Stat3 inducida por MPA.**

Células LM3 fueron transfectadas con hRP-B, con el vector vacío pSG5 o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego estimuladas con MPA durante 5 min o pretratadas con RU486 antes de la estimulación con MPA. Las células LM3 fueron también tratadas con heregulina (HRG) durante 10 minutos. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con el anticuerpo anti-fosfotirosina 705 Stat3 (panel superior). Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con el anticuerpo anti-Stat3 (panel del medio) y anti-RP (panel inferior). Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

Se usó una estrategia similar con la línea celular humana T47D-Y, derivada de la línea T47D salvaje, pero que no expresa el RP (Sartorius *et al*, 1994). Como se muestra en la figura 8B, el tratamiento con MPA de las células T47D-Y, no indujo la fosforilación en tirosina de Stat3. Sin embargo, cuando estas células fueron transfectadas con el hRP-B, se detectó una alta fosforilación en tirosina de Stat3 en respuesta al MPA (Figura 8B). El RU486 inhibió la fosforilación en tirosina de Stat3 estimulada por MPA (Figura 8B).



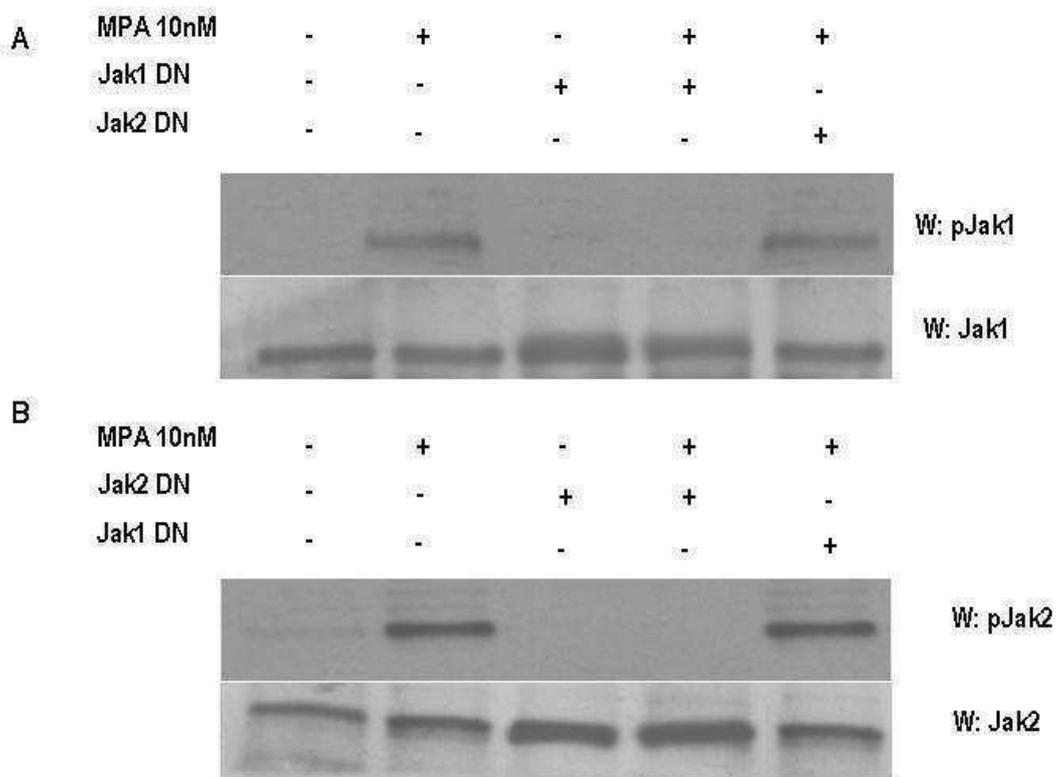
**Figura 8B.** El RP clásico es el mediador del efecto de la fosforilación de Stat3 inducida por MPA.

Células T47D-Y fueron transfectadas con hRP-B, con el vector vacío pSG5 o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego estimuladas con MPA durante 5 min o pretratadas con RU486 antes de la estimulación con MPA. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con el anticuerpo anti-fosfotirosina 705 Stat3 (panel superior). Las membranas fueron luego *stripped* y reveladas con el anticuerpo anti-Stat3 (panel del medio) y anti-RP (panel inferior). Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

Se investigó luego la participación de las Jaks en la inducción de la fosforilación de Stat3 por MPA. Para este propósito, las células C4HD fueron transfectadas de manera transiente con 2 $\mu$ g de un vector de expresión para una forma dominante negativa (DN) de Jak1 o de Jak2 (Olayioye *et al*, 1999;Paukku *et al*, 2000;Bowman *et al*, 2000) y luego tratadas con MPA. La eficiencia de transfección en las células C4HD, evaluada mediante la expresión de una variante de alta intensidad de la proteína fluorescente verde (*Enhanced green fluorescent protein* o *EGFP*) codificada por el vector pEGFP-N1, varió entre un 65% a un 75%, como fue determinado por el porcentaje de células que exhibieron fluorescencia verde 24 horas luego de la transfección. La proteína fluorescente verde fue visualizada por observación de fluorescencia directa usando microscopía láser confocal. La alta eficiencia de transfección en los cultivos celulares en este trabajo, indujo altos niveles de expresión de DN Jaks, mostrados por un aumento en la expresión total de Jak1 y Jak2 en células transfectadas con los vectores de expresión para las formas DN, en comparación con células no transfectadas (Figura 9A y B, respectivamente). Como se muestra en la figura 9, cuando las formas DN Jak1 y DN Jak2 se expresaron en las células C4HD, fueron capaces de inhibir la función de las proteínas Jak1 y Jak2 endógenas. Este resultado se

evidencia por la disminución de la fosforilación en tirosina de las Jaks, inducida por MPA.

Experimentos realizados transfectando células C4HD con cantidades crecientes de vectores de expresión para Jaks DN evidenciaron que la inhibición de la fosforilación en tirosina de las Jaks fue dosis dependiente (resultados no mostrados). La especificidad de la acción de las Jaks DN fue demostrada por la falta de efecto del vector Jak2 DN en la fosforilación de Jak1 endógena inducida por MPA (Figura 9A) y del vector Jak1 DN en la fosforilación de Jak2 endógena, también inducida por MPA (Figura 9B).

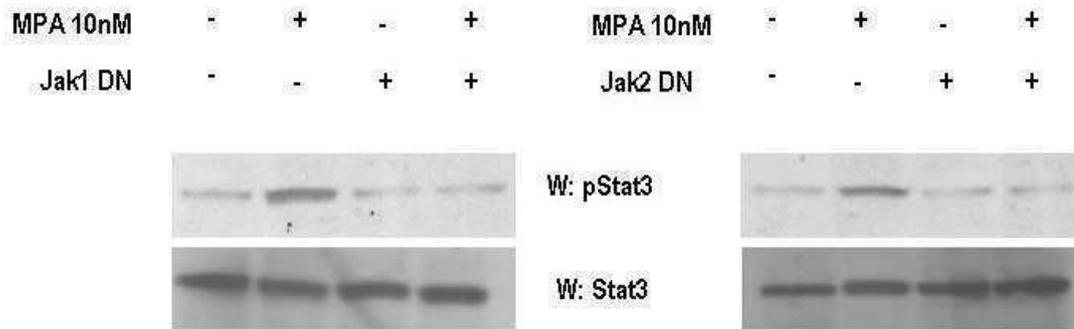


**Figura 9. DN Jak1 y Jak2 son específicos en su función.**

Células C4HD fueron transfectadas transientemente con 2  $\mu$ g de los vectores DN Jak1 (**A**) o DN Jak2 (**B**), y fueron luego tratadas con MPA durante 5 min o permanecieron sin tratar. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con los anticuerpos anti-fosfotirosina Jak1 (**A**, panel superior) o anti-fosfotirosina Jak2 (**B**, panel superior). Las membranas fueron luego *stripped* y reveladas con los anticuerpos anti-Jak1 (**A**, panel inferior) y anti-Jak2 (**B**, panel inferior). Estos resultados fueron repetidos tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

El bloqueo de la actividad de Jak1 y Jak2 resultó en la inhibición de la capacidad del MPA de inducir la fosforilación en tirosina de Stat3 (Figura 10, paneles

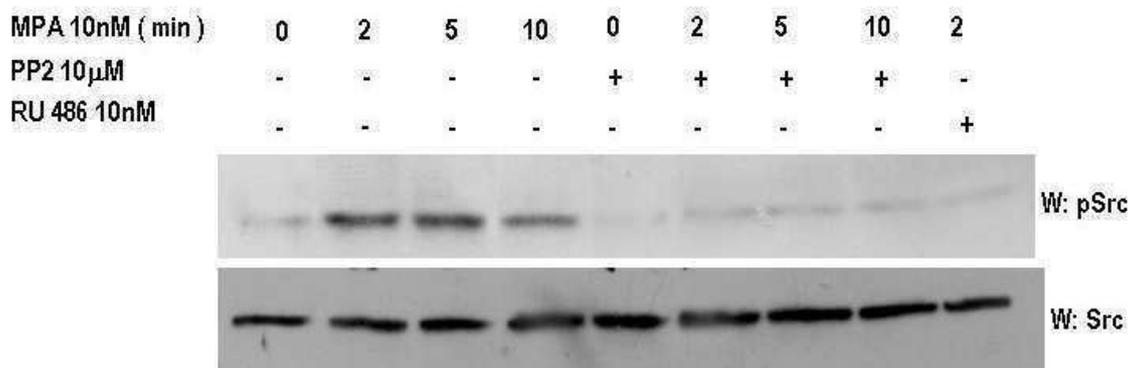
superiores), demostrando claramente que ambas quinasas están involucradas en este efecto.



**Figura 10. Jak1 y Jak2 están involucradas en la fosforilación de Stat3 inducida por MPA.**

Cincuenta  $\mu$ g de proteína de extractos celulares de células transfectadas con los vectores DN Jak1 (panel izquierdo) o DN Jak2 (panel derecho) y subsecuentemente tratadas o no con MPA por 5 min, se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-fosfotirosina Stat3 (panel superior). Las membranas fueron luego *stripped* y reveladas con un anticuerpo anti-Stat3 (paneles inferiores). Estos experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

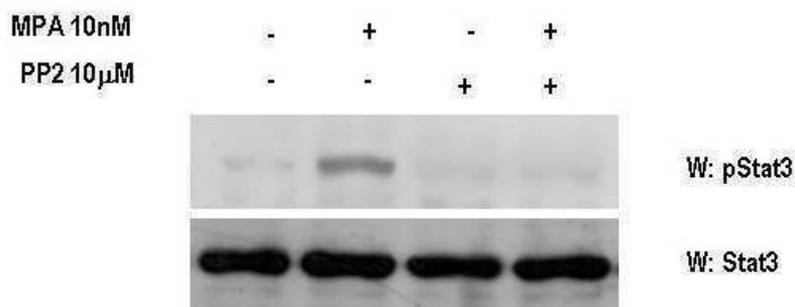
El requerimiento de la activación de la quinasa Src para la activación de Stat3 en células de cáncer de mama ya fue descrito, demostrando su participación esencial en mediar la activación constitutiva de Stat3 en varias líneas de cáncer humano (Bowman *et al*, 2000;Garcia *et al*, 2001;Vultur *et al*, 2004;Yu & Jove, 2004;Zhang *et al*, 2000;Wojcik *et al*, 2006). Resultados de Cao y colaboradores (Cao *et al*, 1996) demostraron que v-Src puede unirse a Stat3 y fosforilarla *in vitro*. Además, hay datos que indican la habilidad de los progestágenos de inducir la fosforilación de c-Src por un mecanismo no genómico en células tumorales mamarias (Boonyaratanakornkit *et al*, 2001;Ballare *et al*, 2003;Castoria *et al*, 1999;Migliaccio *et al*, 1998). Por estas razones, se evaluó el efecto del MPA en la actividad de c-Src en las células C4HD. El tratamiento de las células C4HD con MPA por 2 a 10 minutos indujo una fuerte fosforilación en tirosina de c-Src, la cual fue significativamente inhibida por el inhibidor selectivo de quinasas de la familia Src, PP2 (Figura 11A).



**Figura 11A. El MPA induce la fosforilación de Src en las células C4HD.**

Células C4HD fueron tratadas con MPA durante los tiempos indicados o preincubadas tanto con el inhibidor selectivo de la familia de quinasas de Src, PP2, o con RU486 durante 90 min, y luego tratadas con MPA. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-fosfotirosina 416 c-Src (panel superior). Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con un anticuerpo anti-c-Src (panel inferior). Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

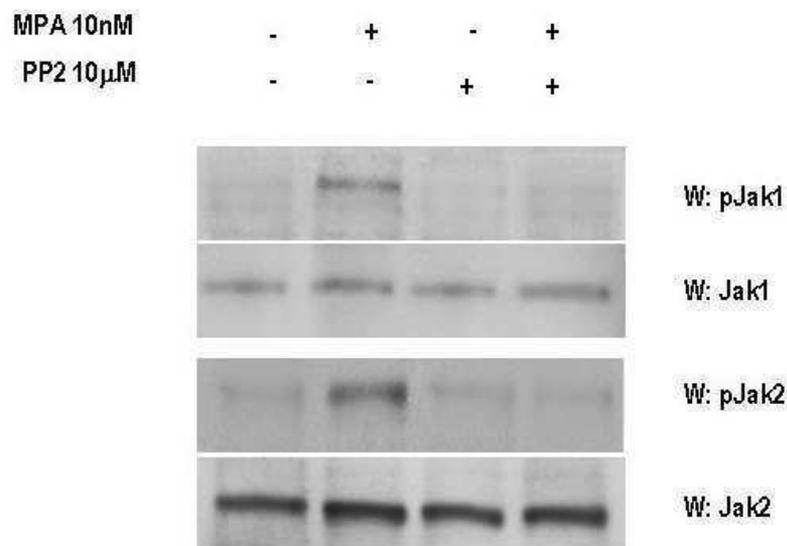
Luego se exploró el rol de c-Src en la fosforilación en tirosina de Stat3 inducida por MPA. Como se muestra en la Figura 11B, la inhibición de la actividad de Src por preincubación de las células con PP2, bloqueó la capacidad del MPA de inducir la fosforilación de Stat3.



**Figura 11B. La quinasa Src está involucrada en la fosforilación de Stat3 inducida por MPA.**

Células C4HD fueron preincubadas el inhibidor selectivo de la familia de quinasas de Src, PP2, durante 90 min y luego tratadas con MPA por 5 min. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con el anticuerpo anti-fosfotirosina Stat3. Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con el anticuerpo anti-Stat3. Estos experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

Los resultados descriptos muestran que ambas quinasas, Jaks y Src son capaces de activar Stat3. A pesar de que resultados de experimentos de co-expresión de Stat3 y v-Src en levaduras indican que v-Src es capaz de fosforilar directamente Stat3, se investigó si Src podría estar también actuando a través de los típicos activadores río arriba de Stat3, las quinasas Jak1 y Jak2. Con el objetivo de estudiar más profundamente el mecanismo molecular a través del cual estas quinasas participan en la fosforilación en tirosina de Stat3, se examinó el estado de fosforilación de Jak1 y Jak2 en células C4HD pretratadas con el inhibidor de Src, PP2. Se encontró que la fosforilación de Jak1 y Jak2 fue efectivamente inhibida por PP2 (Figura 12). Estos resultados indican que las Jaks son fosforiladas por c-Src en las células C4HD.



**Figura 12. Src está involucrada en la fosforilación de Jaks inducida por MPA.**

Células C4HD fueron preincubadas con el inhibidor selectivo de la familia de quinasas de Src, PP2, durante 90 min y luego tratadas con MPA por 5 min. Cincuenta  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con los anticuerpos anti-fosfotirosina Jak1 y anti-fosfotirosina Jak2. Las membranas fueron luego *strippeadas* y reveladas con los anticuerpos anti-Jak1, y anti-Jak2 respectivamente. Estos experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

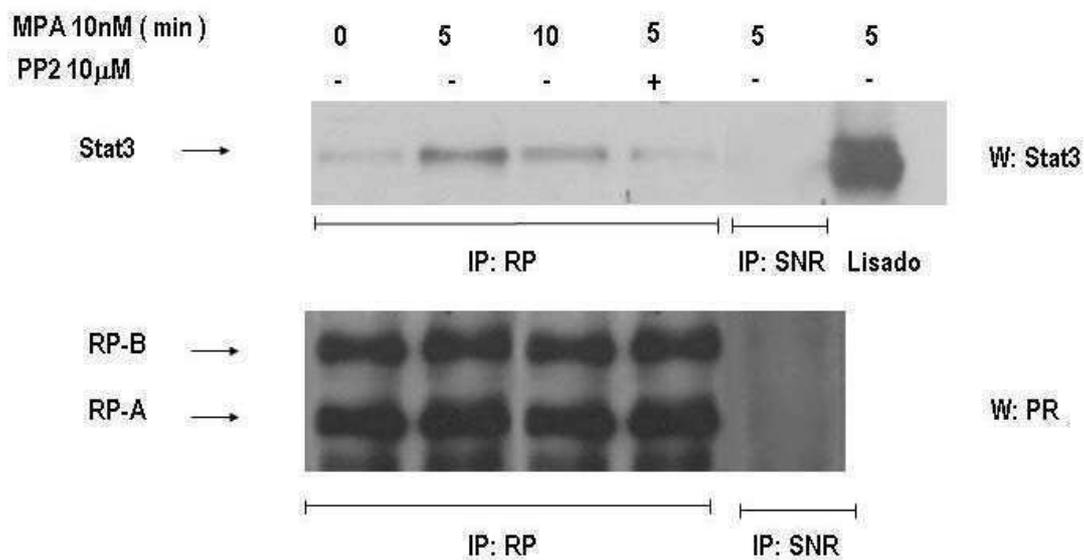
### El MPA induce asociación entre Stat3 y RP

Se ha encontrado asociación física entre Stats y varios miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas, incluyendo al RP (Liu & Ogle, 2002; Richer *et al*, 1998). En este trabajo, se investigó la capacidad del MPA de inducir

asociación entre Stat3 y RP mediante ensayos de coimmunoprecipitación. Extractos proteicos de células C4HD fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-RP y revelados con un anticuerpo anti-Stat3. Como se muestra en la Figura 13A, se detectó asociación entre RP y Stat3 en las células C4HD creciendo en medio SFBch 0,1%, que fue dramáticamente aumentada por el tratamiento con MPA.

También se detectó coimmunoprecipitación entre RP y Stat3 cuando el procedimiento de inmunoprecipitación-revelado fue invertido. Así, cuando los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-Stat3 y se realizó un *Western blot* con un anticuerpo anti-RP, se encontró una clara asociación inducida por MPA entre Stat3 y RP (Figura 13B).

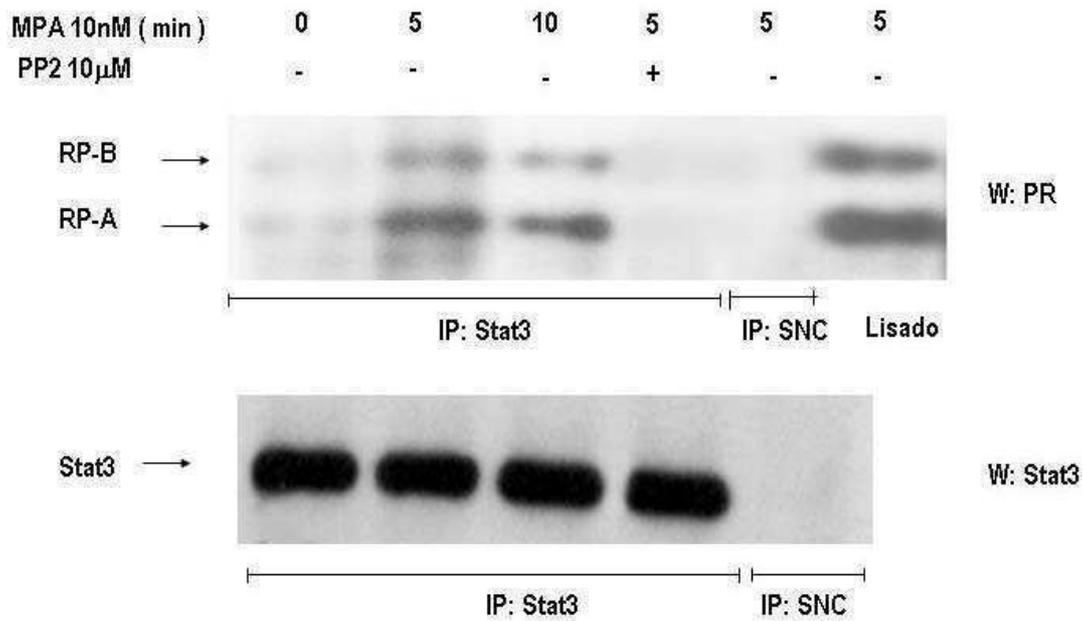
Dados los resultados acerca del requerimiento absoluto de la actividad de Src para la fosforilación en tirosina de Jak (Figura 12) y de Stat3 (Figura 11B), se exploró el rol de Src en la asociación entre RP y Stat3. Como se muestra en la figuras 13A y 13B, la inhibición de la actividad de Src resultó en el bloqueo de la capacidad del MPA de inducir una interacción física entre RP y Stat3.



**Figura 13A. El MPA induce asociación de Stat3 y RP.**

Células C4HD fueron tratadas con MPA 10 nM por los tiempos indicados o preincubadas con PP2 antes del tratamiento de 5 min con MPA. El RP fue inmunoprecipitado a partir de 500 µg de proteína de extractos proteicos. Como control, los lisados fueron inmunoprecipitados con suero normal de ratón (SNR). Los inmunocomplejos fueron sometidos a SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-Stat3 (panel superior). Veinte µg de proteína de los extractos celulares fueron directamente revelados con un

anticuerpo anti-Stat3 (última calle, panel superior). Alícuotas idénticas de cada inmunoprecipitado fueron reveladas con un anticuerpo anti-RP para verificar que las cantidades inmunoprecipitadas de cada proteína fueran iguales (panel inferior). Este es un experimento representativo de un total de tres. W: *Western Blot*. IP: Inmunoprecipitación.

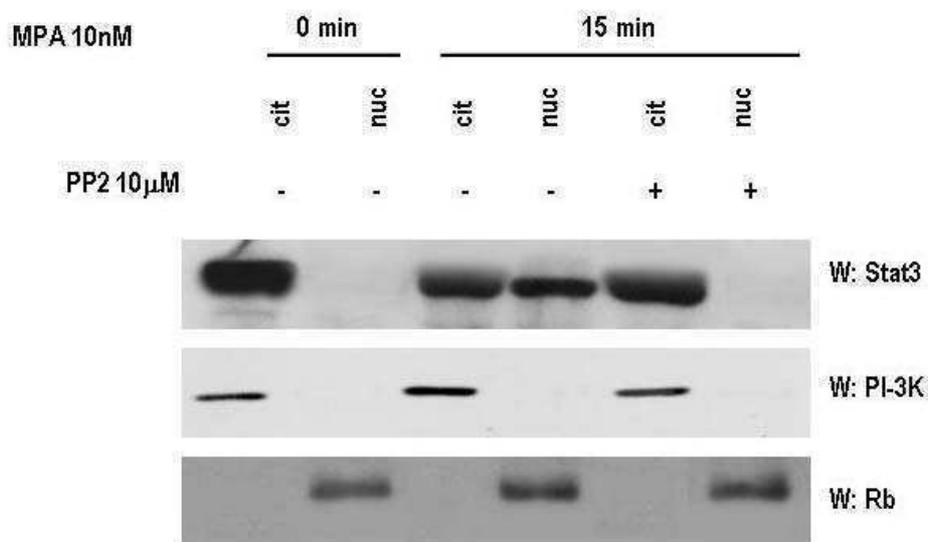


**Figura 13B. El MPA induce asociación de Stat3 y RP.**

Lisados proteicos (500  $\mu$ g) de células C4HD tratadas con MPA 10 nM por los tiempos indicados o preincubadas con PP2 antes del tratamiento de 5 min con MPA fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-Stat3 o con suero normal de conejo (SNC). Los inmunocomplejos fueron sometidos a SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-RP (panel superior). Veinte  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares fueron directamente revelados con un anticuerpo anti-RP (última calle, panel superior). Alícuotas idénticas de cada inmunoprecipitado fueron reveladas con un anticuerpo anti-Stat3 para verificar que las cantidades inmunoprecipitadas de cada proteína fueran iguales (panel inferior) Este es un experimento representativo de un total de tres. W: *Western blot*. IP: Inmunoprecipitación.

### El MPA induce la translocación nuclear de Stat3

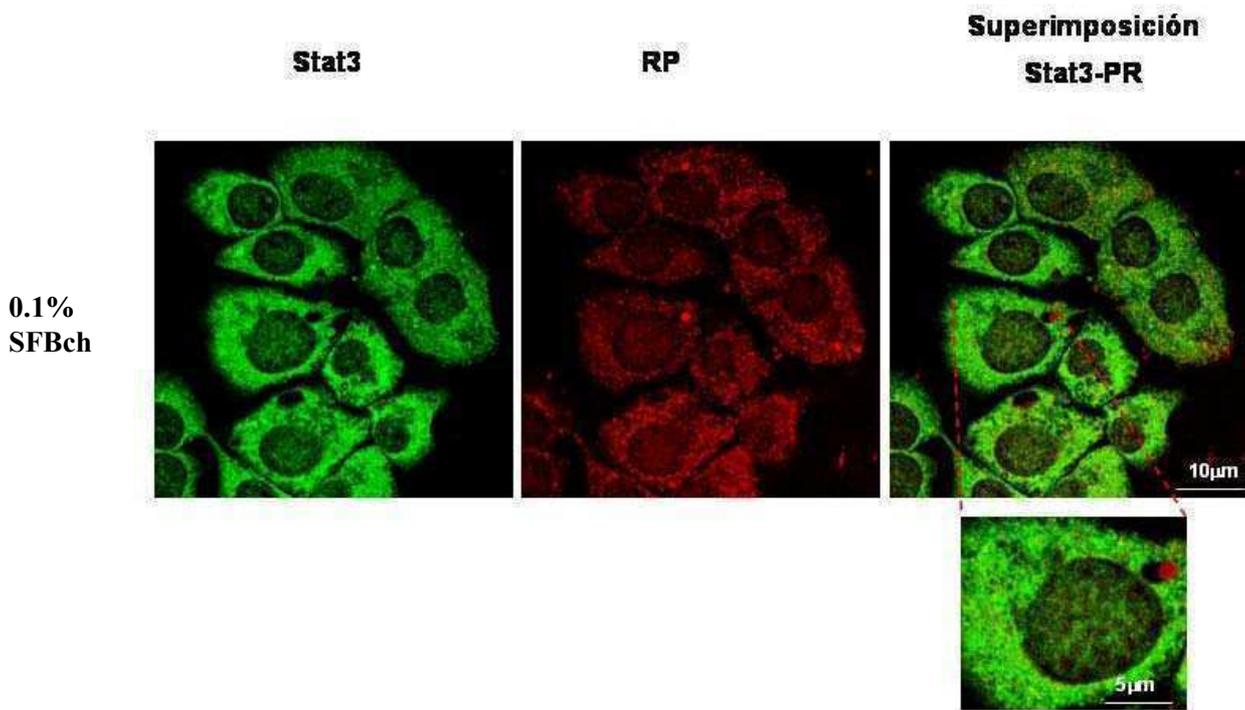
Dado que la fosforilación en tirosina de Stat3 es un prerequisite para su translocación nuclear, investigamos si el MPA podría afectar la localización subcelular de Stat3. Se prepararon extractos citosólicos y nucleares de células C4HD y se realizó un *Western blot* con un anticuerpo anti-Stat3. Mientras que Stat3 fue detectado únicamente en las fracciones citoplasmáticas en células no tratadas creciendo en medio suplementado con SFB charcolizado, el tratamiento con MPA indujo una marcada translocación nuclear de Stat3 (Figura 14, panel superior). Además, se encontró que la inhibición de la actividad de Src con PP2, bloqueó la translocación nuclear de Stat3 inducida por MPA (Figura 14, panel superior). La eficiencia del fraccionamiento celular fue controlada revelando con un anticuerpo anti-subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI-3K), quinasa de ubicación citosólica (Figura 14, panel del medio) y con un anticuerpo anti-retinoblastoma (Rb), fosfoproteína nuclear (Figura 14, panel inferior).

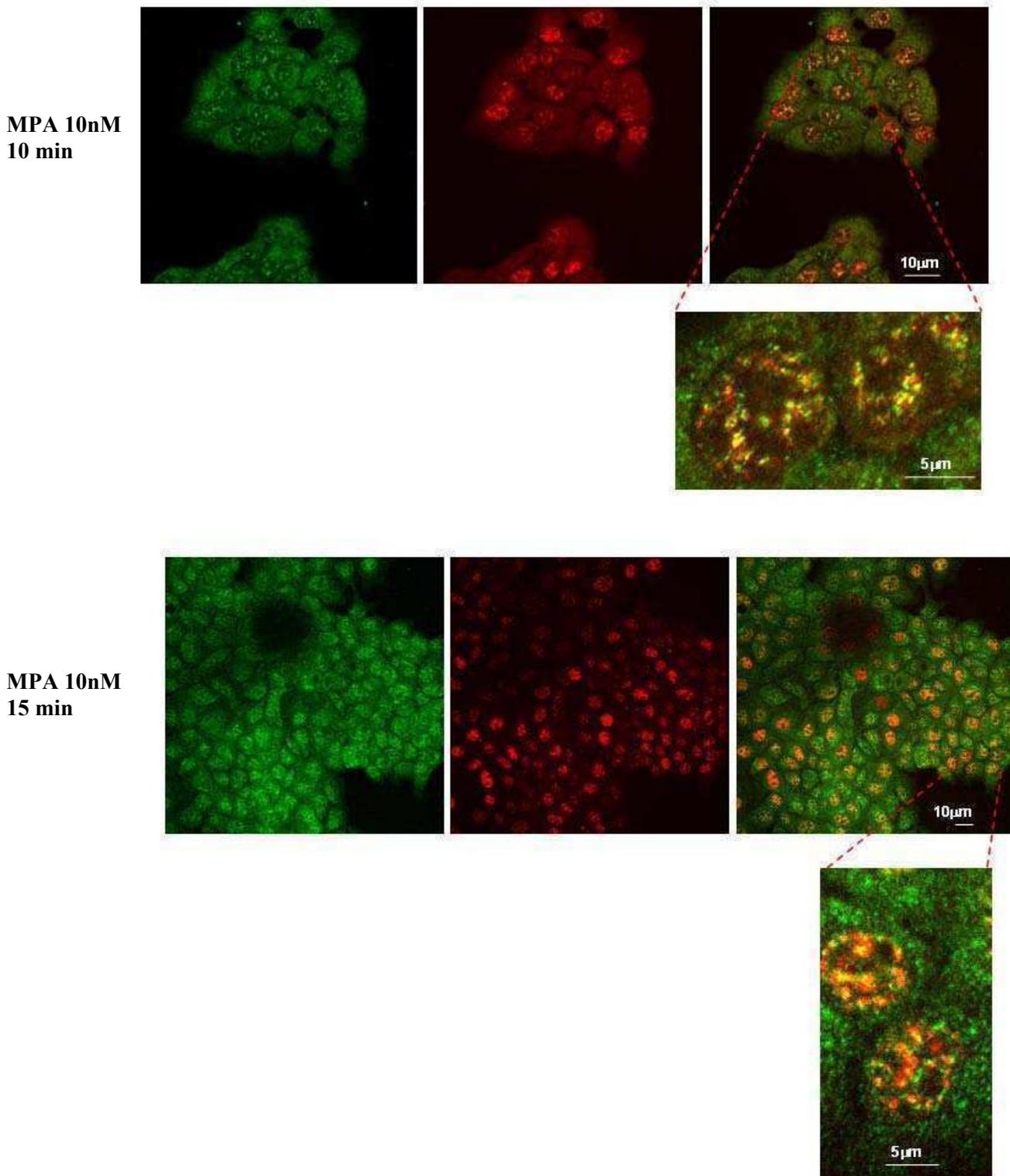


**Figura 14. El MPA induce la translocación nuclear de Stat3.**

Células C4HD fueron tratadas con 10 nM MPA durante los tiempos indicados o fueron pretatadas con PP2 antes de la estimulación con MPA. Se prepararon fracciones citosólicas y nucleares y se analizaron treinta  $\mu$ g proteína de los extractos celulares por *Western blot* para evaluar la expresión de Stat3. Las membranas fueron luego *stripped* y reveladas con un anticuerpo anti-subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI-3K) (panel del medio) y anti retinoblastoma (Rb) (panel inferior) para controlar la eficiencia del fraccionamiento celular. W: *Western blot*.

Mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal, se obtuvo respaldo adicional de la existencia de una asociación entre Stat3 y RP en células intactas. Células C4HD fueron cultivadas en ausencia o presencia de MPA 10nM durante 10 o 15 minutos. El análisis de las células marcadas mostró que, en ausencia de MPA, tanto RP como Stat3 están localizados difusamente en el citoplasma sin signos aparentes de colocalización (Figura 15, panel superior). Sin embargo, a los 10 minutos de tratamiento con MPA, al determinarse la localización relativa de Stat3 y RP superponiendo las dos imágenes (Figura 15, fotos de la izquierda con fotos centrales) se observa que el MPA induce una colocalización específica e inducible en el núcleo resultando en una señal de fluorescencia amarilla (Figura 15, fotos de la derecha). Como se aprecia entonces, hay una significativa colocalización entre RP y Stat3 inducida por MPA y detectada tanto mediante ensayos de coimmunoprecipitación como de microscopía confocal.





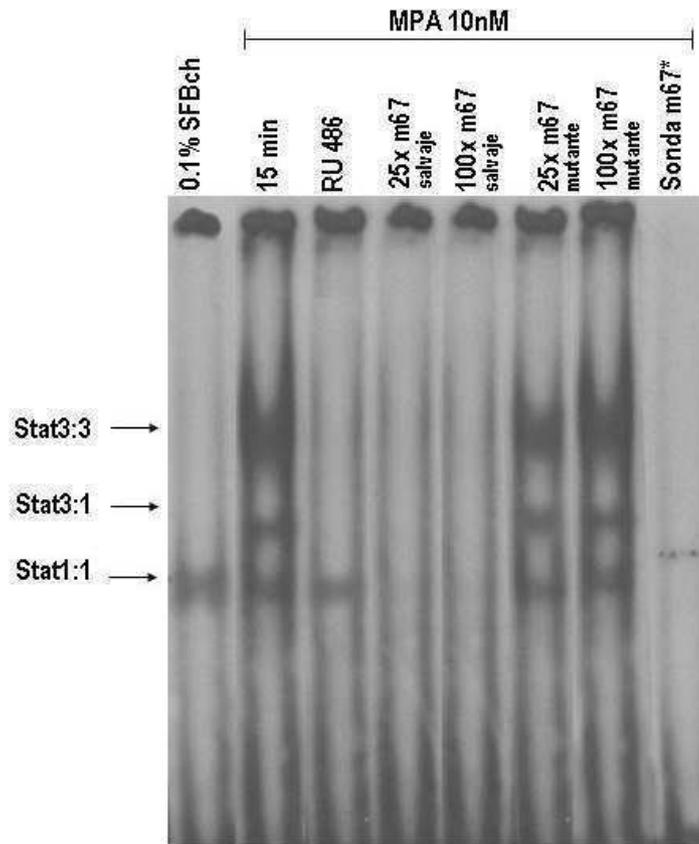
**Figura 15. Localización de Stat3 y RP por inmunofluorescencia y microscopía confocal.**

Células C4HD fueron incubadas en medio suplementado con SFB charcolizado, en ausencia o presencia de MPA durante 10 y 15 min a 37°C. Stat3 fue identificado usando un anticuerpo policlonal anti-Stat3 seguido de incubación con un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa 488. El RP fue localizado con un anticuerpo anti-ratón seguido de incubación con un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con Rodamina. Las mismas células se muestran en cada fila y las imágenes en el panel derecho

están formadas por superposición de las imágenes de los otros dos paneles en la misma fila. El MPA induce colocalización de Stat3 y RP evidenciada por el color amarillo (colocalización de las tinciones roja y verde) en el núcleo celular. Experimentos controles demostraron que no hay reactividad cruzada entre el segundo anticuerpo anti-ratón y el primer anticuerpo anti-conejo ni a la inversa. Tampoco hubo marca detectable con los segundos anticuerpos solos. Estas imágenes son representativas de tres experimentos. Barras de escala, 5µm y 10 µm.

### **El MPA induce la unión al ADN de Stat3**

La función de las proteínas Stats depende de su habilidad de unión al ADN, para la cual son prerequisites la fosforilación en tirosina y la dimerización. En el núcleo, asociadas al ADN, y formando complejos con otras proteínas, regulan la transcripción génica. Investigamos la capacidad del MPA de inducir la unión de Stat3 al ADN, usando como sonda marcada una mutante de alta afinidad del elemento inducible en *sis* [*sis-inducible element* (SIE)] del promotor humano del gen *c-fos* (m67), que une Stat3 y Stat1 (Bromberg *et al*, 1999b; Zhang *et al*, 1999b). El m67 presenta mayor actividad de unión de Stat3 que otros elementos en el ADN, debido a la eliminación, en esta secuencia, de sitios de unión inespecífica de otras proteínas con respecto a la secuencia salvaje (Wagner *et al*, 1990). Ensayos de corrimiento de la movilidad electroforética (EMSA) usando extractos nucleares de células C4HD tratadas con MPA durante 15 minutos, demostraron que el MPA fue capaz de promover la formación de complejos de unión al ADN (Figura 16A). Como fue demostrado en numerosos estudios (Bromberg *et al*, 1999b; Zhang *et al*, 1999b), se encontraron tres complejos mayoritarios en las células C4HD, los cuales corresponden a homodímeros de Stat3, heterodímeros de Stat3-Stat1 y homodímeros de Stat1 (Figura 16A). La especificidad de los complejos Stats-ADN fue demostrada por competencia con un exceso de oligonucleótido m67 frío salvaje y, por una falta de competencia con la sonda m67 mutada (Figura 16A). Se observó unión de Stat1 al ADN en células creciendo en medio suplementado con SFB charcoalizado, pero no se registró aumento en los niveles de complejos de Stat1-ADN luego del tratamiento con MPA (Figura 16A), de acuerdo con lo encontrado respecto a la fosforilación en tirosina de Stat1, que permanece invariable por el tratamiento con MPA (Figura 6A). Por el contrario, el MPA fue un potente inductor de la formación de complejos Stat3-ADN, efecto que fue completamente bloqueado por preincubación con RU486 (Figura 16A).



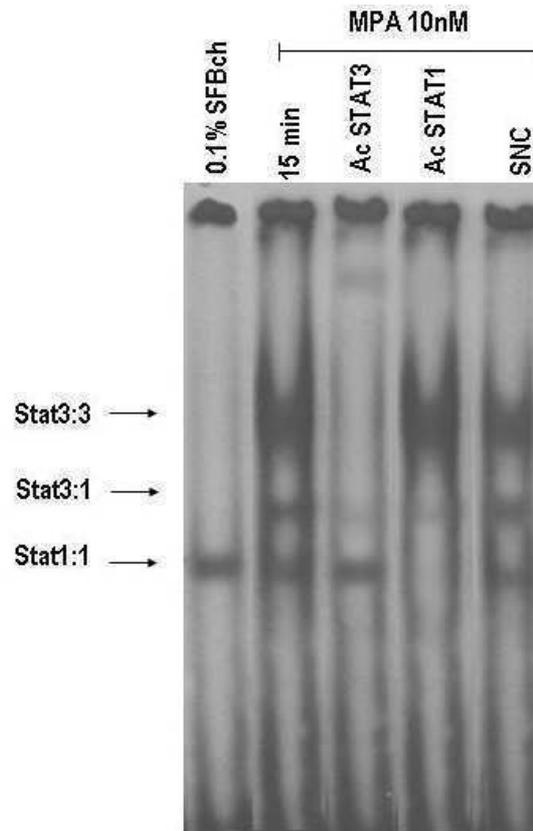
**Figura 16A.** El MPA induce la unión de Stat3 a su elemento respondedor en un mutante de alta afinidad del elemento inducible en *sis* del promotor humano del gen de *c-fos* (m67).

Células C4HD fueron tratadas durante 15 min a 37°C con MPA, MPA+RU486, o se dejaron creciendo en medio suplementado con SFBch. Veinte µg de proteína de extractos nucleares fueron incubados durante 20 min a temperatura ambiente con 1ng de un oligo doble cadena marcado con [<sup>32</sup>P] que contiene al mutante de alta afinidad del elemento inducible en *sis* del promotor humano del gen *c-fos* (5'GTGCATTTCCCGTAAATCTTGTCTACA3') (m67) usado como sonda y analizado por ensayo de corrimiento de movilidad electroforética. La especificidad de los complejos Stat3-ADN se prueba por competencia con un exceso en masa de 25 y 100 veces del oligonucleótido m67, y por la falta de competencia con un exceso de 25 y 100 veces del mutante de m67. Este experimento fue repetido seis veces con resultados similares.

Para confirmar la identidad de los complejos de unión al ADN, se incluyeron anticuerpos anti-Stat1 o anti-Stat3 en la mezcla de reacción para el ensayo de EMSA (Figura 16B). La inclusión de un anticuerpo anti-Stat3 (clon C-20) en la reacción de EMSA, resultó en la total inhibición del efecto del MPA en la formación del complejo homodímero Stat3-ADN y disminuyó dramáticamente la abundancia del heterodímero Stat3-Stat1 (Figura 16B). Este anticuerpo también indujo la formación de un complejo

con movilidad reducida o *supershift*. El anticuerpo anti-Stat1 (clon E-23) reconoce un epítopo ubicado en el dominio SH2, en el extremo carboxilo terminal, presente en Stat1 $\alpha$  y en Stat1 $\beta$ . La inclusión de este anticuerpo en la mezcla de reacción del EMSA, eliminó la formación de complejos de homodímeros de Stat1-ADN (Figura 16B) e indujo una disminución significativa en la abundancia de los complejos de heterodímeros Stat3-Stat1-ADN (Figura 16B). Como ha sido reportado anteriormente para este anticuerpo, no se detectó *supershift* (Schulze *et al*, 2000; Schaefer *et al*, 2000). Una masa equivalente de suero normal de conejo, usado como control, no produjo ningún efecto (Figura 16B, SNC).

Estos resultados muestran claramente la presencia de Stat3 en los complejos proteína-ADN inducidos por MPA. Encontramos resultados similares en los ensayos de EMSA usando como sonda un oligonucleótido que contiene al elemento GAS en el promotor del gen de la  $\alpha$ 2-macroglobulina (Zhang *et al*, 1999b; Sherman & Brasier, 2001), que une Stat3 y Stat1, como fue previamente reportado en las células HEPG2 (Sherman & Brasier, 2001).



**Figura 16B.** El MPA induce la unión de Stat3 a un mutante de alta afinidad del elemento inducible en *sis* del promotor humano del gen de *c-fos* (m67). Identidad de las Stats unidas al ADN

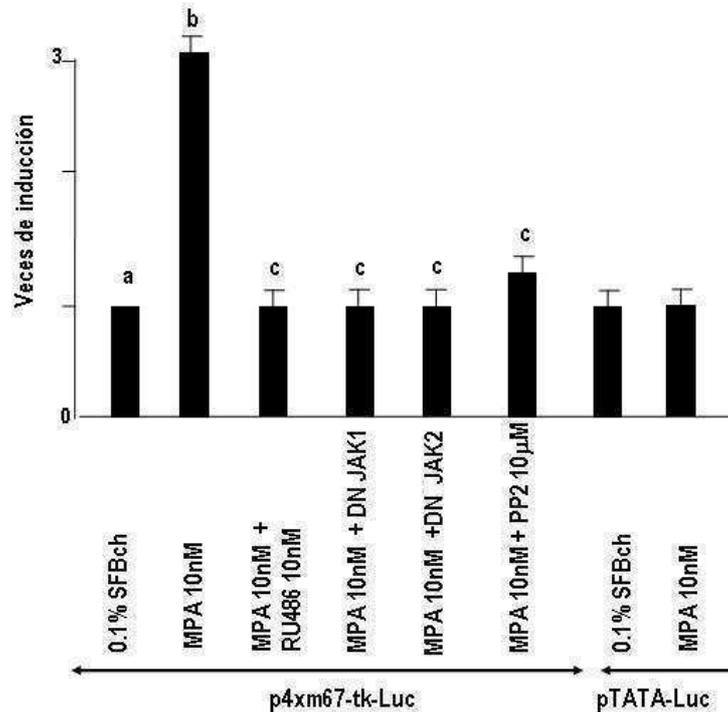
Células C4HD fueron tratadas como se indica en la leyenda de la figura 16A. Se realizó un análisis de *supershift* incluyendo los anticuerpos anti-Stat3 o anti-Stat1. Una cantidad equivalente de suero normal de conejo (SNC) fue usada como control en la reacción de EMSA. Este experimento fue repetido seis veces con resultados similares.

### **El MPA induce la activación transcripcional de Stat3 a través de una vía dependiente de Jak1, Jak2 y Src.**

Para investigar la capacidad del MPA de inducir la activación transcripcional de Stat3, las células C4HD fueron transfectadas de manera transiente con un vector reportero conteniendo cuatro copias de la secuencia de alta afinidad m67 clonada río arriba del gen de la luciferasa (Zhang *et al*, 1999a; Bromberg *et al*, 1999d) y un vector de expresión de  $\beta$ -galactosidasa, utilizada como control interno. El tratamiento de las células C4HD con MPA indujo la activación transcripcional de Stat3, la cual fue completamente inhibida en presencia de RU486 (Figura 17).

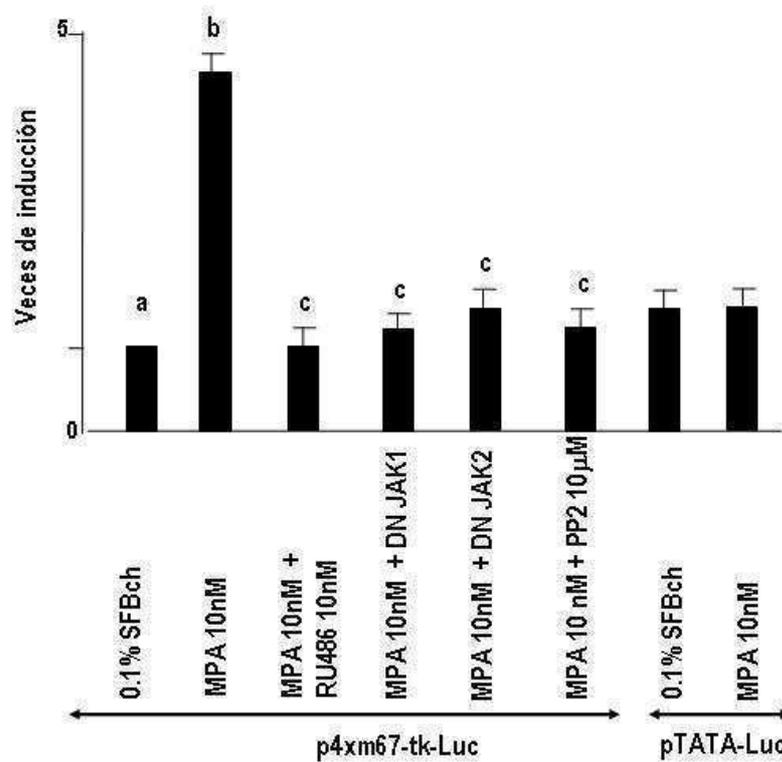
Se investigaron los roles de las Jaks y de Src en la activación de Stat3 inducida por MPA en las células C4HD. El bloqueo de las actividades de Jak1 y Jak2 mediante el

uso de vectores de expresión para las formas DN de Jak1 y Jak2 y de la actividad de Src por PP2, también inhibió la capacidad del MPA de inducir la actividad luciferasa del plásmido reportero (Figura 17). Resultados similares fueron obtenidos, tanto en las células C4HD como en las T47D (Figura 18), y también cuando se usó un plásmido reportero conteniendo tres copias del sitio de unión de Stat1 y Stat3, Ly6E (Bromberg *et al*, 1998b) en los ensayos de transfección (datos no mostrados).



**Figura 17. El MPA induce la activación transcripcional de Stat3 en las células C4HD.**

Células C4HD fueron transfectadas transientemente con 2µg/hoyo de un plásmido reportero que contiene cuatro copias del sitio de alta afinidad de Stat3, m67 y con 1 µg/hoyo de un vector de expresión CMV-βgal como control interno. En las calles indicadas, las células fueron cotransfectadas con los vectores de expresión para DN Jak1 y DN Jak2, o pretratadas con PP2. Las células fueron también transfectadas con un vector reportero pTATA-Luc que carece de la inserción m67. La cantidad total de ADN usado para transfectar fue igualada por agregado de vector vacío. Luego de la transfección, las células fueron tratadas con MPA o MPA+RU486 a 37°C durante 48 h, o se las dejó creciendo en medio suplementado con SFBch y fueron luego levantadas y lisadas. Las actividades de luciferasa y β-galactosidasa fueron medidas como se describe en “Materiales y Métodos”. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa/actividad de β-galactosidasa respecto a las células creciendo en medio suplementado con SFBch. Los datos presentados representan la media de seis experimentos independientes ± ES. b vs. a; c vs. b: p<0.001.



**Figura 18.** El MPA induce la activación transcripcional de Stat3 en las células T47D.

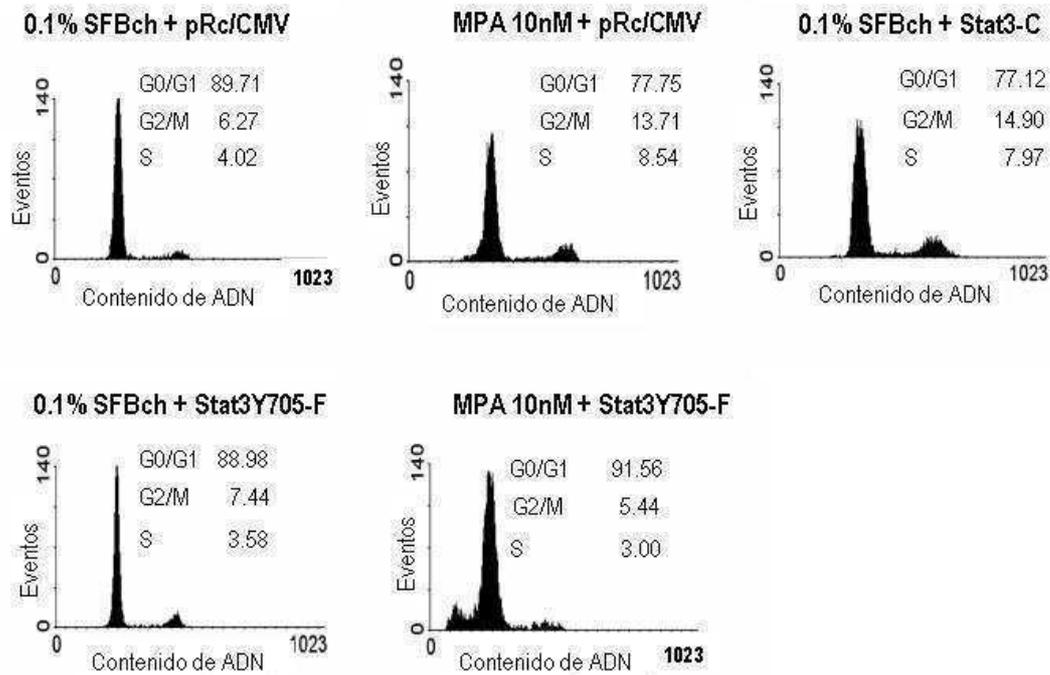
Células T47D fueron transfectadas transientemente con  $2\mu\text{g}/\text{hoyo}$  de un plásmido reportero que contiene cuatro copias del sitio de alta afinidad m67 y con  $1\mu\text{g}/\text{hoyo}$  de un vector de expresión CMV- $\beta\text{gal}$  como control interno. En las calles indicadas, las células fueron cotransfectadas con los vectores de expresión para DN Jak1 y DN Jak2, o pretratadas con PP2. Las células fueron también transfectadas con un vector reportero pTATA-Luc que carece de la inserción m67. La cantidad total de ADN usado para transfectar fue igualada por agregado de vector vacío. Luego de la transfección, las células fueron tratadas con MPA o MPA+RU486 a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 h, o se las dejó creciendo en medio suplementado con SFBch. Las células fueron luego levantadas y lisadas. Las actividades de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa fueron medidas como se describe en “Materiales y Métodos”. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa/actividad de  $\beta$ -galactosidasa respecto a las células creciendo en medio suplementado con SFBch. Los datos presentados representan la media de seis experimentos independientes  $\pm$  ES. b vs. a; c vs. b:  $p < 0.001$ .

### **La actividad de Stat3 es un requisito en la proliferación inducida por MPA, de células C4HD.**

Se ha probado que existe una correlación entre la activación de Stat3 y la proliferación celular, observada en varios contextos celulares (Matsuda *et al*,

1999;Turkson *et al*, 1998;Ram *et al*, 2000). La señalización de Stat3 inhibe la apoptosis e induce la proliferación celular a través de la regulación de genes involucrados en el crecimiento celular, entre ellos Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, c-Myc y ciclina D1 (Bowman *et al*, 2001;Bromberg *et al*, 1999b;Catlett-Falcone *et al*, 1999b;Epling-Burnette *et al*, 2001;Grandis *et al*, 2000;Sinibaldi *et al*, 2000). Se decidió investigar entonces, la relación entre la activación de Stat3 inducida por MPA y el crecimiento celular. Para tal fin, las células C4HD fueron transfectadas transientemente con un vector de expresión para una forma dominante negativa de Stat3, Stat3Y705-F (Bromberg *et al*, 1998a;Kaptein *et al*, 1996;Li & Shaw, 2002). Esta proteína mutante posee una sustitución de fenilalanina por tirosina en el codón 705, lo cual bloquea la fosforilación en tirosina de la proteína Stat3 endógena, inhibiendo así la dimerización y la unión de Stat3 al ADN. Las células C4HD fueron también transfectadas con una mutante constitutivamente activa de Stat3, Stat3-C, la cual, debido a que contiene dos sustituciones de cisteína, dimeriza espontáneamente, se une al ADN y activa la transcripción (Bromberg *et al*, 1999a). La proliferación de las células C4HD transfectadas fue evaluada por tinción con yoduro de propidio (IP) y análisis de distribución del ciclo celular por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 19, la expresión de la mutante Stat3Y705-F tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento inducido por MPA de las células C4HD en comparación con células C4HD tratadas con MPA y transfectadas con un vector vacío (Figura 19, histogramas del medio).

Por el otro lado, la transfección con el vector Stat3-C (Figura 19, histograma de la derecha), resultó en proliferación independiente de MPA y los porcentajes de células en fases S y G2/M fueron comparables a los de las células tratadas con MPA transfectadas con el vector vacío (Figura 19, panel superior, histograma del medio). Sugestivamente, los perfiles de la tinción con IP mostraron un pico subdiploide en las células C4HD transfectadas con el vector mutante Stat3Y705-F (Figura 19, panel inferior) en comparación con las células C4HD transfectadas con un vector vacío, indicando un mayor porcentaje de células apoptóticas. Para explorar más esta observación, se investigó la apoptosis a través de la unión de Annexina V a la superficie celular, un indicador temprano de la muerte celular programada. Las células apoptóticas son positivas para annexina V en su fase temprana debido a la pérdida de asimetría en sus fosfolípidos de membrana.

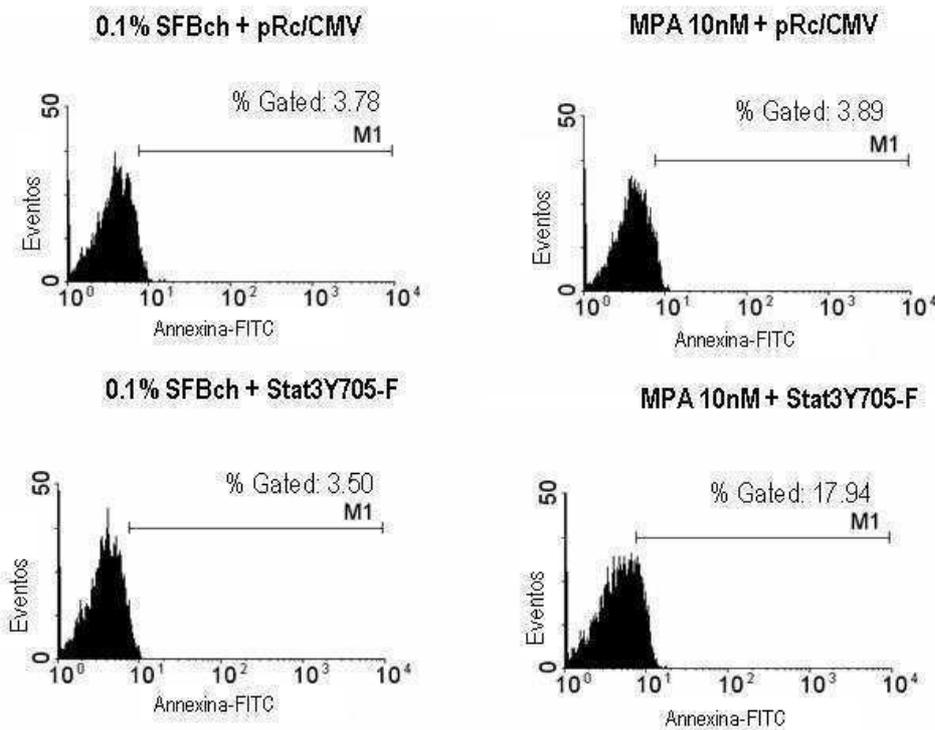


**Figura 19. Stat3 está involucrada en la proliferación inducida por MPA en las células C4HD.**

A. Células C4HD fueron transfectadas transientemente con 2 $\mu$ g de vector de expresión DN Stat3, Stat3Y705-F, con 2 $\mu$ g del mutante constitutivamente activo de Stat3, Stat3-C, o con 2 $\mu$ g del vector vacío pRc/CMV como control, durante 48h. Las células fueron tratadas con MPA por otras 48 h, o permanecieron sin tratar. Luego fueron teñidas con IP y se analizó su distribución en el ciclo celular por citometría de flujo. Están indicados los porcentajes de células totales en las fases del ciclo celular. Los experimentos descriptos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

Como se muestra en la figura 20, el nivel de apoptosis de las células transfectadas con Stat3Y705-F aumentó significativamente (histograma inferior derecho), en comparación con células transfectadas con un vector vacío (histograma superior derecho).

En conclusión, estos resultados indican que la inhibición del crecimiento de las células C4HD mediada por Stat3Y705-F involucra tanto arresto del ciclo celular como apoptosis.

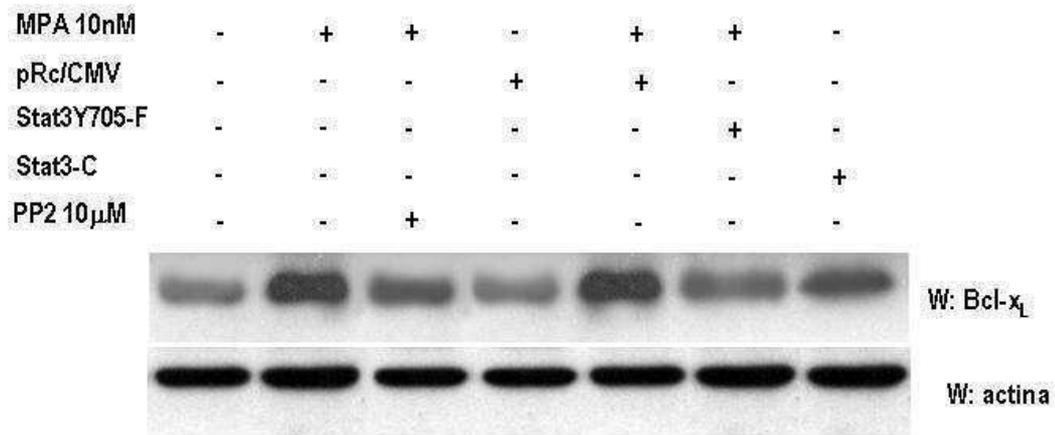


**Figura 20. El bloqueo de Stat3 induce apoptosis en las células C4HD.**

Células C4HD fueron transfectadas transientemente con 2  $\mu$ g del vector de expresión DN Stat3 o con 2  $\mu$ g del vector vacío pRc/CMV como control, durante 48 h. Las células fueron tratadas con MPA por otras 48 h, o permanecieron sin tratar. Se determinó la unión de Annexina V-FITC a la superficie celular por citometría de flujo. Los experimentos descriptos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

Reportes previos (Catlett-Falcone *et al*, 1999a; Bromberg *et al*, 1999c; Socolovsky *et al*, 1999) han referido a miembros del grupo de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 como proteínas cuyos genes están regulados por Stat3. Varios de estos genes han sido implicados en la progresión o en el pronóstico del cáncer de mama. Aquí, se investigó la expresión de la proteína Bcl-x<sub>L</sub> en células C4HD transfectadas con los plásmidos Stat3Y705-F o con Stat3-C. El tratamiento con MPA de las células C4HD resultó en el aumento de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> (Figura 21), de acuerdo con resultados previos que demuestran la inducción de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> por progesterona en células de cáncer de mama (Moore *et al*, 2000). Como se muestra en la figura 21, la transfección con Stat3Y705-F resultó en una inhibición significativa del aumento de expresión de Bcl-x<sub>L</sub> inducido por MPA.

La inhibición de la actividad de Src por preincubación de las células con PP2 también indujo una disminución en el aumento de Bcl-x<sub>L</sub> inducido por MPA (Figura 21). Por el otro lado, la forma constitutivamente activa Stat3-C indujo un aumento en los niveles proteicos de Bcl-x<sub>L</sub>, comparable al efecto ejercido por MPA (Figura 21).



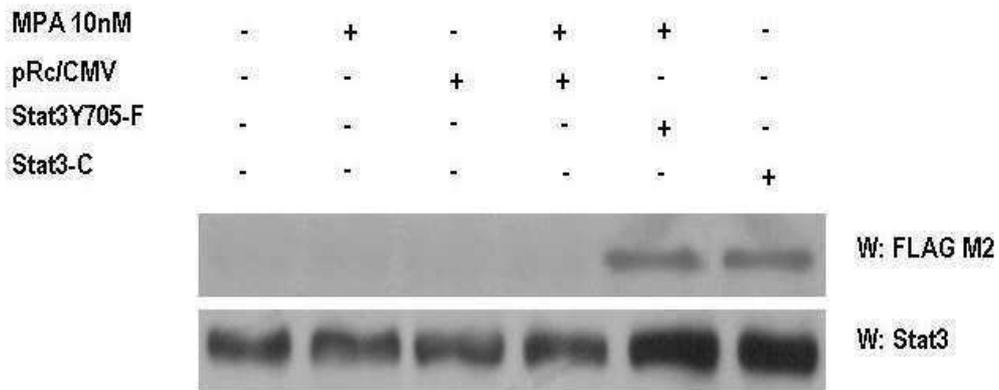
**Figura 21. El bloqueo de Stat3 inhibe el aumento de Bcl-x<sub>L</sub> inducido por MPA.**

Cincuenta μg de proteína de lisados de células transfectadas con Stat3Y705-F, Stat3-C, y con el plásmido pRc/CMV, y de células no transfectadas, tratadas y no tratadas con MPA durante 48 h, se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron con el anticuerpo anti-Bcl-x<sub>L</sub> (panel superior). La membrana fue luego *stripped* y revelada con un anticuerpo anti-actina (panel inferior). Los experimentos descriptos fueron repetidos tres veces con resultados similares. W: *Western blot*.

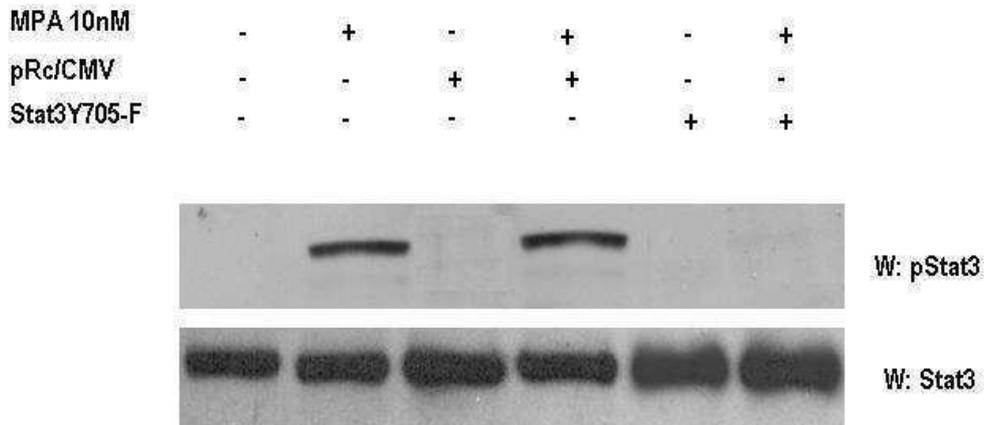
Se evaluaron la expresión y la función de los vectores de expresión para las formas Stat3Y705-F y Stat3-C bajo las condiciones descriptas arriba, en donde modulan el crecimiento celular de las células C4HD. Se estudió primero la expresión de los vectores Stat3Y705-F y Stat3-C en las células C4HD transfectadas mediante un ensayo de *Western blot* con un anticuerpo anti-FLAG M2, ya que ambos vectores poseen el epítopo FLAG en el extremo carboxilo terminal (Figura 22A). En la figura 22B se muestra que cuando la forma mutante Stat3Y705-F se expresa en las células C4HD es capaz de funcionar de manera dominante negativa con respecto a la fosforilación en tirosina de Stat3 inducida por MPA. La especificidad de acción de Stat3Y705-F fue demostrada por su falta de efecto en la fosforilación constitutiva en el residuo tirosina 701 de Stat1 (Figura 22C). Además, la capacidad del MPA de inducir la activación transcripcional de Stat3 endógena fue completamente inhibida por la expresión de Stat3Y705-F, como se muestra en el ensayo de transfección transiente con el plásmido

reportero m67-Luc (Figura 22D). Por el contrario, la expresión de Stat3-C resulta en la transcripción activa del gen reportero en células no tratadas con MPA (Figura 22D). De la misma manera que con la transfección con las formas dominantes negativas de Jaks, los experimentos realizados transfectando células C4HD con cantidades crecientes de Stat3Y705-F, mostraron que la inhibición de la capacidad del MPA de inducir la fosforilación en tirosina de Stat3 y de inducir la activación transcripcional de Stat3 endógena, fue dosis dependiente (resultados no mostrados).

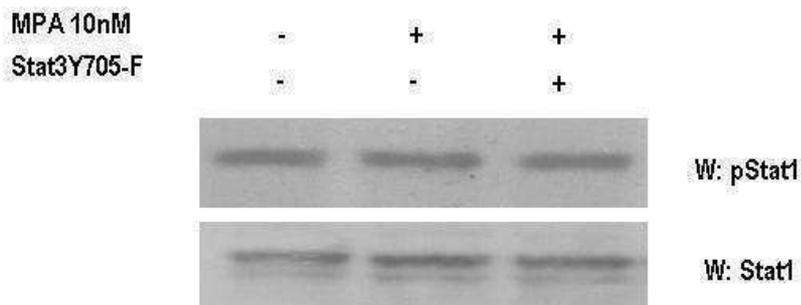
**A**

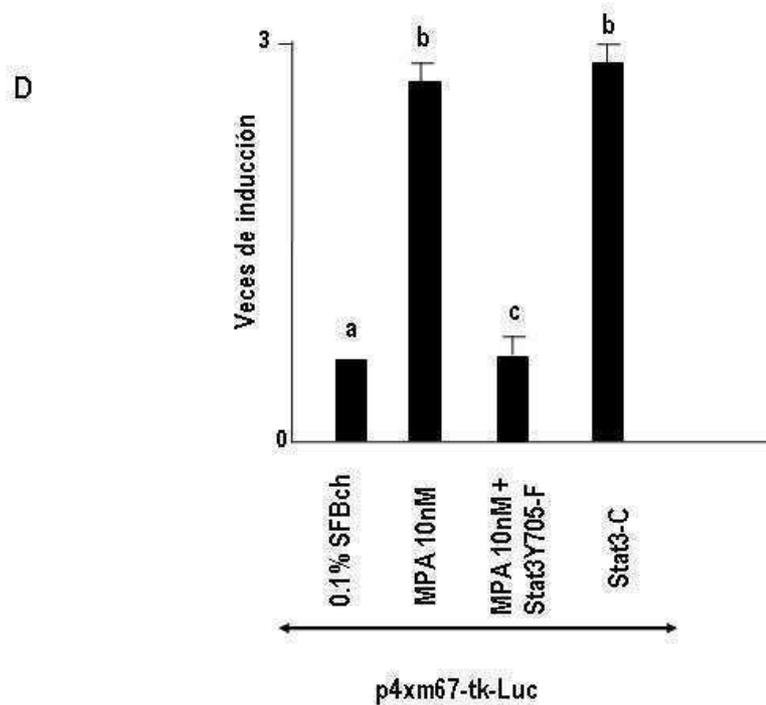


**B**



**C**





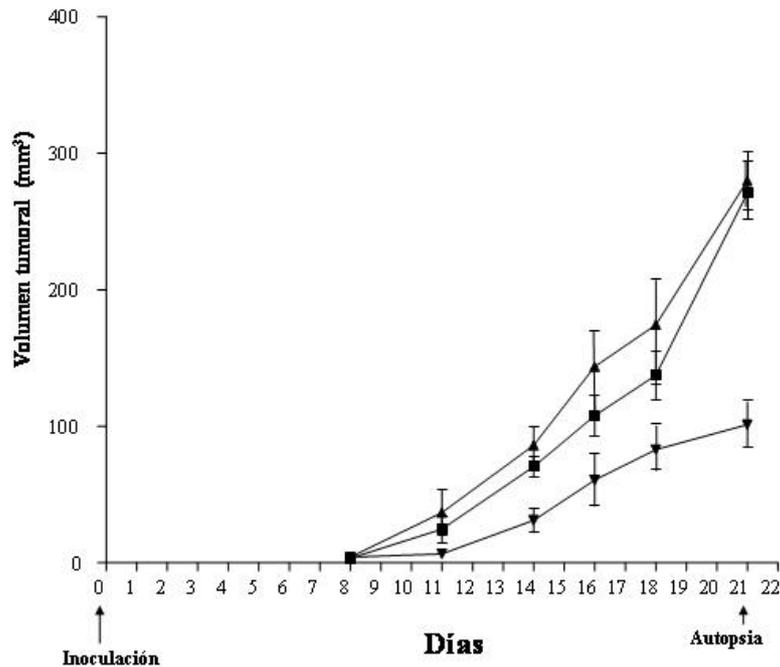
**Figura 22. Expresión y función de las formas mutantes de Stat3, Stat3Y705-F y Stat3-C.**

Cincuenta  $\mu\text{g}$  proteína de los lisados de células transfectadas con Stat3Y705-F, Stat3-C y con el plásmido pRc/CMV, y de células no transfectadas, que habían sido estimuladas o no con MPA durante 5 min, fueron sometidos a SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-FLAG M2 (panel superior). La membrana fue luego *strippeada* y revelada con un anticuerpo anti-Stat3 (panel inferior). **B.** Cincuenta  $\mu\text{g}$  proteína de células C4HD transfectadas con 2  $\mu\text{g}$  del vector Stat3Y705-F, o con el vector vacío pRc/CMV y subsecuentemente tratadas o no con MPA por 5 min, fueron sometidas a SDS-PAGE y reveladas con un anticuerpo anti-fosfotirosina Stat3 (panel superior). La membrana fue luego *strippeada* y revelada con un anticuerpo anti-Stat3 (panel inferior). **C.** Cincuenta  $\mu\text{g}$  de proteína de células C4HD transfectadas con 2  $\mu\text{g}$  del vector Stat3Y705-F, y luego tratadas o no con MPA por 5 min, fueron sometidas a SDS-PAGE y reveladas con un anticuerpo anti-fosfotirosina 701 Stat1 (panel superior). La membrana fue luego *strippeada* y revelada con un anticuerpo anti-Stat1 (panel inferior). Los experimentos descritos en **A** a **C** fueron repetidos tres veces con resultados similares. W: *Western blot*. **D.** Células C4HD fueron transfectadas transientemente con 2 $\mu\text{g}$ /hoyo del plásmido reportero m67-Luc y con 1  $\mu\text{g}$ /hoyo del vector de expresión CMV- $\beta\text{gal}$  como control interno. En las calles indicadas, las células C4HD fueron cotransfectadas con los plásmidos Stat3Y705-F o con Stat3-C. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando el vector vacío. Luego de la transfección, las células fueron tratadas o no con MPA por 48 h, y fueron luego cosechadas y lisadas. Las actividades luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa fueron

medidas como se describe en “Materiales y Métodos”. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa/actividad de  $\beta$ -galactosidasa respecto a células creciendo en 0.1% SFBch. Los datos presentados representan la media de dos experimentos independientes  $\pm$  ES. b vs. a; c vs. b:  $p < 0.001$ .

### **El bloqueo *in vivo* de la expresión de Stat3 resulta en la inhibición del crecimiento del tumor C4HD.**

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que, en el modelo experimental de carcinogénesis hormonal descrito en este trabajo, la proliferación está mediada por un complejo “*cross-talk*” entre las vías de los progestágenos y de los factores de crecimiento (Labriola *et al*, 2003; Balana *et al*, 1999; Balana *et al*, 2001). En el presente trabajo, se encontró que Stat3 es todavía un integrante más en este contexto, ya que la activación transcripcional de Stat3 inducida por MPA (Figura 17) es un requisito para el crecimiento celular inducido por MPA en las células C4HD (Figura 19). Entonces, se evaluó el efecto de inhibir Stat3 en el crecimiento *in vivo* de los tumores mamarios C4HD. Para esto, células C4HD creciendo en MPA 10 nM fueron transfectadas de manera transiente con el vector de expresión Stat3Y705-F, con el vector vacío pRc/CMV, o no fueron transfectadas. Luego de 48hs de transfección,  $10^6$  células de cada grupo experimental fueron inoculadas subcutáneamente en animales tratados con un pellet de 40 mg de MPA en el flanco opuesto al inóculo celular. El largo y el ancho tumorales fueron medidos 3 veces por semana para calcular el volumen. Todos los ratones (n=9) inyectados con células C4HD transfectadas con el vector pRc/CMV o con células C4HD sin transfectar (n=9), desarrollaron tumores que se hicieron palpables al día 8 luego de la inoculación. Por el contrario, sólo 4 de los 9 animales inyectados con células C4HD transfectadas con el vector Stat3Y705-F, desarrollaron tumor con una latencia tumoral de 3 días, en comparación con tumores de los grupos controles. La media del volumen tumoral de los tumores desarrollados a partir de células transfectadas con el vector de expresión para la forma dominante negativa de Stat3, Stat3Y705-F, fue significativamente menor que la de los tumores de ambos grupos controles (Figura 23).



**Figura 23. Bloqueo *in vivo* de la expresión de Stat3**

Células C4HD creciendo en 10 nM MPA fueron transfectadas transientemente con el vector de expresión DN Stat3Y705-F (▼), con el vector vacío pRc/CMV (■), o permanecieron sin tratar (▲), como se describe en la figura 22. Luego de 48 h de transfección,  $10^6$  células de cada grupo experimental fueron inoculadas subcutáneamente (s.c.) en animales tratados con 40 mg de un *pellet* de MPA en el flanco opuesto al inóculo celular, y el ancho y largo del tumor se midieron tres veces por semana para calcular el volumen tumoral, como se describe en “Materiales y Métodos”. Cada punto representa el volumen medio  $\pm$  Error Standard de 9 tumores independientes de cada grupo control, y de 4 de los tumores desarrollados en ratones inyectados con células transfectadas con Stat3Y705-F.

La velocidad de crecimiento tumoral, determinada como la pendiente de la curva de crecimiento, fue significativamente menor en los tumores desarrollados de células C4HD transfectadas con DN Stat3Y705-F, que la de los grupos controles (tabla 1).

Al día 21, se sacrificaron los animales de cada grupo y se extirparon los tumores. Los resultados están resumidos en la tabla 1. Para el día 21, se observó un retardo de 7 días en el crecimiento tumoral en los ratones inyectados con células tratadas con DN Stat3Y705-F respecto a los tumores desarrollados en los animales inoculados con células C4HD sin transfectar, y de 6 días respecto a los tumores de los ratones que

fueron inyectados con células transfectadas con el vector vacío pRc/CMV. No se observaron diferencias significativas con respecto a ninguno de los parámetros estudiados, es decir, ni en el crecimiento tumoral ni en la velocidad de crecimiento tumoral ni en el retardo de crecimiento, entre los tumores desarrollándose en ratones inoculados con células transfectadas con el vector pRc/CMV en comparación con los tumores provenientes de células C4HD no transfectadas (tabla 1).

**TABLA 1. Velocidades de crecimiento tumoral al día 21<sup>a</sup>**

Tratamiento	Vol tumoral medio (mm <sup>3</sup> )±ES	Velocidad de crecimiento (mm <sup>3</sup> /día)	% Inhibición en el crecimiento
Stat3Y705-F	101.1 ± 39.09*	7.55 ± 1.15*	57.14, <sup>b</sup> 63.84 <sup>c</sup>
pRc/CMV	235.9 ± 52.55†	16.52 ± 1.287†	
C4HD salvajes	279.6 ± 49.15†	18.92 ± 1.597†	

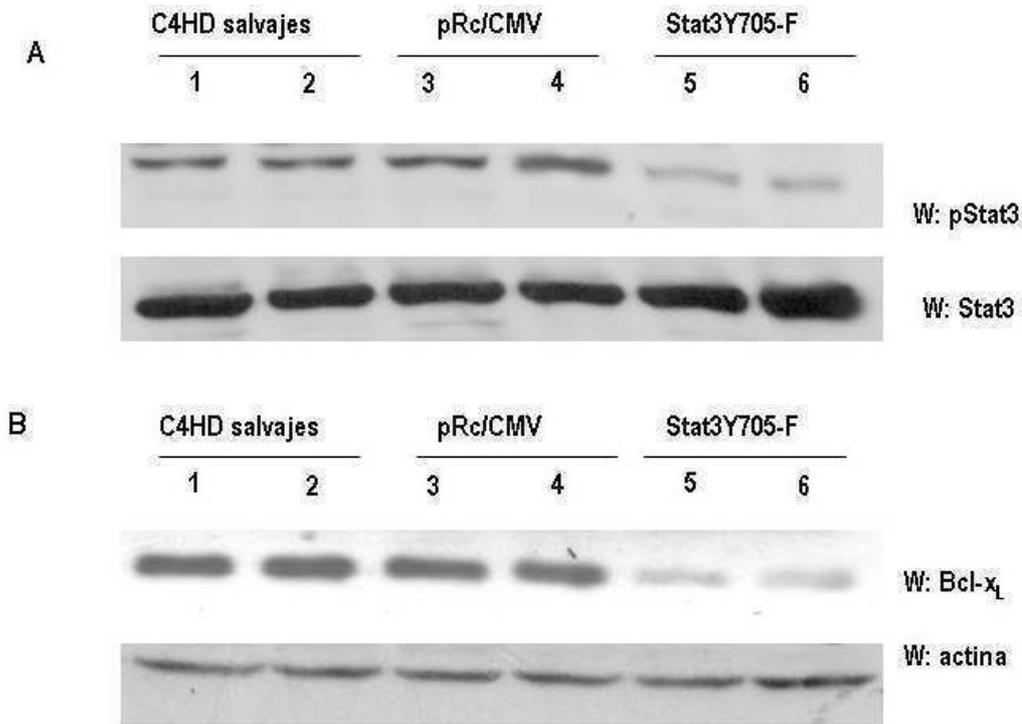
<sup>a</sup> Todos los protocolos experimentales fueron realizados en ratones tratados con un depot subcutáneo de 40mg de MPA en el flanco opuesto del inóculo celular. Los ratones fueron inoculados con células C4HD transfectadas con el vector de expresión del DN Stat3Y705-F o el vector vacío pRc/CMV, o con células C4HD salvajes. Mientras que cada grupo control contenía nueve ratones, sólo cuatro de los nueve ratones inyectados con células transfectadas con el vector DN Stat3Y705-F, desarrollaron tumor. La velocidad de crecimiento fue calculada como la pendiente de la curva de crecimiento. Al día 21, se calcularon el volumen tumoral y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los tumores de los ratones inyectados con células transfectadas con el vector de expresión DN Stat3Y705-F, respecto a los ratones inyectados con el vector vacío pRc/CMV o con células C4HD salvajes, tal como se describe en Materiales y Métodos. \* versus †,  $P < 0.001$ .

<sup>b</sup> Respecto a tratamiento con pRc/CMV.

<sup>c</sup> Respecto a tratamiento con células C4HD salvajes.

La morfología general de los tumores extirpados el día 21, se evaluó por tinción de los cortes histológicos con Hematoxilina-Eosina (H&E). Los tumores de los ratones inoculados con células transfectadas con DN Stat3Y705-F mostraron un número significativamente menor de mitosis (valores correspondientes a la categoría 1: 0 a 5 mitosis/10 Campos de Alto Poder), en comparación con los tumores de animales que recibieron células sin transfectar o transfectadas con el vector vacío (los cuales mostraron un número mayor a 10 mitosis/10 Campos de Alto Poder, correspondiente a un conteo mitótico de categoría 3). Para profundizar acerca del mecanismo involucrado en la inhibición del crecimiento tumoral por la transfección con Stat3Y705-F, se exploraron los niveles de fosforilación en tirosina de Stat3 y de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x<sub>L</sub> en las muestras tumorales. Se encontraron niveles significativamente menores de Stat3 fosforilada en los tumores desarrollados en los

animales inoculados con células transfectadas con DN Stat3Y705-F respecto a los de animales tratados con células transfectadas con pRc/CMV o con células sin transfectar. Además, la expresión del gen Bcl-x<sub>L</sub> fue dramáticamente menor en los tumores de células transfectadas con DN Stat3Y705-F que la de ambos grupos controles (Figura 24B).



**Figura 24. El bloqueo de la activación de Stat3 *in vivo* inhibe la fosforilación de Stat3 y la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> inducidos por MPA.**

Cien µg de proteínas de lisados tumorales fueron sometidas a SDS-PAGE y reveladas con un anticuerpo anti-fosfotirosina Stat3 (panel superior). Se muestran dos tumores representativos de cada grupo de ratones, inyectados con células C4HD salvajes (calles 1 y 2), inyectados con células C4HD transfectadas con el vector vacío pRc/CMV (calles 3 y 4), e inyectados con células C4HD transfectadas con el vector de expresión DN Stat3Y705-F (calles 5 y 6). La membrana fue luego *stripeada* y revelada con anticuerpo anti-Stat3 (panel inferior). Este es un experimento representativo de un total de tres. El análisis densitométrico de las bandas fosforiladas de Stat3 de los cuatro tumores desarrollados en ratones inyectados con células C4HD transfectadas con el vector DN Stat3Y705-F, y de los múltiples tumores C4HD desarrollados en ratones inyectados con células controles (C4HD salvajes, C4HD transfectadas con el vector vacío pRc/CMV), mostró una reducción significativa en la fosforilación en tirosina de Stat3 en los tumores de los primeros, respecto a los últimos ( $p < 0.001$ ). W: *Western blot*. **B.** Cien µg de proteína de lisados tumorales fueron sometidas a SDS-PAGE y reveladas con un anticuerpo anti-Bcl-x<sub>L</sub> (panel superior). Se muestran dos tumores representativos de cada grupo de ratones, inyectados con células

C4HD salvajes (calles 1 y 2), inyectados con células C4HD transfectadas con el vector vacío pRc/CMV (calles 3 y 4), e inyectados con células C4HD transfectadas con el vector de expresión DN Stat3Y705-F (calles 5 y 6). La membrana fue luego *stripped* y revelada con un anticuerpo anti-actina (panel inferior), como control de la especificidad del efecto del DN Stat3Y705-F. El análisis densitométrico de la banda de Bcl-x<sub>L</sub> de los tumores desarrollados en los ratones inyectados con células C4HD transfectadas con DN Stat3Y705-F, expresado como un porcentaje de los valores controles (es decir de los tumores creciendo en los grupos controles) varió entre 25 y 40%. Hubo una inhibición significativa de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> en los ratones inyectados con células transfectadas con DN Stat3Y705-F respecto a los ratones inyectados con células transfectadas con el vector pRc/CMV o con células C4HD salvajes (p<0.001).

No hubo signos de toxicidad manifiesta en los ratones inyectados con células transfectadas con el vector de expresión para la forma mutante Stat3Y705-F. Asimismo, no se observó pérdida de peso en este grupo, lo que demuestra buena tolerancia por parte de los animales. El examen histopatológico del hígado, pulmón y bazo no reveló ningún cambio histopatológico (datos no mostrados).



# **DISCUSIÓN**

En el presente estudio, se demostró que el MPA aumenta la expresión de Stat3 en las células tumorales mamarias C4HD, un modelo experimental de carcinogénesis hormonal inducido por progestágenos. Este efecto fue completamente inhibido por el antagonista de progestágenos RU486, indicando la participación del RP clásico. La habilidad de los progestágenos de modular la expresión de Stats en células de cáncer de mama fue hallada previamente por Lange y colaboradores (Lange *et al*, 1998) y por Richer y colaboradores (Richer *et al*, 1998), quienes demostraron que el tratamiento de las células T47D con el progestágeno sintético R5020 resultó en un aumento de los niveles proteicos de Stat3, Stat5a y Stat5b. Estos autores también encontraron una asociación constitutiva entre Stat5 y la isoforma B del RP (RP-B) en células HeLa transfectadas con el RP-B (Richer *et al*, 1998). Se demostró recientemente que la progesterona induce la expresión de Stat5a en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que fueron transfectadas con RP (Lin *et al*, 2003).

También se hallaron interacciones funcionales entre progestágenos y Stat3 en células de la mucosa del endometrio luego de la implantación (células de la decidua) (Liu & Ogle, 2002). En particular, la progesterona aumentó el *pool* citoplasmático de Stat3 en el mesometrio decidual de ratas durante la preñez, y este efecto fue inhibido por RU486, lo que prueba que la expresión de Stat3 es, en este contexto, el resultado de la acción de la progesterona. Asimismo se detectó asociación entre RP y Stat3 en el mesometrio decidual.

Con respecto a Stat1, los resultados de este trabajo indicando que el MPA no ejerce efecto en la expresión de Stat1, o bien reduce su expresión levemente, están de acuerdo con los previamente reportados para células T47D (Richer *et al*, 1998). Conociendo el fuerte efecto proliferativo que ejerce el MPA en las células C4HD, los presentes hallazgos apoyan la evidencia creciente que otorga a Stat1 un rol inhibitorio en el crecimiento (Bowman *et al*, 2000; Bromberg & Darnell, Jr., 2000; Yu & Jove, 2004; Shen *et al*, 2001). En particular, hay evidencia que indica que Stat1 funciona antagonizando a Stat3, quien tiene potencial oncogénico intrínseco, mientras que Stat1 tiene propiedades opuestas de tipo supresoras tumorales (Bromberg *et al*, 1999; Kaplan *et al*, 1998a).

En este trabajo se demuestra por primera vez que los progestágenos inducen la rápida fosforilación en tirosina de Stat3, Jak1 y Jak2. Además, el MPA estimula la

asociación entre RP y Stat3, la translocación nuclear de Stat3, su unión al ADN y su activación transcripcional. Todos estos efectos fueron abolidos por RU486, indicando la participación del RP intracelular clásico. Evidencia adicional de la participación del RP clásico en la fosforilación de Stat3 inducida por progestágenos fue proporcionada por nuestros resultados con las líneas celulares LM3 y T47D-Y, carentes de RP. En ellas, el MPA es incapaz de inducir la fosforilación en tirosina de Stat3, mientras que la transfección de estas células con RP-B restaura la inducción de la fosforilación de Stat3 por MPA. Estos resultados son particularmente interesantes por dos razones. En primer lugar, porque proveen sustento a la evidencia acumulada que demuestra la activación de Stat3 en células de cáncer de mama. De hecho, se han encontrado fosforilación en tirosina y unión al ADN de Stat3 de manera constitutiva en líneas celulares de cáncer de mama y en muestras tumorales de mama (Burke *et al*, 2001;Garcia *et al*, 2001;Li & Shaw, 2002;Real *et al*, 2002;Vultur *et al*, 2004). En segundo lugar, porque hemos descubierto efectos rápidos, no genómicos de la progesterona, tales como la capacidad del MPA de inducir la fosforilación en tirosina de Stat3, Jak1 y Jak2 en células tumorales mamarias murinas y humanas. Trabajos de Lange y colaboradores (Lange *et al*, 1998) y de Richer y colaboradores (Richer *et al*, 1998) han proporcionado evidencia sobre la capacidad de los progestágenos de inducir la fosforilación en tirosina de Jak2. No obstante, en estos estudios, el tratamiento por tiempos cortos con R5020 de las células T47D no indujo la fosforilación en tirosina de Jak2, la que se hizo detectable luego de 48hs de estimulación con el progestágeno sintético R5020. Esta discrepancia puede deberse a diferencias entre los clones de células T47D usadas. Sin embargo, es destacable resaltar que ya sea a través de los efectos transcripcionales directos (Lange *et al*, 1998;Richer *et al*, 1998), o a través de los mecanismos rápidos no genómicos, los progestágenos son capaces de modular la fosforilación de Jak2 en células de cáncer de mama.

De los resultados de este estudio, usando los vectores de expresión para DN Jak1 y DN Jak2, se desprende claramente que los progestágenos inducen la fosforilación en tirosina de Stat3 por un mecanismo dependiente de Jaks. Es muy interesante destacar que, mientras la fosforilación en tirosina de Stat3 inducida por MPA es transiente, la activación de Jaks persiste como mínimo por 15 minutos y retorna a los niveles basales luego de 30 minutos de tratamiento con MPA, tanto en las células C4HD como en las T47D. Esta activación prolongada de Jaks podría reflejar la participación de las Jaks en

otras vías de señalización activadas por MPA por un mecanismo no genómico, además de la inducción de la fosforilación en tirosina de Stat3.

En el presente trabajo, se evaluó también el rol de c-Src en la activación de Stat3 inducida por progestágenos en las células C4HD. Se estudió c-Src porque una serie de reportes previos habían demostrado el requerimiento de la actividad de c-Src para la activación de Stat3 en células de cáncer de mama (Bowman *et al*, 2000; Garcia *et al*, 2001; Garcia *et al*, 2001; Vultur *et al*, 2004; Yu & Jove, 2004; Zhang *et al*, 2000). Asimismo, existe cada vez más evidencia que manifiesta la habilidad de los progestágenos de inducir la fosforilación de c-Src por un mecanismo no genómico en células tumorales mamarias (Ballare *et al*, 2003; Castoria *et al*, 1999; Migliaccio *et al*, 1998; Boonyaratanakornkit *et al*, 2001). Notablemente, se encontró que el tratamiento de las células C4HD con MPA durante 2 minutos indujo una marcada fosforilación de c-Src. La inhibición de la actividad de Src bloqueó, tanto la capacidad del MPA de inducir la fosforilación de Stat3, como su activación transcripcional, en los dos tipos celulares, C4HD y T47D. Es interesante destacar que también se encontró que la inhibición de la actividad de c-Src resulta en el bloqueo de la fosforilación en tirosina de Jak1 y Jak2 estimulada por MPA. Por lo tanto, estos hallazgos revelan que los progestágenos inducen la fosforilación en tirosina de Stat3 por un mecanismo dependiente de Jak y Src. El mecanismo molecular por el cual las quinasas Jaks y Src participan en la fosforilación de Stat3 todavía no está completamente esclarecido. Se puede postular como hipótesis que Jaks y Src cooperan en la activación de Stat3 en las células C4HD, como fue descrito en otras células de cáncer de mama (Garcia *et al*, 2001).

Se han descrito distintos roles funcionales y estructurales, tanto de las Jaks como de Src con respecto a su participación en la vía de señalización de Stat3. Está bien establecido que v-Src induce la activación constitutiva de Stat3 en fibroblastos transformados (Zhang *et al*, 2000). Se demostró además que, en este contexto, Stat3 no es activada exclusivamente por Src y que las Jaks son requeridas para la activación de Stat3. A pesar de que, en las células NIH-3T3 transformadas por Src, Jak1 no fosforila eficientemente a Stat3, Jak1 estaría ejerciendo un rol indirecto en estimular la fosforilación de Stat3 inducida por Src. Jak1 serviría para reclutar Stat3 a un complejo de receptores junto con Src, quien directamente fosforilaría y activaría Stat3 (Zhang *et al*, 2000). Esta hipótesis tiene también sustento en los resultados que indican una asociación física de Src y Stat3, tanto *in vivo* como *in vitro*, junto con la demostración de la capacidad de Src de fosforilar Stat3 (Cao *et al*, 1996). En carcinomas de cabeza y

cuello, es la actividad de Jak2 la que no resulta esencial para la activación de Stat3 ni para el crecimiento celular resultante de la activación de Stat3. Pero, en este modelo de carcinoma de cabeza y cuello, la actividad de Src juega un rol fundamental en estos procesos, ya que su inhibición bloqueó la fosforilación de Stat3 y la proliferación celular (Xi *et al*, 2003). Además de su funcionalidad como quinasa, se demostró que la conformación abierta de Src podría ser importante en la interacción con Stat3 (Chaturvedi *et al*, 1997;Cao *et al*, 1996), con lo cual esta proteína estaría también involucrada en funciones de andamiaje, constituyendo una plataforma de asociación de distintos factores. En el modelo de transformación por la oncoproteína *Simian virus 40 large tumor antigen*, tanto las Jaks como la Src median, al menos en parte, la fosforilación de Stat3 y, Stat3 es necesaria para dicha transformación neoplásica en fibroblastos murinos (Vultur *et al*, 2005).

Los resultados del presente trabajo sugieren un mecanismo por el cual Src, activada por la progesterona unida al RP clásico, actúa como una quinasa río arriba de la fosforilación de Jak1 y Jak2. Entonces proponemos dos posibles mecanismos río abajo de este evento, consistentes con los resultados en este modelo experimental. Primero, ambas quinasas, Jaks y Src, podrían actuar como quinasas de Stat3. Alternativamente, las Jaks activas podrían servir para reclutar Stat3 a Src, quien, a su vez, fosforilaría directamente Stat3, tal como fue propuesto en la línea celular NIH-3T3 transformada con v-Src (Zhang *et al*, 2000). Resultados existentes en literatura en donde en varias líneas celulares de cáncer de mama humano, se probó que las quinasas Src y los miembros de la familia de quinasas en tirosina Jaks, cooperan en mediar la activación constitutiva de Stat3 (Garcia *et al*, 2001), apoyan los hallazgos descritos en este estudio.

Notablemente, en este trabajo se han descifrado varios eventos en el mecanismo molecular de la activación de Stat3 inducida por MPA. Se probó que la activación de Src mediada por MPA, quien a su vez induce la fosforilación en tirosina de Stat3, es un requisito para la translocación nuclear de Stat3 y la asociación con el RP.

En el presente estudio, se provee la primera demostración que los progestágenos son capaces de inducir la activación transcripcional de Stat3 en células de cáncer de mama humano y murino. Como es previsible de los resultados observados con respecto a la fosforilación en tirosina de Stat3, el análisis de los mecanismos moleculares involucrados en la activación transcripcional de Stat3 inducida por MPA en las células

C4HD y en las T47D, mostró que es mediada por el RP nuclear clásico y que requiere las actividades de Jak1, Jak2 y Src.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la proliferación del tumor C4HD inducida por progestágenos está dirigida por una compleja interacción bidireccional entre las vías de los progestágenos y de los factores de crecimiento (Balana *et al*, 2001; Balana *et al*, 1999; Labriola *et al*, 2003; Salatino *et al*, 2004). En el presente trabajo, se encontró que Stat3 es un participante más en este contexto, ya que la activación transcripcional de Stat3 inducida por MPA, (Figura 17) es un requisito para la estimulación del crecimiento de las células C4HD (Figura 19). De este modo, la transfección de las células C4HD con el vector de expresión para la forma DN de Stat3, Stat3Y705-F (Bromberg *et al*, 1998; Kaptein *et al*, 1996; Li & Shaw, 2002), inhibió fuertemente la proliferación inducida por MPA promoviendo arresto del ciclo celular y apoptosis. Estos hallazgos, proveen la primera prueba sobre la participación de Stat3 en el crecimiento celular del cáncer de mama inducido por progestágenos y concuerdan con la evidencia creciente que existe en literatura que prueba la participación de Stat3 en la proliferación de células de cáncer de mama. Ha sido demostrado que las Stats regulan la proliferación celular a través de distintos mecanismos, como por ejemplo, inhibiendo la apoptosis (Takeda *et al*, 1998), o modulando la expresión de genes necesarios para la proliferación (Nakajima *et al*, 1997), como es el caso de los genes de ciclinas (ciclina D1) (Bromberg *et al*, 1999) (Leslie *et al*, 2006) y de ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) (Kaplan *et al*, 1998b). De hecho, Stat3 puede incluso jugar un rol crítico en la determinación del destino celular (Ihara *et al*, 1997). Existen evidencias que demuestran que la activación constitutiva de Stat3 impide la diferenciación y mantiene a las células en un estado continuo de proliferación (Matsuda *et al*, 1999). Stat3 regula, por ejemplo, la transcripción del gen c-Myc, un regulador crítico del crecimiento celular. El producto de este gen está modulado coordinadamente por múltiples señales en funciones celulares diversas tales como crecimiento, diferenciación y muerte, tanto en células normales como en transformadas (Kiuchi *et al*, 1999).

Respecto a la participación de Stat3 en la regulación del crecimiento, se probó que inhibidores farmacológicos de Src y Jaks, cuya activación es un requerimiento para la fosforilación y unión al ADN de Stat3, resultan en la inhibición del crecimiento celular en varias líneas celulares de cáncer de mama que poseen Stat3 activa, con un aumento significativo en el porcentaje de células experimentando apoptosis (Burke *et al*,

2001;Jing *et al*, 2004). Además, se observó inducción de apoptosis e inhibición del crecimiento celular de células con activación constitutiva de Stat3, cuando se las transfeció con vectores de expresión para una forma DN natural de Stat3, Stat3 $\beta$ , o con la mutantes DN Stat3Y705-F, o DN Stat3 E/V (éste último incapaz de unirse al ADN) (Burke *et al*, 2001;Garcia *et al*, 2001;Li & Shaw, 2002). El mecanismo preciso por el cual Stat3 $\beta$  media la apoptosis en las células estudiadas no ha sido dilucidado todavía, pero los autores encontraron evidencias que indican que la forma dominante negativa de Stat3 inhibe la expresión de la proteína Bcl-x<sub>L</sub>. (Catlett-Falcone *et al*, 1999). Recientemente, se ha publicado que la confluencia celular induce un fuerte aumento en la fosforilación de Stat3 tanto en células mamarias normales como en células mamarias tumorales. La activación de Stat3 inducida por la confluencia es dependiente del contacto célula-célula y de la activación de Jaks pero no requiere a la quinasa Src funcional (Vultur *et al*, 2004).

En el presente trabajo, se demostró que la transfección con una forma constitutivamente activa de Stat3, Stat3-C (Bromberg *et al*, 1999), indujo proliferación independiente de MPA en células de cáncer de mama. La nuestra es la primera evidencia de un vínculo directo entre crecimiento hormono-independiente de tumores de mama y activación de Stat3. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos con la mutante Stat3-C constitutivamente activa, que demostraron que Stat3 posee una capacidad intrínseca de inducción de transformación celular. Por consiguiente, fibroblastos murinos que expresan Stat3-C forman colonias en agar blando e inducen tumores en ratones *nude* (Bromberg *et al*, 1999). Asimismo, se ha demostrado recientemente que Stat3-C transforma células epiteliales humanas inmortalizadas, las cuales adquieren entonces la capacidad de desarrollar tumores en ratones diabéticos no obesos con inmunodeficiencia severa combinada que han sido irradiados (Dechow *et al*, 2004).

La actividad antiapoptótica de Bcl-x<sub>L</sub> ha sido atribuida a su habilidad para formar heterodímeros e inactivar miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, incluyendo a Bad, Bax, y Bak (Kelekar *et al*, 1997). De esta manera, la expresión no regulada de cualquiera de estas proteínas puede resultar en un desbalance que afecta la respuesta celular a las señales fisiológicas para la apoptosis. Reportes previos han identificado a miembros del grupo de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 como proteínas cuyos genes están regulados por Stat3, en condiciones en donde Stat3 modula el crecimiento y la supervivencia celular (Bromberg *et al*, 1999;Catlett-Falcone *et al*,

1999). Precisamente, la activación constitutiva de Stat3 resulta en la expresión elevada de Bcl-x<sub>L</sub> en una variedad de células tumorales (Yu & Jove, 2004), hecho que se correlaciona con la inducción de respuestas proliferativas vía Stat3 (Real *et al*, 2002; Yu & Jove, 2004). Por ejemplo, la activación constitutiva de Stat3 protege de la apoptosis en la línea celular de mieloma múltiple humano U266 (Catlett-Falcone *et al*, 1999) y en otras líneas celulares (Shen *et al*, 2001) por aumento de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub>. Entonces, la transformación por Stat3-C puede contribuir, en forma general, a estimular la progresión del ciclo celular y proveer protección contra la apoptosis, confiriendo una ventaja en la supervivencia de las células tumorales (Bromberg *et al*, 1999).

De hecho, hoy en día se conocen un gran número de reguladores del ciclo celular, tanto inhibidores como promotores, que forman un grupo importante de genes que podría ser afectado por una molécula de Stat3 activa. Se han publicado trabajos que demuestran la existencia de una correlación entre la fosforilación de Stat3 y la proteína antiapoptótica survivina, la cual es un blanco directo de Stat3. Esta proteína podría ser otro componente más en los efectos de Stat3 con respecto a la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Ambrosini *et al*, 1997; Li & Altieri, 1999; Altieri, 2003b; Altieri, 2003a). De la misma manera, en ciertos tipos de leucemias, la inhibición de la vía de Stat3 induce apoptosis independiente de Bcl-x<sub>L</sub>, pero dependiente de la expresión de Mcl-1, otro miembro perteneciente a la familia de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 (Epling-Burnette *et al*, 2001). Es así como la supervivencia celular regulada por la vía de Jaks/Stats parece ser compleja, involucrando el control de proteínas antiapoptóticas y posiblemente, otros mecanismos todavía no identificados.

A la inversa, el bloqueo de la activación de Stat3 o la transfección con variantes DN de Stat3, resultó en la inducción de apoptosis, inhibición de crecimiento tumoral y disminución de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> (Amin *et al*, 2004). En el presente trabajo, se encontró que el MPA indujo un aumento en la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> en las células C4HD, que fue inhibido en presencia de Stat3Y705-F. Conjuntamente, el bloqueo de la actividad de Src resultó en una inhibición significativa del aumento de expresión de Bcl-x<sub>L</sub>, demostrando la intervención de Stat3 en la inducción del aumento de Bcl-x<sub>L</sub> por MPA. Por el otro lado, la transfección de las células C4HD con la mutante Stat3-C indujo un aumento en los niveles proteicos de Bcl-x<sub>L</sub>, comparable al efecto ejercido por MPA. Estos resultados son consistentes con un mecanismo de transformación maligna en donde la activación persistente de Stat3 inducida por MPA podría contribuir al crecimiento tumoral mediante la prevención de la apoptosis de las células C4HD. La

inhibición de la activación de Stat3 a través de la transfección del DN Stat3Y705-F, podría, por consiguiente, resultar en el bloqueo del crecimiento inducido por MPA sensibilizando así a las células tumorales a la apoptosis. De esta manera, la activación de Stat3 podría no solamente otorgar una ventaja proliferativa, permitiendo acumulación de células tumorales, sino también conferir resistencia a terapias convencionales que dependen de la maquinaria apoptótica para eliminar a las células tumorales. En este contexto, el bloqueo de la señalización de Stat3, en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar para tratar cánceres de mama, podría conducir a mayor quimiosensibilidad y reducción tumoral. Los beneficios de la quimioterapia citotóxica están frecuentemente atenuados por el daño a las células normales. Los efectos colaterales en tejidos y órganos no cancerosos comprometen la capacidad del tratamiento para eliminar la carga tumoral y erradicar las metástasis. Hay resultados que sugieren que un inhibidor específico de las Jaks (AG490) usado para inhibir la activación de Stat3, en combinación con otros compuestos citotóxicos podría ofrecer un mecanismo para reducir las dosis terapéuticas de los regímenes quimioterapéuticos y de ese modo limitar los efectos clínicos colaterales no deseados en los pacientes (Burke *et al*, 2001). Estos autores probaron que los efectos adversos de AG490 en el tejido mamario normal son significativamente menores que en el tejido tumoral, el cual presenta activación de Stat3. Un posible mecanismo para esta sensibilidad aumentada de las células tumorales es que las células malignas con Stat3 activa podrían pasar a ser dependientes de esta vía para mantener su crecimiento y supervivencia. En contraste, las células normales serían capaces de usar vías alternativas para compensar la pérdida de la señalización de Stat3 (Burke *et al*, 2001).

Finalmente, nuestros resultados demostraron que el bloqueo de la activación de Stat3 por el vector de expresión del DN Stat3Y705-F, resultó en la inhibición del crecimiento *in vivo* del tumor mamario en este modelo de ratones inmunocompetentes. Se trabajó con una estrategia experimental en la cual se modifican las células *ex vivo* antes de su inoculación en el ratón. De este modo, las células C4HD fueron transfectadas de manera transiente con el vector de expresión DN Stat3Y705-F y fueron luego inoculadas subcutáneamente en ratones singéncicos. En un alto porcentaje de ratones inyectados con células C4HD transfectadas con DN Stat3Y705-F no se desarrollaron tumores. Asimismo, el bajo porcentaje de tumores que crecieron en los animales inoculados con células transfectadas con DN Stat3705-F, manifestaron un retraso en la formación tumoral, un tamaño tumoral significativamente menor y una

menor velocidad de crecimiento. Una probable explicación para la falta de crecimiento tumoral en cinco de los nueve ratones inoculados con células C4HD transfectadas con DN Stat3705-F es que el DN Stat3705-F indujo apoptosis de las células C4HD (Figura 20), la que impidió su crecimiento en el sitio de la inoculación. El estudio de los mecanismos involucrados en la disminución de la proliferación en el bajo porcentaje de tumores que crecieron en los ratones inyectados con las células C4HD transfectadas con DN Stat3705-F, reveló un nivel significativamente menor de fosforilación en tirosina de Stat3 comparado con los grupos controles. La falta de la activación de Stat3 fue acompañada por una dramática reducción en la expresión de Bcl-x<sub>L</sub>. Existe en bibliografía otro reporte evaluando el efecto de la inhibición de la actividad de Stat3 en el crecimiento tumoral mamario, en donde se usaron oligodeoxinucleótidos ricos en guanina (GQ-ODN) para inhibir la activación de Stat3 (Jing *et al*, 2004). Estos oligodeoxinucleótidos bloquean la capacidad de Stat3 de unirse al ADN. La administración sistémica de los GQ-ODN inhibió el crecimiento del implante tumoral xenogéneo (línea MDA-MB-468, de cáncer de mama humano) en ratones *nude*. Los mecanismos propuestos como inhibitorios del crecimiento tumoral ejercidos por estos GQ-ODN son notablemente similares a los propuestos en la estrategia experimental reportada en este estudio. Así, los niveles de expresión de Stat3, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> fueron significativamente inhibidos y el grado de apoptosis fue notablemente mayor en los tumores de los ratones recibiendo GQ-ODN comparado con los tumores de células tratadas con placebo (Jing *et al*, 2004).

En el presente trabajo no fue posible determinar niveles mayores de apoptosis en los tumores de células C4HD transfectadas con DN Stat3705-F con respecto a los grupos controles cuando se utilizó el método de marcación de células apoptóticas con dUTP-biotina por la deoxinucleotidil-transferasa terminal (resultados no mostrados). A pesar de que este resultado fue, hasta cierto punto, inesperado, una probable explicación podría ser que la velocidad del proceso de muerte impida la visualización y cuantificación de la apoptosis. Los tumores inoculados en los ratones tuvieron un desarrollo de 21 días. Se podría postular que el mecanismo de inhibición del crecimiento tumoral en esta estrategia experimental *in vivo* depende del bloqueo de la activación de Stat3 inducida por MPA, lo que resulta en la inhibición de la expresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-x<sub>L</sub>, que a su vez desencadena apoptosis en las células tumorales mamarias. El bloqueo de la señalización por Stat3 podría, además,

inducir apoptosis por un mecanismo independiente de la disminución de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> (Epling-Burnette *et al*, 2001; Niu *et al*, 2001).

Además de la regulación transcripcional directa ejercida por la transfección con las variantes de las formas DN Stat3, la cual podría explicar las propiedades inhibitorias del DN Stat3, se ha reportado un fuerte efecto *bystander* mediado por la expresión del DN Stat3. Este efecto consiste en una inhibición indirecta del crecimiento o muerte de las células tumorales adyacentes a las directamente afectadas por la transfección con el vector de expresión para la forma DN Stat3. Así, el grupo de Hua Yu demostró que la electroinyección intratumoral de un vector codificante para una forma dominante negativa natural de Stat3 (Stat3 $\beta$ ) en melanomas murinos B16 preexistentes, inhibió el crecimiento tumoral *in vivo* (Niu *et al*, 1999; Niu *et al*, 2001). Sus resultados sugieren que sólo las células tumorales con Stat3 activada se vuelven dependientes de la vía de Stat3 para su supervivencia, ya que las células normales son insensibles a la muerte por apoptosis en presencia de Stat3 $\beta$  (Niu *et al*, 1999). Dado que sólo entre 10 y 15 por ciento de células tumorales fueron transfectadas *in vivo* en estos estudios, el efecto antitumoral de Stat3 $\beta$  fue asociado con apoptosis masiva de las células B16, sugiriendo el ya mencionado efecto *bystander* (Niu *et al*, 2001). De hecho, la efectividad de la terapia génica en el tratamiento del cáncer depende, en gran medida, del mencionado efecto, ya que la eficiencia de transfección es un paso limitante para este procedimiento. Las células transfectadas con Stat3 $\beta$  liberan factores solubles capaces de inducir apoptosis y arresto del ciclo celular de las células B16 no transfectadas, implicando que el efecto *bystander* podría ser mediado en parte por factores solubles (Niu *et al*, 2001). Se probó, de hecho, que la expresión de Stat3 $\beta$  indujo la expresión del efector apoptótico Ligando inductor de la apoptosis asociado al Factor de Necrosis Tumoral, el cual induce muerte celular específica de las células tumorales (Niu *et al*, 2001). En carcinoma humano de cabeza y cuello, la inhibición de la señalización de Stat3 por oligodeoxinucleótidos antisentido, bloqueó el crecimiento inducido por el Factor de Crecimiento Transformante alfa en estas células tumorales (Grandis *et al*, 2000). La identificación y caracterización con mayor profundidad de estos factores solubles debería ayudar a dilucidar los mecanismos moleculares responsables de los efectos *bystander* antitumorales inducidos por la terapia dirigida contra Stat3.

Recientemente fue demostrado que el bloqueo de Stat3 en células tumorales aumentó la expresión de citoquinas proinflamatorias que activan a las células del

sistema inmune para la producción de señales intercelulares como óxido nítrico y factor de necrosis tumoral alfa (Wang *et al*, 2004). El bloqueo de Stat3 también induce la liberación de interferones, quienes regulan negativamente la invasión celular, la metástasis, la entrada al ciclo celular e inducen apoptosis (Bromberg *et al*, 1996;Chawla-Sarkar *et al*, 2003). Los mediadores inflamatorios sintetizados como consecuencia de la inhibición de la función de Stat3 en las células tumorales también favorecen la maduración de las células dendríticas produciendo la respuesta de los linfocitos T, específicas contra el tumor (Wang *et al*, 2004). Como consecuencia, tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa se estimulan por el bloqueo de Stat3 en tumores.

Además de la modulación de reguladores clave de la apoptosis, se ha expuesto evidencia acerca del rol de Stat3 en la angiogénesis. Se demostró que la inhibición de las señales angiogénicas puede también mediar el efecto *bystander* del bloqueo de la señalización de Stat3 (Niu *et al*, 2002). En este sentido, existen resultados de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina que indican que Stat3 se une *in vivo* al promotor del VEGF (Niu *et al*, 2002), el cual es uno de los inductores conocidos más importantes de la angiogénesis, proceso necesario para adquirir nutrientes para el crecimiento continuo y la diseminación metastásica de las células tumorales (Grunstein *et al*, 1999). Además, el bloqueo de Stat3 inhibe el aumento de la expresión de VEGF inducido por vías de otras tirosinas quinasas que se encuentran río arriba de Stat3 (Niu *et al*, 2002;Wei *et al*, 2003). Por consiguiente, el bloqueo de la activación de Stat3 podría estar también ejerciendo su efecto de inhibición del crecimiento tumoral inhibiendo la angiogénesis.

Notablemente, todos los mecanismos descritos arriba como mediadores del efecto *bystander* de la inhibición de la señalización de Stat3, serían capaces de inhibir el crecimiento *in vivo* de las células C4HD transfectadas con DN Stat3Y705-F. El concepto de la inducción de una respuesta inmune del huésped en el efecto antitumoral es particularmente interesante, ya que este trabajo se realizó en un modelo de ratones inmunocompetentes, a diferencia del estudio mencionado antes en donde la administración sistémica de los GQ-ODNs inhibió el crecimiento de los implantes tumorales xenogéneos en ratones *nude* (Jing *et al*, 2004).

Una cuestión llamativa es el mecanismo que media la inhibición de la fosforilación en tirosina de Stat3 en tumores provenientes de células C4HD transfectadas con DN Stat3Y705-F. Los experimentos *in vitro* prueban un aumento

significativo en la expresión de Stat3 luego de la transfección de las células C4HD con el vector de expresión para DN Stat3Y705-F (Figura 22A), una correlación directa entre el aumento en la expresión de Stat3 luego de la transfección con DN Stat3Y705-F y la disminución en los niveles de fosforilación en tirosina de Stat3 (Figura 22B). Resta ser dilucidado si los niveles de expresión del vector DN Stat3Y705-F son lo suficientemente altos como para justificar los niveles bajos de la fosforilación en tirosina de Stat3 luego de 21 días de crecimiento tumoral *in vivo*. Otra posibilidad interesante a considerar es que serían los factores solubles liberados por células expresando DN Stat3Y705-F los que inhibirían la fosforilación en tirosina inducida por MPA.

Otros mecanismos celulares regulados por Stat3, que podrían estar siendo modificados en presencia de Stat3Y705-F transfectado en las células tumorales son, la invasión, la migración y el remodelado de la matriz extracelular. De hecho, se han identificado un gran número de genes inducidos por Stat3 que están involucrados en estas funciones celulares (Dauer *et al*, 2005). De este modo, los efectos de Stat3Y705-F, aunque sea en un porcentaje de las células tumorales, cobran mayor importancia general debido a la influencia de estas vías en el destino tumoral.

En este trabajo no solamente se ha descifrado un mecanismo nuevo de interacción entre progestágenos y Stat3 (Figura 25), sino que se han demostrado nuevos efectos no genómicos de los progestágenos en células de cáncer de mama que están directamente asociados a la proliferación. El mecanismo descrito en este trabajo involucra una serie de reacciones comenzando por la activación del RP por MPA y resultando en la activación transcripcional de un factor de transcripción blanco, representando entonces una vía novel de acciones no genómicas a genómicas del PR. Estos hallazgos demuestran por primera vez que los progestágenos son capaces de inducir la activación transcripcional de Stat3 que es, a su vez, un requisito obligatorio para la estimulación del crecimiento tumoral mamario inducido por progestágenos tanto *in vivo* como *in vitro*.

La asociación de la activación de Stat3 con la transformación y la progresión tumoral sugiere que Stat3 puede ser un blanco molecular atractivo para la terapia contra el cáncer. Varias estrategias experimentales han sido usadas para bloquear la función o la expresión de las Stats, incluyendo métodos antisentido, expresión ectópica de mutantes dominantes negativas (Nakajima *et al*, 1996; Rubin *et al*, 1998; Li & Shaw, 2002), inhibición de quinasas río arriba (Fry *et al*, 1994; Turkson *et al*, 1999; Kraker *et*

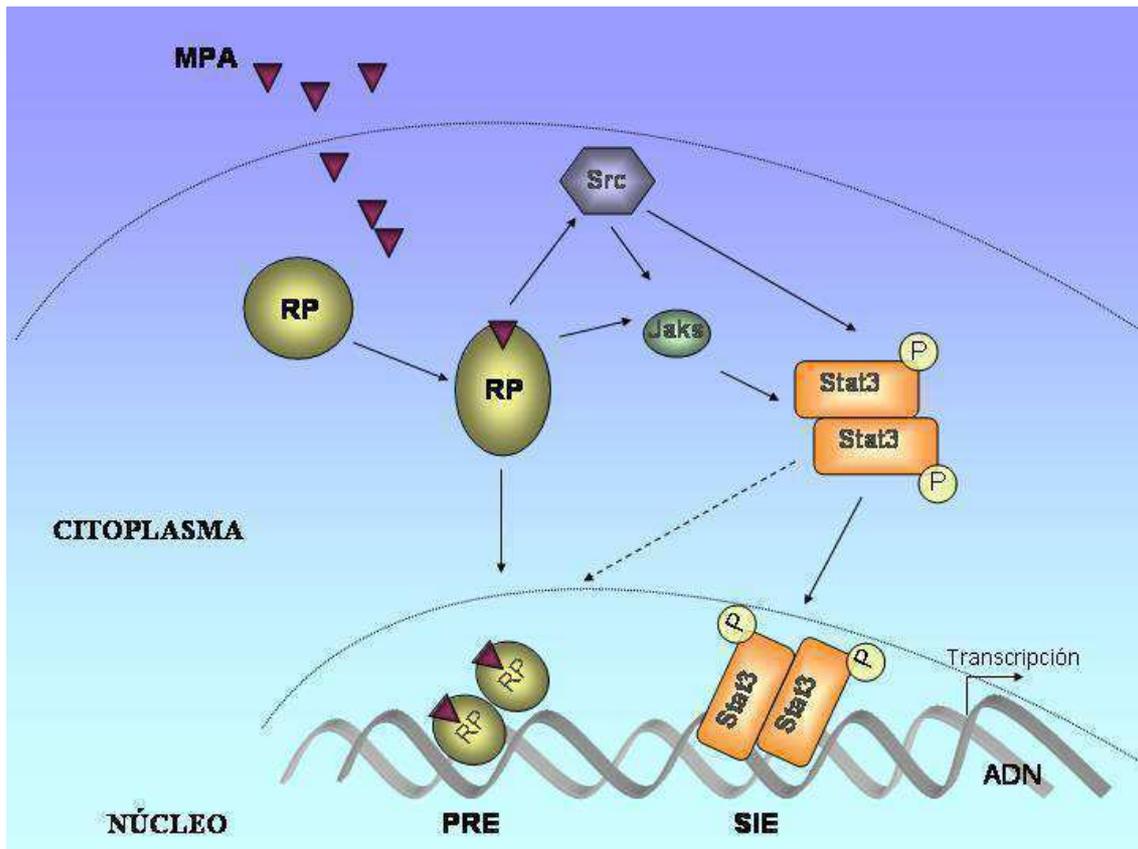
al, 2000), péptidos fosfotirosil (Turkson *et al*, 2001) y oligodeoxinuceótidos “anzuelo” doble cadena correspondientes a la secuencia del elemento respondedor a Stat3 (Xi *et al*, 2005). Ya que es improbable que la sola inhibición de Stat3 sea exitosa como terapia única para los pacientes con cáncer, sería importante evaluar el beneficio potencial de combinar el bloqueo de Stat3 con agentes quimioterapéuticos estándar usados para tratar esta enfermedad. Una terapia ideal contra el cáncer debería tener como característica la dirección específica a las células tumorales, es decir, que no resulte tóxica para las células normales. Junto con esto, y dada la importante participación de las Stats en la señalización en respuestas inmunes y en la regulación de la proliferación, es altamente deseable que el agente bloqueante de Stat3 no tenga actividad cruzada contra otras Stats, evitando problemas de inmunosupresión y de crecimiento tumoral.

Ratones deficientes en Stat3 muestran un fenotipo de tipo letal en el embrión (Takeda *et al*, 1997), lo que indica un requerimiento de la señalización de Stat3 ya desde etapas tempranas en el desarrollo. Sin embargo, muchos estudios que involucran la ablación tejida específica de Stat3, mostraron que células no tumorales carentes de expresión de Stat3, proliferan y sobreviven bien, tanto *in vitro* e *in vivo*. Por el otro lado, numerosos trabajos han demostrado que el bloqueo de Stat3 constitutivamente activa resulta en inhibición del crecimiento tumoral y apoptosis (Bowman *et al*, 2001; Turkson *et al*, 2001; Leong *et al*, 2003). Esta inhibición selectiva podría reflejar una dependencia irreversible de las células tumorales de los altos niveles de Stat3 activa para el crecimiento y la supervivencia, mientras que células normales serían capaces de soportar menores niveles de actividad de Stat3, o de usar vías alternativas para el crecimiento y supervivencia. Es por eso que los hallazgos de la activación constitutiva de Stat3 en diversos tumores humanos, en contraste con la activación rápida y transiente de Stat3 en células normales, ofrecen la posibilidad de usar Stat3 como un blanco molecular más atractivo aún para terapia génica, debido a esta característica. Una particularidad de Stat3 que lo hace atractivo como marcador pronóstico en el cáncer, es el hallazgo del aumento de fosforilación de Stat3 en los tejidos normales lindantes a las células cancerosas, sugiriendo que la activación de Stat3 podría preceder al cáncer “franco”, es decir, histopatológicamente detectable (Clevenger, 2004).

Existe evidencia creciente, incluidos resultados de nuestro laboratorio, que muestra que la proliferación de tumores mamarios está dirigida por un *cross-talk* bidireccional entre hormonas y factores de crecimiento. En el presente estudio, se ha demostrado que Stat3 es un participante crítico en este contexto. Considerando la

función de Stat3 como factor de transcripción, podría interactuar en la cromatina con otros factores de transcripción como el RP, para regular la transcripción génica, tanto en la proliferación normal como en el crecimiento aberrante de células tumorales. Por el otro lado, los efectos proliferativos de los factores de crecimiento, están mediados por vías de señalización que resultan en la activación última de factores de transcripción. En este contexto, las Stats resultan extremadamente atractivas dado que constituirían un punto de convergencia entre las vías de señalización de las hormonas esteroideas y de los factores de crecimiento, de manera que inhibir Stat3 podría resultar una terapia alternativa para el tratamiento efectivo del cáncer de mama.

De hecho, el haber logrado, en este trabajo, una significativa aunque incompleta inhibición del crecimiento tumoral bloqueando la activación de Stat3, suma apoyo a las numerosas evidencias indicando que se debe apuntar a más de un blanco terapéutico para lograr el bloqueo completo de las múltiples vías de señalización utilizadas por las células tumorales mamarias para proliferar. Las ventajas potenciales de combinar como terapia una estrategia de inhibición de Stat3 con quimioterapia incluyen los mecanismos y toxicidad no superpuestos, como también el potencial de reducir las dosis de quimioterapia sin perder los efectos antitumorales.



**Figura 25. Cross-talks entre las vías del RP y de Stats en células de carcinoma mamario.** Los progestágenos (ej: MPA) interactúan con el RP, el cual ejerce efectos no genómicos (activación de las quinasas Jaks, Src) y, tras translocar al núcleo, media efectos genómicos uniéndose a elementos respondedores a Progesterona en el ADN (PRE). Las quinasas citoplasmáticas Src y Jaks activas fosforilan a Stat3, el cual dimeriza y transloca al núcleo en donde se une a secuencias SIE específicas en el ADN. Considerando la función de Stat3 como factor de transcripción, éste podría interactuar con otros factores de transcripción, como por ejemplo el RP, para regular la transcripción génica y modular la expresión de genes relacionados con la proliferación y la supervivencia.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Animales

Los experimentos se realizaron en hembras vírgenes de la cepa BALB/c de dos meses de edad criadas en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Las hembras provenían de reproductores sanos y fueron criadas en un ambiente controlado y de entrada restringida, con agua y comida *ad libitum*, con doce horas de luz y doce de oscuridad. Todos los estudios se realizaron de acuerdo a los estándares de uso humanitario de animales de laboratorio del NIH y fueron, a su vez, aprobados por el comité de ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

## 2. Tumores

Se utilizó el adenocarcinoma mamario murino C4HD perteneciente al modelo experimental desarrollado por la Dra. Claudia Lanari (Lanari *et al*, 1986). Los tumores se originaron en ratones hembra BALB/c tratados con 40 mg del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) cada 3 meses durante 1 año y han sido mantenidos por pasajes singeneicos en ratones tratados con MPA (Lanari *et al*, 1986). El MPA se administra en forma de *depot* (40mg) en el flanco contralateral al inóculo tumoral. El adenocarcinoma mamario C4HD es de histología ductal, de crecimiento hormono-dependiente, requiriendo MPA para proliferar tanto *in vivo* como *in vitro* (Molinolo *et al*, 1987). En cuanto a la expresión de receptores de interés para este trabajo, el tumor C4HD expresa RP y RE, carece de expresión de receptores de glucocorticoides y de EGFR (Molinolo *et al*, 1987; Elizalde *et al*, 1998).

## 3. Líneas celulares

La línea celular de cáncer de mama T47D fue adquirida a la *American Type Culture Collection* y fue mantenida en DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1, Sigma) + SFB 10% v/v. Esta línea expresa niveles muy altos de RP y muy bajos de receptor de glucocorticoides.

La línea celular T47D-Y (Keydar *et al*, 1979) fue donada por la Dra Horwitz (*University of Colorado. Health Sciences Center Denver*) y cultivada en las mismas condiciones que su línea parental (T47D) (Sartorius *et al*, 1994).

Se utilizó, además, la línea celular tumoral mamaria murina LM3. Esta línea tumoral deriva del adenocarcinoma mamario murino M3 perteneciente al modelo experimental desarrollado en el Hospital Angel H. Roffo, (Bal de Kier *et al*, 1986; Puricelli *et al*, 2002; Urtreger *et al*, 1997). Esta línea presenta un comportamiento altamente invasivo *in vitro* y 90-100% de incidencia de metástasis en pulmón cuando se inocula en ratones BALB/c. Es hormono-independiente y muestra indicios de pobre diferenciación.

Las células T47D, T47D-Y y LM3 se mantuvieron por repiques sucesivos una vez llegadas al 90% de confluencia aproximadamente. Las células se enjuagaron con solución de tripsina-EDTA estéril y se incubaron durante 2-15 minutos a 37°C con la cantidad de tripsina necesaria para cubrir el fondo. Cuando se despegaron, se las pasó a un tubo con 10ml de medio + 10% SFB que se centrifugó a 400 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio suplementado con 10% SFB. Finalmente, se sembraron en las placas correspondientes.

#### **4. Hormona**

El MPA (6 $\alpha$ -metil-17 $\alpha$ -hidroxi-acetato-progesterona) utilizado en los medios de cultivo fue de Sigma (Sigma, St. Louis, MO). Se preparó una solución madre 10mM (1000X de la solución de uso: 10 nM) en etanol absoluto, para su posterior dilución en medio de cultivo. La concentración final de etanol no excedió el 0,1 % v/v y no afectó ni el crecimiento ni la morfología celular (Dran *et al*, 1995). En los tratamientos *in vivo* se utilizó MPA (Medrosterona, Gador, Buenos Aires) en forma de depot (40 mg/ratón) gentilmente donado por laboratorios Gador.

#### **5. Medios de cultivo y suero fetal bovino**

Para el cultivo de células epiteliales C4HD, células T47D, T47D-Y y LM3, se utilizó DMEM/F12 sin rojo fenol con el agregado de sulfato de gentamicina en concentración de 50 mg/l y Bicarbonato de Sodio: 1,2 g/l. Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua hexadestilada. Se esterilizó por presión negativa utilizando filtros de acetato de celulosa de 0.22  $\mu$ m de poro (Corning, NY, USA)

El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido en Gen S.A. (Buenos Aires, Argentina) y se deplementó calentándolo a 56 °C durante 30 minutos. Para obtener el SFB adsorbido

de hormonas esteroideas o “charcolizado” (SFBch) se incubó el SFB ya de complementado con 5 % p/v de carbón activado durante 1 hora a 4°C en permanente agitación. Luego de la adsorción el suero se centrifugó 2 veces a 12000 rpm durante 20 minutos. Al sobrenadante se le adicionó 5 % p/v de carbón activado, se lo incubó durante toda la noche a 4°C con agitación y se realizaron centrifugaciones sucesivas hasta eliminar completamente el carbón. Una vez diluido al 10% v/v en el medio de cultivo, se esterilizó por filtración.

## 6. Soluciones utilizadas para los cultivos

Buffer Fosfato (PBS)

NaCl 8 g/l

KCl 0.2 g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/l

Solución enzimática: Disgregación tumoral

Tripsina (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) 0.25 % p/v

Colagenasa Tipo II (Gibco BRL) 0.25 % p/v o tipo IV (Sigma) (AE: 485 U/mg)

Albúmina sérica bovina (Sigma) 0.5 % p/v

Buffer fosfato salino (PBS).

Se esterilizó por filtración.

Solución de tripsina-EDTA

Para obtener células en suspensión a partir de cultivos primarios o de líneas celulares, se utilizó una solución de Tripsina (Gibco BRL) 0.25 % p/v + EDTA 0.02% p/v en PBS. Se esterilizó por filtración.

## 7. Cultivos celulares

Para realizar los cultivos primarios, los tumores C4HD se extirparon de los ratones en el flujo laminar aproximadamente a los 21 días de haber sido inoculados. Luego de una disgregación mecánica primero y enzimática después (2ml/solución enzimática por tumor), agitando durante 40 min a 37 °C y agregando al final medio + 10% de SFB, se obtuvo una suspensión compuesta por una población de estirpe epitelial y otra fibroblástica, que se separaron según la técnica de Pandis y col (Pandis *et al*, 1992) con algunas modificaciones.

Brevemente, esta técnica se basa en que la velocidad de sedimentación de las células epiteliales que forman agregados celulares es mayor que la de los fibroblastos, permitiendo su separación luego de varias decantaciones diferenciales. Para comenzar la purificación las células obtenidas luego de la disgregación se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en solución de lavado (DMEM/F12 + SFB 2 % v/v), dejando sedimentar durante 20 minutos; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados, el sobrenadante se descartó luego de cada decantación. Este procedimiento se repitió varias veces, aproximadamente 10, hasta que el sobrenadante se tornó translúcido. En la última decantación las células epiteliales se resuspendieron en medio de cultivo + SFB 10 % v/v y se sembraron en placas de cultivo.

Los cultivos primarios de células epiteliales se dejaron adherir durante 48 hs en medio + SFB 10% v/v luego de lo cual se reemplazó por medio fresco + SFBch 2,5% v/v + MPA 10 nM dejando a las células proliferar por otras 48 hs. Este medio de cultivo se cambió luego por medio + SFBch 0,1% v/v y se dejó 48 hs más. Las células se trataron por los tiempos indicados con medio + SFBch 0,1% v/v en presencia o ausencia de MPA 10 nM. En los casos en que se utilizó RU486 en presencia de MPA, las células se trataron con este antagonista desde 90 minutos antes del tiempo indicado de incubación con MPA.

Para bloquear la activación de la quinasa celular, c-Src, las células fueron tratadas desde 90 minutos antes de la incubación con MPA con 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) (Cell Signaling, Beverly, MA) (10  $\mu$ M, disuelto en DMSO). Se realizaron los controles pertinentes para verificar que el DMSO (1:2000) no modificó la fosforilación de c-Src inducida por MPA.

## 8. Ensayos de transfecciones transientes

En los experimentos cuyo objetivo fue evaluar la participación de Jak1 y Jak2 en los efectos del MPA sobre Stat3, las células C4HD y T47D fueron transfectadas de manera transiente con 2 $\mu$ g (por hoyo de placa de 6 pocillos) de un vector de expresión para la forma dominante negativa (DN) de Jak1 o de Jak2, ambos cedidos por el Dr O.Silvennoinen (*Tampere University Hospital, Finland*). Las células C4HD fueron transfectadas durante 48hs en DMEM-F12 + SFBch 2,5% v/v + MPA 10 nM, y las células T47D fueron transfectadas

durante 48hs en DMEM-F12 + SFB 10% v/v, siguiendo las indicaciones del fabricante para el uso del reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Biochemicals). Luego de la transfección, las células fueron cultivadas por 24hs en DMEM-F12 + SFBch 0,1% v/v antes del tratamiento con MPA10 nM por los tiempos indicados.

Para estudiar la participación de Stat3 en proliferación, las células C4HD fueron transfectadas con 2 $\mu$ g de un vector de expresión para la forma dominante negativa de Stat3, **Stat3Y705-F** (Bromberg *et al*, 1998; Kaptein *et al*, 1996; Li & Shaw, 2002), que lleva un residuo fenilalanina en vez de tirosina, en el aminoácido 705, reduciendo así la fosforilación de la proteína endógena salvaje, inhibiendo entonces la dimerización y la unión de Stat3 al ADN. Las células C4HD fueron también transfectadas con 2 $\mu$ g de un vector de expresión para una forma mutante constitutivamente activa de Stat3, **Stat3-C**, que contiene sustituciones de cisteínas en los residuos 661 y 663, lo que permite la formación de puentes sulfidrilos entre los monómeros de Stats, de esta manera la proteína dimeriza espontáneamente, se une al ADN y estimula la transcripción. (Bromberg *et al*, 1999). Ambos vectores nos fueron provistos por el Dr J. Darnell (*Rockefeller University, NY*).

Como control de especificidad de efecto de estas formas mutantes de Stat3, las células fueron transfectadas con igual masa del vector vacío pRc/CMV.

La eficiencia de transfección en las células C4HD se determinó transfectando con el vector pEGFP-N1 (BD Biosciences, Clontech, Palo Alto, CA), y determinando el porcentaje de células que exhibieron fluorescencia verde 24hs post transfección. La fluorescencia fue visualizada en un microscopio confocal Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY).

Para investigar la capacidad del MPA de inducir la activación transcripcional de Stat3, las células C4HD y T47D fueron transfectadas con 2 $\mu$ g de un vector reportero que contiene 4 copias de la secuencia de alta afinidad m67 (Bromberg *et al*, 1999; Zhang *et al*, 1999) clonada río arriba del gen de la luciferasa, junto con 1 $\mu$ g de un vector de expresión de  $\beta$ -galactosidasa, CMV- $\beta$ -gal, (Clontech, Palo Alto, CA), este último utilizado para corregir variaciones internas en las eficiencias de transfección. Como control, las células se transfectaron con un vector reportero pTATA-Luc que carece de la secuencia m67 (Zhang *et al*, 1999; Bromberg *et al*, 1999).

En los experimentos cuyo objetivo fue evaluar la participación de Jak1 y Jak2 en el efecto del MPA sobre la activación transcripcional de Stat3, las células fueron cotransfectadas con los vectores de expresión para DN Jak1 o DN Jak2, y la masa total de ADN transfectado fue estandarizada con la adición del vector reportero pTATA-Luc sin la secuencia m67. Las células fueron luego tratadas con DMEM-F12 + SFBch 0,1% v/v + MPA 10 nM, o con DMEM-F12 + SFBch 0,1% v/v + MPA 10 nM + RU486 10 nM, o pretratadas con el inhibidor de c-Src, PP2, y luego con MPA 10 nM por 48hs. Luego se las lavó una vez con PBS 1X, se las cosechó con un *scraper*, y se las lisó en la solución *Reporter Lysis Buffer* (Promega, Madison, Wis.) mediante un ciclo de congelado-descongelado en nitrógeno líquido. Las concentraciones de proteína fueron determinadas utilizando el kit Bio-Rad (Bio Rad, Hercules, CA). La actividad luciferasa fue determinada en un luminómetro 20<sup>n</sup>/20 (Turner Bio Systems, Sunnyvale, CA) e informada como la razón entre la actividad luciferasa y la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Se realizaron duplicados para cada tratamiento. La medición de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó incubando alícuotas idénticas de cada muestra con 100 $\mu$ l de orto-nitro-fenil- $\beta$ galactósido (ONPG) (4mg/ml) en un volumen final de 500 $\mu$ l a 28°C hasta aparición de una leve coloración amarilla. Luego se agregaron 250 $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M y se determinó la actividad de la enzima por una lectura en un espectrofotómetro a 405nm.

### 9. Bloqueo de la expresión de Stat3 *in vivo*

Células C4HD fueron transfectadas de manera transiente con el vector de expresión Stat3Y705-F o con el vector vacío pRc/CMV durante 48hs. Las células se cosecharon incubándolas 45 minutos con PBS-EDTA 1mM estéril, se resuspendieron en medio sin suero en una concentración de  $1 \times 10^6$  células/100 $\mu$ l y se inyectaron subcutáneamente en el flanco izquierdo del ratón utilizando una jeringa 25G (Terumo). En el flanco derecho se inoculó el pellet de MPA. Cuando los tumores se hicieron palpables, aproximadamente una semana después de la inoculación, se comenzó a medir el largo y ancho de los mismos con un calibre vernier 3 veces por semana. El volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) se calculó con la siguiente fórmula:  $(L \times W^2)/2$ , donde L=largo del tumor (mm), W=ancho del tumor (mm) (Leonetti *et al*, 1996). Se monitoreó el crecimiento tumoral por 21 días después de inoculadas las células. La velocidad de crecimiento se determinó como la pendiente de la

curva de crecimiento, la cual se obtuvo graficando el volumen tumoral vs tiempo. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se obtuvo dividiendo el volumen tumoral medio del grupo inoculado con células transfectadas con Stat3Y705-F por el volumen tumoral medio de cada grupo control, restando el resultado a 1 y multiplicándolo por 100. El retraso en el crecimiento tumoral se calculó como T-C, donde T y C son los tiempos que tardan, el grupo tratado con Stat3Y705-F y los controles, respectivamente, en alcanzar el mismo volumen medio (Leonetti *et al*, 1996).

En el día 21 del monitoreo, se sacrificaron los animales, se extrajeron los tumores y se procesaron los tejidos de la siguiente manera:

Una fracción del tumor se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para la obtención de extractos proteicos

Otra fracción del tumor se fijó en formalina 10%, para análisis histopatológicos.

Se tomaron muestras de hígado, pulmón y bazo y se fijaron para su posterior análisis histopatológico.

## **10. Análisis Histopatológicos**

Los tumores y los órganos se fijaron en formalina 10% neutralizada. Se embebieron en parafina, se cortaron secciones de  $5\ \mu\text{m}$  utilizando un micrótomo y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para observarlas luego en el microscopio, con la asistencia de un patólogo especializado. Se realizó un conteo mitótico, luego del cual se definieron tres categorías según el número de mitosis contadas en 10 HPF o Campos de Alto Poder (*High Power Field*,  $1\ \text{HPF}=0.152\ \text{mm}^2$ ) con un objetivo 40x. Siendo dichas categorías:

1: 0-5 mitosis por 10 HPF

2: 6-10 mitosis por 10 HPF

3:  $>10$  mitosis por 10 HPF

## **11. Obtención de extractos proteicos totales**

### **A. Tumores**

Los tumores se extirparon al final del tratamiento (día 21 post inoculación), se cortó un trozo de 100mg aproximadamente y se homogeneizó con un Ultraturrax en presencia de un buffer de extracción (Tris-HCl 50mM (pH: 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, glicerol 10% v/v, NP-40 1% v/v,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, SDS, 0.1% v/v, PMSF 0.4mM, NaF

25mM, leupeptina 5µg/ml, pepstatina 5µg/ml, aprotinina 5µg/ml, espermina 0.15mM, espermidina 0.5mM, β-Glicerofosfato 10mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM). El homogenato tumoral se incubó durante 10 min a 4°C con agitación intermitente y se centrifugó a 100000 g a 4°C durante 45 min en una ultracentrífuga. Se descartó el pellet y el contenido proteico del sobrenadante fue determinado de acuerdo al método de Lowry (LOWRY *et al*, 1951).

## **B. Células en cultivo**

Las células C4HD, T47D o LM3, tratadas como se indica en cada experimento, se recolectaron de las placas de cultivo utilizando un *scraper*. Se homogeneizaron en presencia de buffer de extracción. El homogenato celular se centrifugó a 13400 g a 4°C durante 30 min. Se descartó el *pellet* y el contenido proteico del sobrenadante fue determinado de acuerdo al método de Lowry.

### **12. Western Blot**

Los extractos proteicos obtenidos se prepararon como se describió previamente y se corrieron en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El extracto proteico (100-50-30µg de proteína) se diluyó en buffer de siembra 3x (Tris-HCl 60mM (pH: 6,8), SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, 0.7 M 2-Mercaptoetanol y azul de bromofenol 0,1% p/v) y se hirvió 3 min. Las muestras se corrieron en geles de 7,5-10% acrilamida-bisacrilamida según el peso molecular de la proteína a revelar. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,2µm, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) y se bloquearon 16 horas a 4°C con leche descremada 5% p/v o Albúmina Sérica Bovina fracción V (Sigma) 3% p/v en el caso de los anticuerpos anti-fosfotirosinas, ambos en PBS-tween 20 0.1% v/v. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos diluidos en PBS-Tween 20 0,1% v/v durante 2 hs. a temperatura ambiente y con agitación.

**Stat3** (C-20), Rabbit Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

**Fosfo-Stat3** (B-7), Monoclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

**Stat1** (E-23), Rabbit Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

**Fosfo-Stat1** (A-2), Monoclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

**Jak1** (HR-705), Rabbit Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

**Fosfo-Jak1** (Tyr 1022/Tyr 1023), Goat Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)  
**Jak2** (C-20), Rabbit Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)  
**Fosfo-Jak2** (Tyr1007/1008), Rabbit Polyclonal, (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)  
**c-Src** (N-16), Rabbit Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)  
**Fosfo-Src** (Tyr416), Rabbit Polyclonal, (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)  
**Anti-PI3-quinasa p85**, N-SH2, clone UB93-3, Monoclonal, (Upstate, Lake Placid, NY; USA)  
**Rb** (C-15), Rabbit Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)  
**Bcl-x<sub>L</sub>** (S-18), Rabbit Polyclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)  
**Anti-Flag M2**, Monoclonal, (Sigma, St Louis, MO; USA)  
**Actina** (Ab-5), Monoclonal, (Neomarkers, Fremont, CA; USA)  
**hPR** (Ab-7), Monoclonal, (Neomarkers, Fremont, CA, USA)  
Luego de 3 lavados de 10 min en PBS-Tween 20 las membranas se incubaron con los siguientes segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa (HRP):  
**Anti-Mouse:** (Vector, CA, USA)  
**Anti-Rabbit:** (Vector, CA, USA)  
**Anti-Goat:** (Vector, CA, USA)

Los membranas se revelaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL plus (Amersham Biosciences, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **13. Inmunoprecipitación: Análisis de la formación de heterodímeros**

A partir de extractos proteicos totales (500µg de proteína), obtenidos de los cultivos celulares de células C4HD, al final de cada tratamiento, se inmunoprecipitó al RP y a Stat3 para determinar por co-inmunoprecipitación el efecto del tratamiento sobre la formación del heterodímero RP/Stat3. 500µg de proteína se preclarearon con Proteína A-Agarosa o G-Agarosa (Sigma) y 2 µg de IgG (Sigma) de conejo o ratón, según corresponda, durante 30 min a 4 °C. Se utilizó proteína A cuando el anticuerpo a utilizar para inmunoprecipitar era una IgG de conejo o una IgG<sub>2a</sub> de ratón. La proteína G se utilizó siempre que se inmunoprecipitó con una IgG<sub>1</sub> de ratón. Luego de descartar el preclareado, centrifugando 10 min a 13400 g, el sobrenadante se inmunoprecipitó con 2 µg de los anticuerpos anti-RP

o anti-Stat3. Los inmunoprecipitados se incubaron 2 hs a 4 °C con agitación y los inmunocomplejos se capturaron agregando Proteína A-Agarosa o G-Agarosa según corresponda a la IgG utilizada para inmunoprecipitar, agitando 1 hora más. Para capturar las partículas de Agarosa la suspensión se centrifugó 10 min a 13400 g. El *pellet* se lavó tres veces con buffer de lisis, se hirvió 5 min en buffer de siembra y luego de una breve centrifugación se sembró el inmunoprecipitado en un gel 7,5 % para realizar un SDS-PAGE. Las proteínas se electrotransfirieron luego a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en PBS-Tween 20 0.1%v/v, con leche descremada 5% p/v, se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-RP (en el caso de la inmunoprecipitación de Stat3) durante 2 hs o con el anticuerpo polyclonal anti-Stat3 (en el caso de la inmunoprecipitación del RP), y luego con el anticuerpo secundario correspondiente. Las proteínas se visualizaron usando un sistema de revelado por quimioluminiscencia (ECL). Después de la primera revelada las membranas se incubaron 30 min a 50°C con solución de *stripping* (2-Mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% v/v, Tris-HCl 62,5mM pH: 6,7) para extraer los anticuerpos unidos a la misma. Luego de dos lavados con PBS-Tween, las membranas se bloquearon 16 horas en leche 5% p/v y se incubaron hasta el día siguiente, siguiendo el protocolo de *Western Blot* previamente descrito, con los anticuerpos utilizados originalmente para inmunoprecipitar, para verificar que las cantidades de proteínas inmunoprecipitadas fueran similares.

Como control negativo se usó suero normal de conejo y de ratón en vez de anticuerpo anti Stat3 y anticuerpo anti RP respectivamente.

#### **14. Preparación de extractos citosólicos y nucleares**

Las células C4HD pretratadas o no durante 90 minutos con el inhibidor de c-Src (PP2), y posteriormente tratadas o no con MPA 10nM durante 15 minutos, fueron recolectadas de las placas de cultivo utilizando un *scraper*. Se utilizó el kit NE-PER® de reactivos para extracción de las fracciones nucleares y citoplasmáticas según las indicaciones del fabricante. (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

### 15. Ensayos de corrimiento de movilidad electroforética (EMSA)

Células C4HD fueron incubadas o no durante 15 minutos a 37°C con MPA 10nM. Cuando se quiso investigar la participación del RP en la capacidad del MPA de inducir la unión de Stat3 a su elemento respondedor en el ADN, se pretrataron las células con RU486 10nM durante 90 minutos, antes del agregado de MPA 10nM.

Se usó como sonda ADN doble cadena conteniendo la mutante de alta afinidad del *sis-inducible element* (SIE) del promotor humano del gen *c-fos* (5'GTGCATTTCCCGTAAATCTTGTCTACA 3') (m67). También se utilizó como sonda, ADN doble cadena conteniendo al elemento  $\gamma$ -*activated sequence* (GAS) en el enhancer del gen de la  $\alpha 2$  macroglobulina (5'GATCCTTCTGGGAATTCCTAGATC 3'). El oligodeoxinucleótido fue marcado en el extremo 5' con  $\gamma$ [<sup>32</sup>P] y la T<sub>4</sub> polinucleótido quinasa hasta una actividad específica aproximada de 30000-50000 cpm / 0.1ng. 20  $\mu$ g de proteínas nucleares fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente en un volumen total de 30  $\mu$ l con 1 ng de [<sup>32</sup>P] m67. La mezcla de reacción también contenía de 2.5 $\mu$ g de poly(dI-dC), como un competidor inespecífico de la unión al ADN, en un buffer conteniendo Tris-HCl 10mM (pH : 7.4), NaCl 50mM, glicerol 10%, EDTA 1mM, KCl 80mM, gelatina 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l, PMSF 0.4mM, NaF 12mM, leupeptina 5 $\mu$ g/ml, pepstatina 5 $\mu$ g/ml, aprotinina 5 $\mu$ g/ml, espermina 0.15mM, espermidina 0.5mM,  $\beta$ -Glicerofosfato 10mM. La especificidad de los complejos fue estudiada por competencia con un exceso en 25 a 100 veces en masa, del mismo oligodeoxinucleótido sintético no marcado o de un oligodeoxinucleótido sintético m67 mutante con una sustitución TTC a CCA en la región de unión al ADN (5'GTGCATCCACCGTAAATCTTGTCTACA 3'). En los ensayos de supershift se preincubaron los extractos nucleares con los anticuerpos anti-Stat3 (C-20) X TransCruz o anti-Stat1 (E-23) X TransCruz en una concentración de 4 $\mu$ g/ $\mu$ l por ensayo. Como control se usó suero normal de conejo. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en geles de poliacrilamida 5.5% (30:1) en buffer de baja fuerza iónica TBE (Tris-Borato 10mM, pH: 7.5, EDTA 0.025mM). Antes de sembrar las muestras, los geles fueron precorridos durante una hora a 10mA/gel y luego de la siembra se corrieron a 20mA/gel durante 120 min a temperatura ambiente. Para prevenir el calentamiento de los mismos, las corridas se efectuaron con recirculación de

agua. Posteriormente, los geles fueron secados sin fijación con vacío y fueron autorradiografiados por exposición a películas Kodak X-OMAT a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **16. Microscopía confocal**

Células C4HD crecidas sobre cubreobjetos fueron incubadas en medio suplementado con SFBch al 0,1% v/v en presencia o ausencia de MPA 10nM durante 10 o 15 min. Las células fueron fijadas y permeabilizadas en metanol frío y fueron luego bloqueadas con PBS / 1%BSA a temperatura ambiente. Stat3 fue detectada con un anticuerpo polyclonal (C-20 Santa Cruz) seguido de incubación con un segundo anticuerpo IgG-Alexa 488, anti-conejo hecho en cabra (Molecular Probes, Eugene, OR). El RP fue detectado simultáneamente utilizando un anticuerpo monoclonal anti-RP (Ab-7 Neomarkers) seguido de incubación con un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con Rodamina (Jackson Laboratories). La colocalización de Stat3 y RP se denota por el color amarillo. Experimentos controles demostraron que no hay reactividad cruzada entre el segundo anticuerpo anti-ratón y el primer anticuerpo anti-conejo ni a la inversa. Tampoco hubo marca detectable con los segundos anticuerpos solos. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY), cuyo límite de resolución es de 300nm.

## **17. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

Cultivos primarios de células C4HD transfectadas con el vector de expresión Stat3Y705-F, o con Stat3-C, o con el vector vacío pRc/CMV se incubaron, luego de 24hs de sincronización en medio suplementado con SFBch al 0.1%, y luego fueron tratadas o no con MPA 10nM durante 48 hs. Se cosecharon para su análisis por citometría de flujo y se fijaron en etanol 70% por 24hs a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se lavaron 2 veces con PBS 1X, seguido de digestión del ARN (RNasa A a 50 U/ml) y tinción con Ioduro de Propidio (20  $\mu\text{g/ml}$ ) por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se analizaron en un citómetro FACScan (Becton Dickinson Mountain View, CA). Se indica el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular ( $G_0/G_1$  y  $S+G_2M$ ). El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa Modfit LT (BD).

### **18. Ensayos de apoptosis**

Cultivos primarios de células C4HD transfectados con el vector de expresión Stat3Y705-F, o con Stat3-C, o con el vector vacío pRc/CMV se trataron, luego de 24hs de sincronización, en presencia o ausencia de MPA 10nM durante 48hs. Se determinó el porcentaje de apoptosis a través de la unión de Annexina V (annexina conjugada con isotiocianato de fluoresceína) a la superficie celular (Immunotech).

### **19. Estadística**

La comparación del volumen tumoral entre los distintos grupos al día 21 se realizó utilizando una ANOVA seguida del test de Tuckey. Se realizaron regresiones lineales sobre las curvas de crecimiento y se calcularon las velocidades de crecimiento de los distintos tratamientos las cuales se compararon entre sí utilizando una ANOVA seguida de un test de paralelismo para evaluar la significancia estadística de las diferencias.

Las bandas obtenidas en los ensayos de *Western blot* se escanearon, y se midió la intensidad de cada una con el programa Image Quant. La significancia de las diferencias de intensidad entre dos tratamientos se analizó realizando un “t test” de muestras apareadas.

En los ensayos de transfección transiente, las diferencias entre los tratamientos se analizaron por ANOVA seguida del test de Tuckey.



# **REFERENCIAS**

- Aaronson,D.S. & Horvath,C.M. (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*, **296**, 1653-1655.
- Apter,D., Reinila,M., & Vihko,R. (1989) Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. *Int.J Cancer*, **44**, 783-787.
- Apter,D. & Vihko,R. (1983) Early menarche, a risk factor for breast cancer, indicates early onset of ovulatory cycles. *J Clin.Endocrinol.Metab*, **57**, 82-86.
- Balana,M.E., Labriola,L., Salatino,M., Movsichoff,F., Peters,G., Charreau,E.H., & Elizalde,P.V. (2001) Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene*, **20**, 34-47.
- Balana,M.E., Lupu,R., Labriola,L., Charreau,E.H., & Elizalde,P.V. (1999) Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene*, **18**, 6370-6379.
- Bal de Kier,J.E., Puricelli,L., & de Lustig,E.S. (1986) Modified adhesion behavior after in vitro passage of two related murine mammary adenocarcinomas with different metastasizing ability. *Invasion Metastasis*, **6**, 302-312.
- Ballare,C., Uhrig,M., Bechtold,T., Sancho,E., Di Domenico,M., Migliaccio,A., Auricchio,F., & Beato,M. (2003) Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol.*, **23**, 1994-2008.
- Bamberger,C.M., Schulte,H.M., & Chrousos,G.P. (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, **17**, 245-261.
- Beral,V. (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, **362**, 419-427.
- Bernstein,L. (2002) Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, **7**, 3-15.
- Bernstein,L. & Ross,R.K. (1993) Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol.Rev*, **15**, 48-65.
- Bjornstrom,L. & Sjoberg,M. (2002) Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol Endocrinol.*, **16**, 2202-2214.
- Boonyaratanakornkit,V., Scott,M.P., Ribon,V., Sherman,L., Anderson,S.M., Maller,J.L., Miller,W.T., & Edwards,D.P. (2001) Progesterone receptor contains

- a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell*, **8**, 269-280.
- Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A., & Jove, R. (2001) Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 7319-7324.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., & Jove, R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene*, **19**, 2474-2488.
- Bowman, T. & Jove, R. (1999) STAT Proteins and Cancer. *Cancer Control*, **6**, 615-619.
- Bromberg, J. & Darnell, J.E., Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, **19**, 2468-2473.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., & Darnell, J.E., Jr. (1999d) Stat3 as an oncogene. *Cell*, **98**, 295-303.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W., & Darnell, J.E., Jr. (1998) Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol.*, **18**, 2553-2558.
- Cao, X., Tay, A., Guy, G.R., & Tan, Y.H. (1996) Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol.*, **16**, 1595-1603.
- Castoria, G., Barone, M.V., Di Domenico, M., Bilancio, A., Ametrano, D., Migliaccio, A., & Auricchio, F. (1999) Non-transcriptional action of oestradiol and progesterin triggers DNA synthesis. *EMBO J*, **18**, 2500-2510.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S., & Jove, R. (1999a) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.*, **10**, 105-115.
- Cella, N., Groner, B., & Hynes, N.E. (1998) Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol.*, **18**, 1783-1792.
- Chlebowski, R.T., Hendrix, S.L., Langer, R.D., Stefanick, M.L., Gass, M., Lane, D., Rodabough, R.J., Gilligan, M.A., Cyr, M.G., Thomson, C.A., Khandekar, J., Petrovitch, H., & McTiernan, A. (2003) Influence of estrogen plus progesterin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA*, **289**, 3243-3253.
- Conneely, O.M., Maxwell, B.L., Toft, D.O., Schrader, W.T., & O'Malley, B.W. (1987) The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **149**, 493-501.

- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., & Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, **264**, 1415-1421.
- Dauer, D.J., Ferraro, B., Song, L., Yu, B., Mora, L., Buettner, R., Enkemann, S., Jove, R., & Haura, E.B. (2005) Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene*, **24**, 3397-3408.
- De Miguel, F., Lee, S.O., Onate, S.A., & Gao, A.C. (2003) Stat3 enhances transactivation of steroid hormone receptors. *Nucl.Recept.*, **1**, 3.
- Decker, T., Kovarik, P., & Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, **17**, 121-134.
- Dolled-Filhart, M., Camp, R.L., Kowalski, D.P., Smith, B.L., & Rimm, D.L. (2003) Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin.Cancer Res*, **9**, 594-600.
- Doppler, W. (1994) Regulation of gene expression by prolactin. *Rev Physiol Biochem.Pharmacol.*, **124**, 93-130.
- Dran, G., Luthy, I.A., Molinolo, A.A., Montecchia, F., Charreau, E.H., Pasqualini, C.D., & Lanari, C. (1995) Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res.Treat.*, **35**, 173-186.
- Elizalde, P.V., Lanari, C., Molinolo, A.A., Guerra, F.K., Balana, M.E., Simian, M., Iribarren, A.M., & Charreau, E.H. (1998) Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, **67**, 305-317.
- Epling-Burnette, P.K., Liu, J.H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J.M., Yang-Yen, H.F., Karras, J., Jove, R., & Loughran, T.P., Jr. (2001) Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin.Invest*, **107**, 351-362.
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., Laudano, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kraker, A., & Jove, R. (2001) Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, **20**, 2499-2513.
- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y., & Kim, J.D. (2000) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 4227-4232.

- Haslam,S.Z., Osuch,J.R., Raafat,A.M., & Hofseth,L.J. (2002) Postmenopausal hormone replacement therapy: effects on normal mammary gland in humans and in a mouse postmenopausal model. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, **7**, 93-105.
- Henderson,B.E. & Feigelson,H.S. (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21**, 427-433.
- Hofseth,L.J., Raafat,A.M., Osuch,J.R., Pathak,D.R., Slomski,C.A., & Haslam,S.Z. (1999) Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin.Endocrinol.Metab*, **84**, 4559-4565.
- Hsiao,J.R., Jin,Y.T., Tsai,S.T., Shiau,A.L., Wu,C.L., & Su,W.C. (2003) Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis. *Br.J Cancer*, **89**, 344-349.
- Hsieh,F.C., Cheng,G., & Lin,J. (2005) Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **335**, 292-299.
- Ismail,P.M., Amato,P., Soyak,S.M., DeMayo,F.J., Conneely,O.M., O'Malley,B.W., & Lydon,J.P. (2003) Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis--as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids*, **68**, 779-787.
- Kaptein,A., Paillard,V., & Saunders,M. (1996) Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J.Biol.Chem.*, **271**, 5961-5964.
- Keydar,I., Chen,L., Karby,S., Weiss,F.R., Delarea,J., Radu,M., Chaitcik,S., & Brenner,H.J. (1979) Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma.
- Labriola,L., Salatino,M., Proietti,C.J., Pecci,A., Coso,O.A., Kornblihtt,A.R., Charreau,E.H., & Elizalde,P.V. (2003) Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol.Cell Biol.*, **23**, 1095-1111.
- Li,L. & Shaw,P.E. (2002) Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J.Biol.Chem.*, **277**, 17397-17405.
- Liu,T. & Ogle,T.F. (2002) Signal transducer and activator of transcription 3 is expressed in the decidualized mesometrium of pregnancy and associates with the progesterone receptor through protein-protein interactions. *Biol.Reprod.*, **67**, 114-118.
- Kastner,P., Krust,A., Turcotte,B., Stropp,U., Tora,L., Gronemeyer,H., & Chambon,P. (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*, **9**, 1603-1614.

- Key, T.J. (1999) Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer*, **6**, 175-180.
- King, R.J. (1993) William L. McGuire Memorial Symposium. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.*, **27**, 3-15.
- Kordon, E.C., Molinolo, A.A., Pasqualini, C.D., Charreau, E.H., Pazos, P., Dran, G., & Lanari, C. (1993) Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between progestin dependence and morphology. *Breast Cancer Res. Treat.*, **28**, 29-39.
- Lanari, C., Kordon, E., Molinolo, A., Pasqualini, C.D., & Charreau, E.H. (1989) Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int. J. Cancer*, **43**, 845-850.
- Lanari, C., Molinolo, A.A., & Pasqualini, C.D. (1986a) Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.*, **33**, 215-223.
- Lanari, C., Molinolo, A.A., & Pasqualini, C.D. (1986b) Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 157-164.
- Lange, C.A., Richer, J.K., & Horwitz, K.B. (1999) Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol. Endocrinol.*, **13**, 829-836.
- Lange, C.A., Richer, J.K., Shen, T., & Horwitz, K.B. (1998) Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 31308-31316.
- Lechner, J., Welte, T., Tomasi, J.K., Bruno, P., Cairns, C., Gustafsson, J., & Doppler, W. (1997) Promoter-dependent synergy between glucocorticoid receptor and Stat5 in the activation of beta-casein gene transcription. *J Biol. Chem.*, **272**, 20954-20960.
- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev Immunol*, **16**, 293-322.
- Leonetti, C., D'Agnano, I., Lozupone, F., Valentini, A., Geiser, T., Zon, G., Calabretta, B., Citro, G.C., & Zupi, G. (1996) Antitumor effect of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on human melanoma cells in vitro and in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 419-429.
- Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y.B., Paz, K., Darnell, J.E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., & Bromberg, J. (2006) Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Research*, **66**, 2544-2552.

- Li,L. & Shaw,P.E. (2002) Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J Biol.Chem.*, **277**, 17397-17405.
- Li,X. & O'Malley,B.W. (2003) Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol.Chem.*, **278**, 39261-39264.
- LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., & RANDALL,R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Lucas,P.C. & Granner,D.K. (1992) Hormone response domains in gene transcription. *Annu.Rev Biochem.*, **61**, 1131-1173.
- Lydon,J.P., Sivaraman,L., & Conneely,O.M. (2000) A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, **5**, 325-338.
- Magnusson,C., Baron,J.A., Correia,N., Bergstrom,R., Adami,H.O., & Persson,I. (1999) Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progesterin-replacement therapy. *Int.J Cancer*, **81**, 339-344.
- Matsuda,T., Nakamura,T., Nakao,K., Arai,T., Katsuki,M., Heike,T., & Yokota,T. (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, **18**, 4261-4269.
- Migliaccio,A., Piccolo,D., Castoria,G., Di Domenico,M., Bilancio,A., Lombardi,M., Gong,W., Beato,M., & Auricchio,F. (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J*, **17**, 2008-2018.
- Molinolo,A.A., Lanari,C., Charreau,E.H., Sanjuan,N., & Pasqualini,C.D. (1987) Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J.Natl.Cancer Inst.*, **79**, 1341-1350.
- Moore,M.R., Conover,J.L., & Franks,K.M. (2000) Progestin effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **277**, 650-654.
- Mora,L.B., Buettner,R., Seigne,J., Diaz,J., Ahmad,N., Garcia,R., Bowman,T., Falcone,R., Fairclough,R., Cantor,A., Muro-Cacho,C., Livingston,S., Karras,J., Pow-Sang,J., & Jove,R. (2002) Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Research*, **62**, 6659-6666.
- Nagpal,J.K., Mishra,R., & Das,B.R. (2002) Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer*, **94**, 2393-2400.
- Neel,B.G. & Tonks,N.K. (1997) Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **9**, 193-204.

- Niu,G., Wright,K.L., Huang,M., Song,L., Haura,E., Turkson,J., Zhang,S., Wang,T., Sinibaldi,D., Coppola,D., Heller,R., Ellis,L.M., Karras,J., Bromberg,J., Pardoll,D., Jove,R., & Yu,H. (2002) Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, **21**, 2000-2008.
- Olayioye,M.A., Beuvink,I., Horsch,K., Daly,J.M., & Hynes,N.E. (1999) ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol.Chem.*, **274**, 17209-17218.
- Pandis,N., Heim,S., Bardi,G., Limon,J., Mandahl,N., & Mitelman,F. (1992) Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. *Genes Chromosomes.Cancer*, **5**, 14-20.
- Paukku,K., Valgeirsdottir,S., Saharinen,P., Bergman,M., Heldin,C.H., & Silvennoinen,O. (2000) Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 is mediated by PDGF beta-receptor and is not dependent on c-src, fyn, jak1 or jak2 kinases. *Biochem.J.*, **345 Pt 3**, 759-766.
- Pike,M.C. & Ross,R.K. (2000) Progestins and menopause: epidemiological studies of risks of endometrial and breast cancer. *Steroids*, **65**, 659-664.
- Pike,M.C. & Spicer,D.V. (2000) Hormonal contraception and chemoprevention of female cancers. *Endocr Relat Cancer*, **7**, 73-83.
- Puricelli,L., Proietti,C.J., Labriola,L., Salatino,M., Balana,M.E., Aguirre,G.J., Lupu,R., Pignataro,O.P., Charreau,E.H., Bal de Kier,J.E., & Elizalde,P.V. (2002) Heregulin inhibits proliferation via ERKs and phosphatidyl-inositol 3-kinase activation but regulates urokinase plasminogen activator independently of these pathways in metastatic mammary tumor cells. *Int.J Cancer*, **100**, 642-653.
- Ram,P.T., Horvath,C.M., & Iyengar,R. (2000) Stat3-mediated transformation of NIH-3T3 cells by the constitutively active Q205L Galphao protein. *Science*, **287**, 142-144.
- Ren,Z. & Schaefer,T.S. (2002) ErbB-2 activates Stat3 alpha in a Src- and JAK2-dependent manner. *J Biol.Chem.*, **277**, 38486-38493.
- Richer,J.K., Jacobsen,B.M., Manning,N.G., Abel,M.G., Wolf,D.M., & Horwitz,K.B. (2002) Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol.Chem.*, **277**, 5209-5218.
- Richer,J.K., Lange,C.A., Manning,N.G., Owen,G., Powell,R., & Horwitz,K.B. (1998) Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J Biol.Chem.*, **273**, 31317-31326.
- Ross,R.K., Paganini-Hill,A., Wan,P.C., & Pike,M.C. (2000) Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl.Cancer Inst.*, **92**, 328-332.

- Rowan,B.G. & O'Malley,B.W. (2000) Progesterone receptor coactivators. *Steroids*, **65**, 545-549.
- Salatino,M., Schillaci,R., Proietti,C.J., Carnevale,R., Frahm,I., Molinolo,A.A., Iribarren,A., Charreau,E.H., & Elizalde,P.V. (2004) Inhibition of in vivo breast cancer growth by antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor mRNA involves inactivation of ErbBs, PI-3K/Akt and p42/p44 MAPK signaling pathways but not modulation of progesterone receptor activity. *Oncogene*, **23**, 5161-5174.
- Sartorius,C.A., Groshong,S.D., Miller,L.A., Powell,R.L., Tung,L., Takimoto,G.S., & Horwitz,K.B. (1994) New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Research*, **54**, 3868-3877.
- Schaefer,L.K., Wang,S., & Schaefer,T.S. (2000) Oncostatin M activates stat DNA binding and transcriptional activity in primary human fetal astrocytes: low- and high-passage cells have distinct patterns of stat activation. *Cytokine*, **12**, 1647-1655.
- Schulze,H., Ballmaier,M., Welte,K., & Germeshausen,M. (2000) Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets. *Exp.Hematol.*, **28**, 294-304.
- Sherman,C.T. & Brasier,A.R. (2001) Role of signal transducers and activators of transcription 1 and -3 in inducible regulation of the human angiotensinogen gene by interleukin-6. *Mol Endocrinol.*, **15**, 441-457.
- Shuai,K. (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, **19**, 2638-2644.
- Silva,C.M. (2004) Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*, **23**, 8017-8023.
- Silvennoinen,O., Schindler,C., Schlessinger,J., & Levy,D.E. (1993) Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science*, **261**, 1736-1739.
- Sinibaldi,D., Wharton,W., Turkson,J., Bowman,T., Pledger,W.J., & Jove,R. (2000) Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*, **19**, 5419-5427.
- Socolovsky,M., Fallon,A.E., Wang,S., Brugnara,C., & Lodish,H.F. (1999) Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, **98**, 181-191.

- Starr,R., Willson,T.A., Viney,E.M., Murray,L.J., Rayner,J.R., Jenkins,B.J., Gonda,T.J., Alexander,W.S., Metcalf,D., Nicola,N.A., & Hilton,D.J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, **387**, 917-921.
- Stoecklin,E., Wissler,M., Schaetzle,D., Pfitzner,E., & Groner,B. (1999) Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. *J Steroid Biochem.Mol Biol.*, **69**, 195-204.
- Taga,T. & Kishimoto,T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu.Rev Immunol*, **15**, 797-819.
- Takeda,T., Kurachi,H., Yamamoto,T., Nishio,Y., Nakatsuji,Y., Morishige,K., Miyake,A., & Murata,Y. (1998) Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoid-nuclear receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid. *J Endocrinol.*, **159**, 323-330.
- Trichopoulos,D., MacMahon,B., & Cole,P. (1972) Menopause and breast cancer risk. *J Natl.Cancer Inst.*, **48**, 605-613.
- Turkson,J., Bowman,T., Adnane,J., Zhang,Y., Djeu,J.Y., Sekharam,M., Frank,D.A., Holzman,L.B., Wu,J., Sebt,S., & Jove,R. (1999) Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol.*, **19**, 7519-7528.
- Turkson,J., Bowman,T., Garcia,R., Caldenhoven,E., De Groot,R.P., & Jove,R. (1998) Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol.*, **18**, 2545-2552.
- Urtreger A., Ladeda V., Vidal M., Puricelli L., Lustig E., & Bal de Kier Joffé E. (1997) Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *International Journal of Oncology* **11**:489-496.
- Vultur,A., Cao,J., Arulanandam,R., Turkson,J., Jove,R., Greer,P., Craig,A., Elliott,B., & Raptis,L. (2004) Cell-to-cell adhesion modulates Stat3 activity in normal and breast carcinoma cells. *Oncogene*, **23**, 2600-2616.
- Wagner,B.J., Hayes,T.E., Hoban,C.J., & Cochran,B.H. (1990) The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J*, **9**, 4477-4484.
- Wang,T., Niu,G., Kortylewski,M., Burdelya,L., Shain,K., Zhang,S., Bhattacharya,R., Gabrilovich,D., Heller,R., Coppola,D., Dalton,W., Jove,R., Pardoll,D., & Yu,H. (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat.Med.*, **10**, 48-54.
- Watson,C.J. (2001) Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, **6**, 115-127.
- Wojcik,E.J., Sharifpoor,S., Miller,N.A., Wright,T.G., Watering,R., Tremblay,E.A., Swan,K., Mueller,C.R., & Elliott,B.E. (2006) A novel activating function of c-Src and Stat3 on HGF transcription in mammary carcinoma cells. *Oncogene*.

- Yu,H. & Jove,R. (2004) The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat.Rev Cancer*, **4**, 97-105.
- Zhang,X., Wrzeszczynska,M.H., Horvath,C.M., & Darnell,J.E., Jr. (1999) Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol.*, **19**, 7138-7146.
- Zhang,Z., Jones,S., Hagood,J.S., Fuentes,N.L., & Fuller,G.M. (1997) STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol.Chem.*, **272**, 30607-30610.
- Zhang,Y., Turkson,J., Carter-Su,C., Smithgall,T., Levitzki,A., Kraker,A., Krolewski,J.J., Medveczky,P., & Jove,R. (2000) Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J Biol.Chem.*, **275**, 24935-24944.