



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**EFFECTOS GENÓMICOS Y NO GENÓMICOS DEL
RECEPTOR DE PROGESTERONA EN CÉLULAS
DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD
DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA CIENCIAS BIOLÓGICAS

ROMINA PAULA CARNEVALE

DIRECTOR: DRA. PATRICIA V. ELIZALDE

CONSEJERO DE ESTUDIOS: DR. EDUARDO ARZT

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

BUENOS AIRES, 2007

Los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en:

Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways.

Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G, Edwards DP, Boonyaratanakonkit V, Charreau EH, Bal de Kier Joffé E, Schillaci R, Elizalde PV.

Mol. Endocrinol. 2007 Jun;21(6):1335-58.

<u>ABREVIATURAS</u>	8
<u>RESUMEN</u>	
Español	10
Inglés	13
<u>INTRODUCCION</u>	
Cáncer de Mama	16
Estructura de la Glándula Mamaria	16
Tipos de Cáncer de Mama	17
Factores de Riesgo	18
Tratamientos de Cáncer de Mama	20
Participación de las Hormonas Ováricas en el Desarrollo de la Glándula Mamaria	22
Progestágenos y Cáncer de Mama	24
Receptor de Progesterona	
Estructura y Dominios	26
Isoformas del Receptor de Progesterona	26
Mecanismos de Acción del Receptor de Progesterona	
Efectos Genómicos	28
Fosforilación, actividad transcripcional y degradación del receptor de Progesterona	30
Efectos No Genómicos	31
Modelos Experimentales	
Modelo Experimental de adenocarcinoma mamario murino Inducido por progestágenos (C4HD)	36
Línea Celular de Adenocarcinoma Mamario Murino Metastático (LM3)	37
Línea Celular de Adenocarcinoma Mamario Humana (T47D-Y)	38
Mutantes del Receptor de Progesterona	38
<u>OBJETIVOS GENERALES</u>	40

RESULTADOS**PARTE I**

MPA induce la rápida activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en células C4HD	43
La rápida activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt por MPA es mediada por el receptor de progesterona clásico	45
La rápida activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt por MPA es un efecto no genómico del receptor de progesterona	49
Expresión y actividad transcripcional del receptor de progesterona y la mutante C587A-RP	53

PARTE II

El bloqueo de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt inhibió la proliferación de las C4HD inducida por MPA	59
El MPA induce la proliferación de las LM3 y T47D-Y en forma independiente de la actividad transcripcional del receptor de progesterona: participación de las MAPKs y PI-3K/Akt	63
Expresión y actividad transcripcional de la mutante RP-BmPro	67
El MPA induce la supervivencia de las LM3 en forma independiente de la actividad transcripcional del receptor de progesterona	70

PARTE III

El MPA disminuye la actividad de proteasas involucradas en el proceso de invasión tumoral en células C4HD	73
El MPA regula la actividad de proteasas en forma independiente de la actividad transcripcional del receptor de progesterona	78
Efectos genómicos y no genómicos del receptor de progesterona en la regulación de la capacidad metastásica de las células LM3	80

DISCUSION**86**

<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	97
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	
Animales	101
Tumores	101
Hormona	101
Medios de cultivo y suero fetal bovino	102
Soluciones utilizadas para los cultivos	102
Cultivos primarios	103
Líneas celulares	104
Ensayos de proliferación	105
Transfecciones transientes	106
Ensayos de clonogenicidad	108
Obtención de extractos proteicos totales	108
Ensayos de Western Blot	109
Obtención de medios condicionados	110
Zimografías de MMPs y uPA	111
Ensayos de metástasis experimental	112
<u>REFERENCIAS</u>	115

AFs: Dominios de activación de la transcripción
Akt: también referida como proteína kinasa B (PKB)
DBD: Dominio de unión al DNA
DMEM/F-12: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ES: Error Standard
HRT: Terapia de reemplazo hormonal
LBD: Dominio de unión al ligando
MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MMPs: Metaloproteasas
MPA: Acetato de medroxiprogesterona
PBS: *Buffer* fosfato salino
PI-3K: Fosfatidil Inositol 3 quinasa
PRE: Elemento respondedor a progesterona
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*
SH3: Dominio *SRC homology3*
STATs: Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción
uPA: Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
WB: Western blot

EFFECTOS GENÓMICOS Y NO NOGENÓMICOS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Numerosas evidencias indican que los progestágenos están involucrados en el crecimiento y progresión de carcinomas mamarios. En el presente trabajo, se evaluaron los mecanismos moleculares de acción de los progestágenos en modelos de carcinoma mamario con diferentes fenotipos. Para ello se incluyeron en el estudio el modelo de carcinoma mamario murino C4HD, que expresa receptores de progesterona (RP) y de estrógeno (RE), en el cual los progestágenos inducen una respuesta proliferativa, la línea de carcinoma mamario murina LM3, que carece de RP y RE y es altamente invasiva y metastásica, y la línea de carcinoma mamario humana que no expresa el RP T47D-Y. Se ha demostrado que el RP es capaz de actuar tanto como factor de transcripción como activador de vías de señalización. Para determinar cuales de estas funciones están involucradas en las respuestas a progestágenos, se realizaron experimentos de reconstitución en las líneas negativas para el RP en las cuales se expresó la isoforma B de este receptor, la mutante C587A-RP, incapaz de unirse al DNA y la mutante RP-B-mPro que no es capaz de activar vías de transducción de señales. Independientemente de la presencia del RE, se demostró que el tratamiento con progestágenos indujo la proliferación celular, la regulación de la actividad de proteasas, como de las metaloproteasas 2 y 9 (MMP-9 y MMP-2) y del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), mediante la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en células que expresan el RP o la mutante C587A-RP. Sin embargo, el tratamiento con progestágenos no modificó el crecimiento de las células LM3 transfectadas con la mutante RP-BmPro. Por otra parte, se demostró que la expresión del RP en ausencia de ligando disminuyó significativamente la proliferación celular respecto a las células negativas para el RP. Este efecto resulta de la acción del RP tanto como factor de transcripción como activador de vías de señalización. Finalmente, demostramos por primera vez que los progestágenos inducen el desarrollo de metástasis de células de carcinoma mamario mediante efectos no genómicos del RP. Los resultados del presente trabajo proveen un mecanismo molecular y fisiológico para la utilización de terapias en las cuales bloqueando específicamente la interacción del RP con vías de señalización se podría inhibir el crecimiento y desarrollo de metástasis en tumores de mama que expresan el RP.

Palabras claves: cáncer de mama, receptor de progesterona, efectos genómicos y no genómicos, vías de señalización, proliferación, actividad de proteasas, metástasis

GENOMIC AND NONGENOMIC EFFECTS OF PROGESTERONE RECEPTOR IN BREAST CANCER CELLS

Accumulating evidence indicates that progestins are involved in controlling mammary gland tumorigenesis. Here, we assessed the molecular mechanisms of progestin action in breast cancer models with different phenotypes. We examined C4HD cells, an estrogen (ER) and progesterone (PR) receptor-positive murine breast cancer model in which progestins exert sustained proliferative response, the LM3 murine metastatic mammary tumor cell line, which lacks PR and ER expression, and human PR null T47D-Y breast cancer cells. Besides acting as a transcription factor, PR can also function as an activator of signaling pathways. To explore which of these two functions were involved in progestin responses, reconstitution experiments in the PR-negative models were performed with wild-type PR-B, with a DNA binding mutant C587A-PR, and with mutant PR-BmPro, which lacks the ability to activate cytoplasmic signaling pathways. We found that in a cell context either ER-positive or -negative, progestins induced cell growth and modulation of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) and-2 (MMP-2), and urokinase-type plasminogen activator (uPA) activities, via MAPK and PI-3K/Akt pathways, in cells expressing wild-type PR-B or DNA binding mutant C587A-PR. In contrast, in cells expressing mutant PR-BmPro, progestins did not induce growth. We also found that unliganded PR expression conferred breast cancer cells an *in vitro* less proliferative phenotype, as compared to cells lacking PR expression. Modulation of this behavior occurred when PR was functioning either as transcription factor or as signaling activator. Finally, we for the first time demonstrated that progestins favor development of breast tumor metastasis via PR function as activator of signaling pathways. Our present findings provide mechanistic support to the design of a novel therapeutic intervention in PR-positive breast tumors involving blockage of PR capacity to activate cytoplasmic signaling.

Key Words: Breast cancer, progesterone receptor, genomic and nongenomic effects, signalling pathways, cell proliferation, proteases activity and metastasis

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi directora la Dra. Patricia Elizalde por darme la oportunidad de formarme en su laboratorio, por su compromiso y dedicación para llevar adelante nuestro grupo de trabajo y por forjarnos como científicos día a día. A la Dra. Roxana Schillaci por su constante apoyo, cariño y ayuda generosa. A la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé por su gran colaboración, por sus consejos y aportes a nuestro trabajo. Al Dr. Charreau por habernos brindado todo su apoyo desde el CONICET. A Cinthia, Martín y Wendy por su compañerismo y cariño, por su amistad y por todos los momentos compartidos. A Marian, Vicky y Ceci por su constante apoyo y predisposición. A Merce y Celes por acompañarme en esta última etapa del doctorado. A mis compañeros vecinos, especialmente a Violeta, Ana Rosa, Ceci F., Petu y todos los chicos del lab 217 por los almuerzos y charlas compartidas. A Hilda por ser una gran compañera de ministerios y también por su cariño. A Alejandro y todos los chicos del Roffo por su constante ayuda con los experimentos in vivo. Al Dr. Molinolo y a la Dra. Frahm por su generosa colaboración. Al CONICET por brindarme el apoyo económico que hizo posible la realización de esta Tesis Doctoral. A la UBA por brindarme una excelente educación. A mis amigas de la facultad Dalia y Pao por acompañarme siempre. A mis amigas Anita, Juli, Naza, Alice, Sole, Male por ser parte de mi vida. Al Dr. Galdame y a todo su equipo de trabajo del Hospital Italiano, cirujanos, enfermeras, médicos clínicos y de todas las especialidades, por su capacidad profesional, su contención y su lucha incansable. A Diana por acompañar siempre a mi papá. Y quiero agradecer principalmente a mi mamá y a mi papá por haberme brindado todo su amor permitiéndome ser quien soy ahora, a Nati mi hermana, amiga y compañera del alma y a Mati, el amor de mi vida.

CÁNCER DE MAMA

El carcinoma mamario es el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres a nivel mundial (1). El *National Cancer Institute* (NCI) estima que a una de cada ocho mujeres se le diagnosticará cáncer de mama durante su vida y solo en los Estados Unidos habrá 178.480 nuevos casos y 40.460 muertes por esta enfermedad en el 2007. En la Argentina se calcula entre 15.000 y 18.000 nuevos casos por año siendo la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres de nuestro país (Atlas de Mortalidad por Cáncer en Argentina 1997-2001, Matos *et al*, 2003). Dada su altísima incidencia, la investigación en cáncer de mama es considerada prioritaria destinándose solo en Estados Unidos más de 550 millones de dólares al año (NCI-Fiscal Years 2005-2007).

ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La mama es una glándula de tipo tubuloalveolar compuesta y funciona bajo el control de hormonas hipofisarias, tiroideas, placentarias, adrenocorticales y ováricas. Está dividida en 15 o 20 lóbulos drenados por conductos galactóforos hacia el pezón (Figura 1).

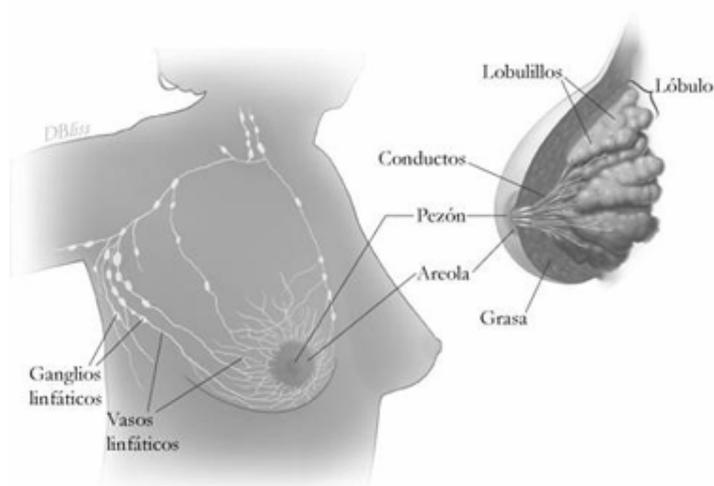


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria

Los lóbulos están constituidos por un sistema arbóreo de conductos y lobulillos rodeados de tejido conectivo, mientras que el estroma interlobular consta esencialmente de tejido adiposo y fibroso. Los alvéolos que conforman los lobulillos surgen de los

pequeños conductos durante el embarazo permitiendo la posterior producción de leche (Figura 2).

Además, la mama presenta numerosos vasos linfáticos, siendo el ganglio linfático axilar el que recibe alrededor del 75% del drenaje linfático mamario (Figura 1).

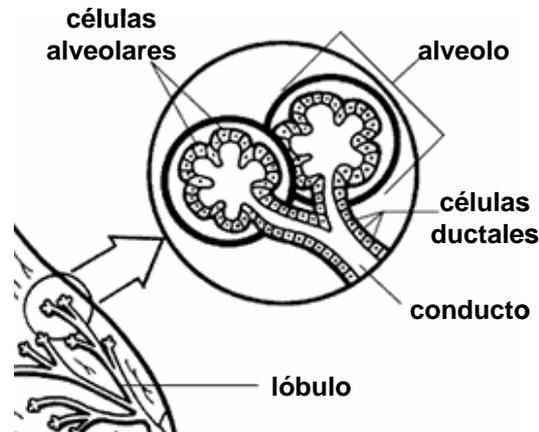


Figura 2. Estructura de los lobulillos y alvéolos mamarios

TIPOS DE CÁNCER DE MAMA

Los tumores mamarios se clasifican según su origen y su capacidad invasiva. Al ser un tejido glandular los tumores mamarios se denominan *adenocarcinomas*. Existen principalmente dos tipos de adenocarcinomas según su origen: *adenocarcinoma ductal* (se origina a partir de células epiteliales de los conductos mamarios) y *adenocarcinoma lobulillar* (se origina a partir de células epiteliales de los lóbulos). Cada uno de estos carcinomas a su vez es clasificado según su agresividad denominándose *in situ*, a los confinados al área de origen, e infiltrantes o invasivos, a los presentes más allá de los conductos o lóbulos (Figura 3).

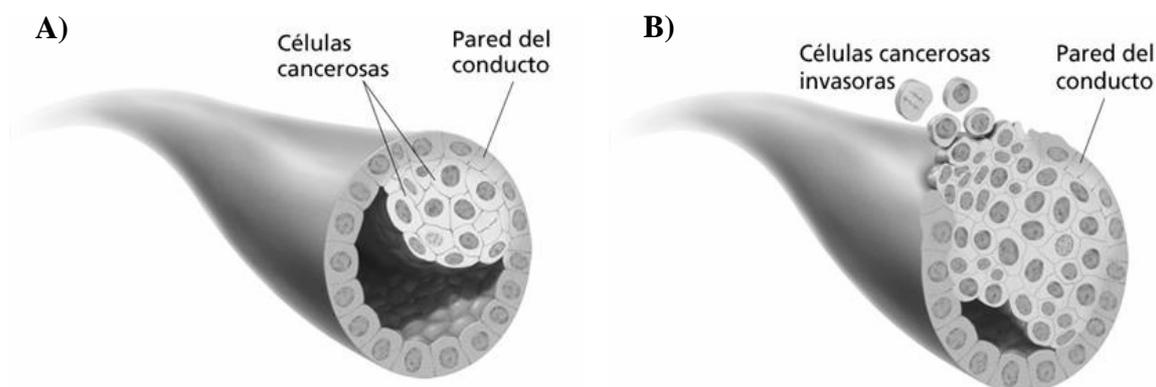


Figura 3. Carcinomas Ductales

A) carcinoma ductal *in situ*. B) carcinoma ductal invasivo

El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) es el más común de los carcinomas no invasores. Los CDIS corresponden junto con los carcinomas lobulillares *in situ* (CLIS) a un estadio temprano del desarrollo de un tumor mamario.

Alrededor del 80% de los tumores mamarios son carcinomas ductales invasivos o infiltrantes y solo entre el 10-15% son diagnosticados carcinomas lobulillares invasivos. Los carcinomas mamarios se estadifican de acuerdo al grado de diseminación y el tamaño del tumor siendo el estadio I el correspondiente a tumores de menos de 2 cm de diámetro y células que no invadieron mas allá del seno, llegando al estadio IV cuando existen metástasis en tejidos y órganos distantes. Los carcinomas mamarios invasivos forman metástasis en los ganglios linfáticos axilares para luego diseminarse mayormente hacia hueso, hígado, cerebro y en menor medida hacia pulmón (2-4).

FACTORES DE RIESGO

Existen numerosos factores asociados a un aumento en el riesgo relativo de padecer cáncer de mama. Entre los factores de riesgo no modificables se encuentran la edad (SEER *Cancer Statistics Review*, NCI, 2001), antecedentes familiares o personales de cáncer de mama (5), mutaciones en los genes BRCA1 y/o BRCA2 (6;7), edad del primer embarazo (8), menarca temprana (9;10) y menopausia tardía (11;12). Factores como la obesidad post-menopáusica (principal fuente de estrógenos), el uso de terapias de reemplazo hormonal, consumo de alcohol (13) e inactividad física (14;15) son

modificables y por lo tanto los principales puntos de prevención (*Breast Cancer Facts and Figures 2005-2006, American Cancer Society*).

La mayoría de los factores de riesgo están asociados a una exposición prolongada a hormonas ováricas a lo largo de la vida (16). Según datos epidemiológicos, experimentales y clínicos los esteroides sexuales están implicados en el desarrollo del cáncer de mama observándose la mayor tasa de incidencia de esta enfermedad durante los años reproductivos (16). En cada ciclo menstrual, los esteroides sexuales inducen la proliferación de las células ductales y alveolares permitiendo la acumulación de mutaciones somáticas y favoreciendo así la transformación y progresión neoplásica. Esta hipótesis se correlaciona con el incremento en la incidencia de cáncer de mama durante el período comprendido entre la menarca y la menopausia (16;17).

Tradicionalmente los estrógenos, dentro de las hormonas ováricas, eran considerados los responsables del aumento en la proliferación celular y, como consecuencia, del incremento en la incidencia de tumores de mama (18-21). Se asumió, además, que los progestágenos tenían un rol protector en la glándula mamaria al igual que el descrito para células endometriales (22;23). Sin embargo, se observó que la tasa proliferativa de células epiteliales mamarias es máxima durante la fase luteal del ciclo menstrual donde la progesterona alcanza la mayor concentración (24). Además, estudios epidemiológicos determinaron que el uso de anticonceptivos orales (conteniendo estrógenos y altas dosis de progestágenos) reduce la incidencia de cáncer de endometrio y ovario pero no la de cáncer mama (17).

Los indicios que muestran el rol proliferativo de los progestágenos en células del tejido mamario correlacionan con las estadísticas sobre la incidencia de cáncer de mama en mujeres que utilizan las terapias de reemplazo hormonal (HRT). Originalmente estas terapias consistían en la administración de estrógenos (*Estrogen Replacement Therapy, ERT*) para aliviar los síntomas de la menopausia y disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis. La gran popularidad de las ERTs, alcanzada en los Estados Unidos durante la década del 60 y principios de los 70, concluyó con las primeras demostraciones de la relación causal entre el cáncer de endometrio y la administración de estrógenos (25;26). De esta forma surgieron las HRTs combinadas de estrógenos más progestágenos, administrados de forma continua o secuencial, con el fin de proteger a las mujeres de los efectos carcinogénicos de los estrógenos sobre el endometrio (27). El análisis de la ecuación riesgo-beneficio para estas nuevas terapias determinó el papel preponderante de los progestágenos en el desarrollo del cáncer de

mama. Estudios epidemiológicos recientes determinaron que la adición de progestágenos, mayormente acetato de medroxiprogesterona (MPA), a las ERT aumenta de un 5% a un 30% el riesgo de padecer cáncer de mama al cabo de 5 años de uso (28-30). Además, la administración de progestágenos en las terapias combinadas produjeron un mayor aumento en la densidad del tejido mamario respecto a las terapias con estrógenos solos (31). Un estudio realizado por *The Women's Health Initiative* (32) con más de 16000 mujeres debió ser finalizado antes de lo previsto concluyendo que el uso de terapias combinadas aumenta el número de casos de cáncer de mama tanto *in situ* como invasivo, aumenta el tamaño tumoral e incrementa la frecuencia de mamografías anormales luego del primer año de uso. Por último, *The Million Women Study* realizado entre 1996 y el 2001 en Inglaterra determinó que las HRT combinadas no solo aumentan la incidencia de cáncer de mama sino que su uso disminuye la sensibilidad de las mamografías aumentando la posibilidad de un diagnóstico tardío y una detección en un estado más avanzado de la enfermedad (33).

TRATAMIENTOS DEL CÁNCER DE MAMA

El tipo de tratamiento a seguir luego del diagnóstico depende, entre otras cosas, del tamaño tumoral y el estadio de la enfermedad. El tratamiento puede ser local, como la cirugía y la radioterapia, o sistémico, como la quimioterapia, la terapia hormonal y la terapia biológica dirigida (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., NCI, *Cancer Facts & Figures 2007, American Cancer Society*).

Actualmente, la cirugía conservadora de seno y posterior radioterapia es el tratamiento más utilizado para mujeres con cáncer de mama en estadios I o II, teniendo una tasa de supervivencia equivalente a las mujeres que eligen una mastectomía total.

En las mujeres que presentan tumores con estadios más avanzados o tumores invasores, se extirpan algunos o todos los ganglios linfáticos axilares, junto con la cirugía del seno. En muchos casos se realiza la biopsia del ganglio centinela para disminuir los efectos secundarios de la cirugía total de los ganglios linfáticos axilares.

Las terapias sistémicas se utilizan mayormente como tratamiento adyuvante para controlar el crecimiento metastático o la recurrencia. La quimioterapia utiliza distintas combinaciones de drogas según cada caso, siendo las más utilizadas la doxorubicina, ciclofosfamida, paclitaxel, fluorouracilo, entre otras. En algunos casos, cuando los

tumores mamarios son muy grandes, se utiliza la quimioterapia como tratamiento neoadyuvante (previo a la cirugía) para reducir el tamaño tumoral y permitir una mejor extracción.

Las terapias hormonales se utilizan como tratamiento adyuvante y neoadyuvante en pacientes con tumores positivos para receptor de estrógeno (RE) y receptor de progesterona (RP). Dentro de las terapias hormonales pueden utilizarse cuatro agentes terapéuticos: drogas anti-estrogénicas, como el tamoxifeno, el raloxifeno y el fulvestrant; inhibidores de aromatasa que disminuyen la producción endógena de estrógenos, como anastrozol, letrozol y exemestan; agonistas de la hormona LH-RH; y progestágenos sintéticos como el MPA o el acetato de megestrol dada su acción antiestrogénica. La elección dependerá del estadio tumoral y de la etapa menopáusica en que se encuentre la paciente. Numerosos estudios clínicos determinaron que en las mujeres premenopáusicas el uso de tamoxifeno junto a agonistas LH-RH es el tratamiento más efectivo (34-36), mientras que los inhibidores de aromatasa probaron ser los mejores para mujeres postmenopáusicas (37;38). Estos tratamientos hormonales en muchos casos se combinan con distintos agentes quimioterapéuticos e incluso pueden ser utilizados como tratamiento preventivo en mujeres con una alta probabilidad de padecer cáncer de mama (39;40). Actualmente, se están realizando numerosos ensayos clínicos para determinar la mejor combinación y secuencia posible de drogas para mejorar la efectividad de los tratamientos (39;41).

Por último, las terapias biológicas dirigidas consisten en el uso de anticuerpos monoclonales e inhibidores farmacológicos y generalmente se usan en combinación con quimioterapia o terapias hormonales como tratamientos adyuvantes o neoadyuvantes. El trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal contra el receptor HER-2/neu perteneciente a la familia de receptores con actividad de tirosina quinasa que se encuentra sobreexpresado en numerosos tumores de mama y está involucrado en el crecimiento tumoral independiente de hormonas. Inhibidores farmacológicos del receptor de EGF (EGFR), como el gefitinib (Iressa), y de EGFR y HER-2/neu, lapatinib (Tykerb), al igual que el trastuzumab, son utilizados para el tratamiento de tumores con una alta expresión de estos receptores (42;43). Además, se utiliza el bevacizumab (Avastin) para inhibir la angiogénesis tumoral en pacientes con tumores de mama metastáticos.

PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS OVÁRICAS EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria presenta un desarrollo postnatal con múltiples ciclos de proliferación, diferenciación, apoptosis y remodelación durante la etapa reproductiva. Desde el nacimiento hasta la pubertad el crecimiento mamario es mínimo y proporcional al resto del cuerpo (crecimiento isométrico). El incremento de las hormonas ováricas durante la pubertad inicia la primera fase del crecimiento alométrico caracterizado por una rápida extensión y ramificación del sistema ductal. Una vez establecido el ciclo menstrual el aumento de la proliferación del epitelio mamario se produce en forma cíclica y asociado principalmente a la fase luteal. La segunda fase del crecimiento alométrico se inicia en el embarazo durante los primeros meses de gestación con un gran incremento en la actividad proliferativa ductal y desarrollo alveolar. En la última etapa de embarazo las células epiteliales completan su proceso de diferenciación iniciando la secreción de leche. Finalmente, al término del período de lactancia la glándula mamaria involuciona aproximadamente hasta el estado de desarrollo previo a la gestación (44-46).

El desarrollo de la glándula mamaria está dirigido por una interacción compleja entre hormonas ováricas, principalmente estrógeno y progesterona, y factores de crecimiento locales (47). Experimentos de detección *in situ* del receptor de progesterona y estrógeno (45;48), junto con experimentos de manipulación genética de la expresión de los receptores (49;50) y el uso de tecnologías de trasplante de glándula mamaria determinaron el rol esencial de estas hormonas en las distintas fases de crecimiento (51). Ratones *Knock-out* (KO) para el RE presentaron un epitelio mamario rudimentario típico de un fenotipo prepuberal demostrando la participación de los estrógenos en la proliferación y ramificación ductal temprana (50). La arquitectura y morfología ductal de la glándula mamaria de ratones KO para el RP es similar a la de ratones *wild type* adultos vírgenes observándose un desarrollo normal durante la etapa prepuberal hasta la adultez. Sin embargo, la ausencia del RP interrumpió completamente el desarrollo lóbulo-alveolar y la extensa ramificación ductal presente durante el embarazo (Figura 4) (49). Es importante destacar que la glándula mamaria de ratones KO para ciclina D1 presenta un fenotipo semejante al de ratones KO para el RP, indicando el rol de esta proteína en la regulación del crecimiento del epitelio mamario por progestágenos

(52;53). Estas evidencias, sumadas a numerosos análisis morfológicos y moleculares, demostraron que la progesterona es capaz de inducir tanto proliferación como diferenciación celular durante las diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria (46;54).

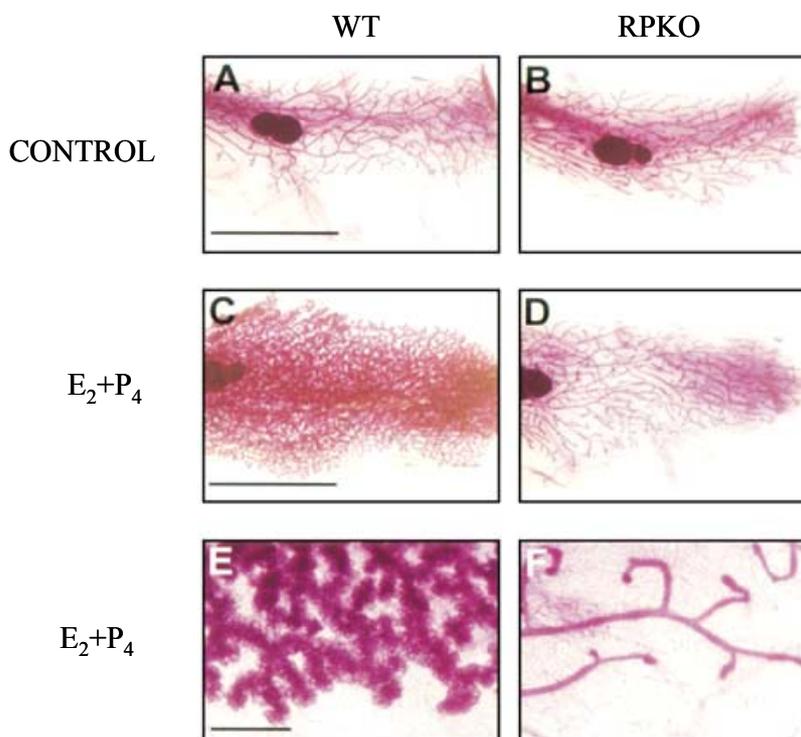


Figura 4. Morfología de la glándula mamaria en ratones KO para el RP.

La estructura de la glándula mamaria en hembras *wild type* (WT) adultas vírgenes (panel A) es similar a la de hembras KO para el RP (RPKO) (panel B). La barra del panel A es de 5mm. Luego del tratamiento con altas dosis de estrógeno y progesterona en hembras *wild type* (panel C) y en hembras KO para el RP (panel D) se observa la falta de ramificación y desarrollo lóbulo-alveolar en ausencia del receptor. Los paneles E y F muestran una magnificación de los paneles C y D respectivamente. La barra del panel E es de 500µm. Control: hembras vírgenes sin tratar, E₂: estradiol, P₄: progesterona (46).

Lydon y colaboradores (46;55) demostraron cambios en el patrón de distribución del RP en las distintas etapas del desarrollo de la glándula mamaria mediante experimentos de *Knock-in* de la construcción RP-LacZ (gen de LacZ río abajo del promotor del RP). Esta herramienta permitió determinar que el RP se expresa de forma exclusiva en las células epiteliales, donde se originan la mayoría de las transformaciones neoplásicas. La expresión del RP varía de un patrón mayormente uniforme en hembras jóvenes a uno no uniforme en hembras adultas. Este patrón discontinuo podría ser necesario para el correcto desarrollo de la glándula mamaria. En

la fase temprana de gestación durante el embarazo, se observó una segregación de las células positivas para el RP de las células en activa proliferación, indicando un efecto parácrino de la progesterona en el crecimiento del epitelio mamario. Esta organización espacial está altamente conservada en mamíferos determinando su importancia en la morfogénesis ductal. En base a estos hallazgos, se hipotetizó que alteraciones en la expresión del RP y por consiguiente de dicho efecto parácrino podría contribuir al desarrollo de carcinomas mamarios.

De acuerdo a las evidencias antes citadas, el rol de los estrógenos como únicos inductores de la tumorigénesis mamaria se encuentra en discusión. Actualmente, la participación de la progesterona en la iniciación y progresión del carcinoma mamario es uno de los aspectos centrales en el estudio del desarrollo de esta enfermedad.

PROGESTÁGENOS Y CÁNCER DE MAMA

Numerosos trabajos indican que los progestágenos están involucrados en la regulación de la tumorigénesis mamaria (56-60). En este sentido, O'Malley y colaboradores (60) observaron que ratones KO para el RP presentan una disminución significativa en la incidencia de carcinomas mamarios, demostrando el rol esencial de los progestágenos en la progresión y desarrollo del cáncer de mama. Los efectos de la progesterona en el crecimiento de las células de carcinoma mamario dependen del modelo experimental, del contexto celular, la duración del tratamiento y la presencia de estrógenos (56). En particular, se observó que los progestágenos son capaces tanto de mantener un crecimiento sostenido (57) como de inducir una primera ronda de proliferación seguida de un arresto en la fase G₁/S del segundo ciclo celular según lo observado en la línea celular de carcinoma mamario humana T47D (61). Horwitz y colaboradores (56) hipotetizaron que el pulso inicial de progesterona sensibiliza las células de carcinoma mamario arrestadas a la acción de diversos factores favoreciendo la proliferación o diferenciación celular. Este modelo sugiere que el comportamiento de las células tumorales mamarias resulta de la interacción entre las vías de señalización inducidas por factores de crecimiento/citoquinas y las vías de señalización inducidas por progesterona/RP.

En este sentido, numerosos trabajos demostraron la existencia de interacciones entre la progesterona/RP y la familia de receptores tirosina quinasa (RTKs) involucradas en los efectos proliferativos de esta hormona en células de carcinoma mamario (62-65). El crecimiento tumoral inducido por progestágenos involucra el aumento de la expresión de diversas proteínas del ciclo celular como ciclina D1, ciclina E, CDK2, p21^{WAF1/Cip1} y p27 (61;66-68). Lange *et al* (62;63) observó que la progesterona potencia los efectos del factor de crecimiento epidérmico (EGF) mediante el aumento en los niveles de los RTKs tipo I: EGFR, ErbB-2 y ErbB-3 y el aumento en la fosforilación de las proteínas quinastas activadas por mitógenos (MAPKs), y de las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción STAT5 y STAT3 inducida por EGF, favoreciendo así la proliferación de células T47D. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la heregulina (HRG), ligando de RTK tipo I, actúa como mediador del efecto proliferativo de los progestágenos en células de carcinoma mamario, a través de la activación de los RTKs ErbB-2 y el receptor del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-IR) (69;70). A su vez, la heregulina es capaz de activar el RP mediante un mecanismo que requiere ErbB-2 funcional y la activación de la vía de las MAPKs (64). Además, demostramos la existencia de una interacción bidireccional del RP con la vía de las STATs, donde los progestágenos inducen la actividad transcripcional de STAT3 y a su vez la activación de esta quinasa es necesaria para la proliferación de células de carcinoma mamario inducida por progestágenos (62-64;71).

Si bien se ha demostrado el rol de la progesterona en la supervivencia y proliferación de células de cáncer de mama, los mecanismos moleculares que median los efectos de esta hormona en el crecimiento y progresión tumoral aún no han sido determinados. Por otra parte, la presencia del RP en tumores mamarios está asociada a una mejor respuesta al tratamiento hormonal y es considerado un factor de mejor pronóstico, dando cuenta de la complejidad del rol del RP en el carcinoma mamario (60;72;73).

RECEPTOR DE PROGESTERONA

ESTRUCTURA Y DOMINIOS

El RP, miembro de la superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligando, media los diversos efectos biológicos de la progesterona. Es una proteína modular que presenta los tres dominios estructurales característicos de los receptores nucleares: el dominio N-terminal, el dominio central de unión al DNA (DBD) y el dominio carboxilo terminal de unión al ligando (LBD) (Figura 5). Dentro de estos módulos hay por lo menos dos dominios de activación de la transcripción (AFs). El dominio de activación ligando independiente AF-1 se encuentra en el dominio N-terminal y el dominio AF-2 dependiente de ligando está presente en el LBD (Figura 5). El DBD contiene dos clásicas estructuras de dedos de Zn^{2+} que le permiten la unión al DNA junto con regiones necesarias para la dimerización del receptor. Tanto el LBD como el DBD se encuentran altamente conservados entre los miembros de la familia de los receptores nucleares, mientras que el dominio N-terminal presenta una gran variabilidad en la longitud y en la secuencia (74;75).

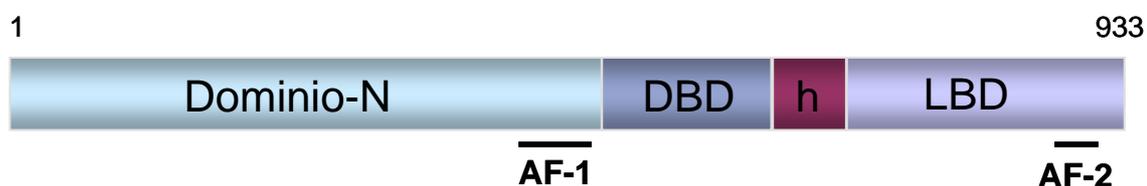


Figura 5. Esquema de los dominios del RP humano.

Dominio N-terminal, DBD: Dominio de unión al DNA, LBD: Dominio de unión al Ligando, AF-1 y AF-2: Dominios de Activación Transcripcional.

ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

El RP se expresa en dos isoformas mediante la transcripción a partir de dos promotores presentes en el mismo gen (76) o con el inicio de la traducción a partir de sitios alternativos presentes en un mismo ARN mensajero (77). El receptor de progesterona B, RP-B (120kDa), presenta en el extremo N-terminal 164 aminoácidos más que el RP-A (94kDa) (Figura 6). Ambas isoformas poseen DBD y LBD similares,

diferenciándose en su actividad transcripcional. El RP-B presenta un tercer dominio de activación de la transcripción (AF-3) en los primeros 164 aminoácidos siendo un activador transcripcional diez veces más fuerte que la isoforma A (Figura 6) (75;78;79). En determinados tipos celulares, el RP-A es capaz de actuar como dominante negativo ligando-dependiente de receptores esteroideos, como el RP-B y el RE, inhibiendo la transcripción de diversos genes (78;79).

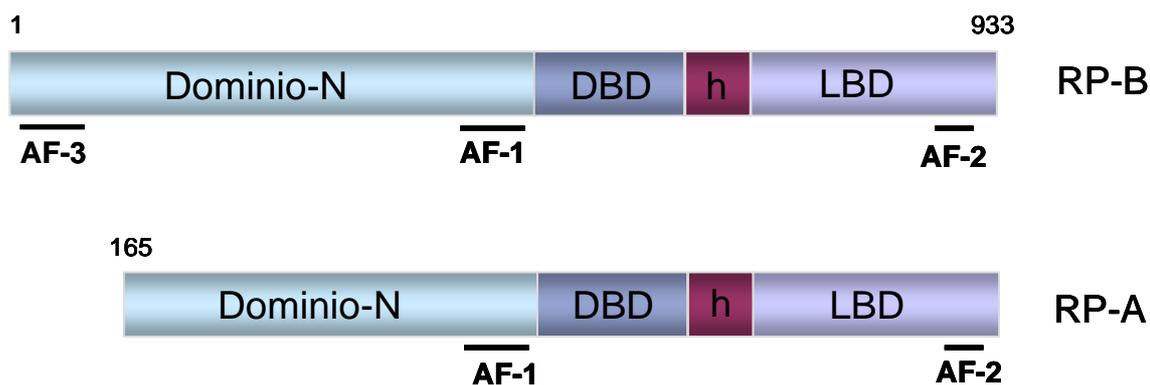


Figura 6. Isoformas del RP humano.

Estructura del RP-B y del RP-A. La isoforma B posee 164 aminoácidos más que la isoforma A y en el dominio N-terminal contiene un tercer dominio de activación (AF-3) que le confiere una mayor actividad transcripcional.

En la glándula mamaria, la expresión de ambas isoformas en iguales proporciones es necesaria para su correcto desarrollo y diferenciación (80). La sobreexpresión de la isoforma A produce hiperplasia del epitelio mamario y desorganización de la membrana basal, mientras que la sobreexpresión del RP-B provoca alteraciones en la diferenciación y desarrollo lóbulo-alveolar (81;82).

Las cantidades relativas de RP-A y RP-B se encuentran alteradas en la mayoría de los tumores mamarios. Numerosos trabajos demostraron que dichas alteraciones son un evento temprano en el proceso de carcinogénesis mamaria y aumentan con el progreso de la enfermedad (80;83). Horwitz y colaboradores (72;73), mediante el uso de microarrays en células de carcinoma mamario humanas negativas para el RP T47D-Y transfectadas en forma estable con el RP-A o el RP-B, demostraron que cada una de estas isoformas es capaz de regular diferencialmente la expresión génica. A pesar de que la mayoría de estos genes son modulados por acción de la progesterona, existe un porcentaje regulado por efectos ligando independiente que favorecen el crecimiento, la migración, adhesión e invasión tumoral. Es importante destacar que la mayoría de los

efectos ligando dependiente son mediados por el RP-B mientras que los efectos en ausencia de ligando dependen principalmente de la isoforma A (72;73). Además, se demostró que un 70% de los tumores mamarios metastáticos presentan un exceso de RP-A respecto de RP-B, asociando a la isoforma A con un fenotipo más agresivo y de peor pronóstico (83).

MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

EFFECTOS GENÓMICOS

El camino clásico de regulación de la transcripción génica por progestágenos a través del RP ha sido ampliamente caracterizado. En ausencia de ligando, el RP puede estar presente tanto en el citosol como en el núcleo y se encuentra asociado a un complejo de proteínas chaperonas como las proteínas de shock térmico *hsp70* y *hsp90*. Luego de la interacción con su ligando, el RP sufre cambios conformacionales que promueven la disociación del complejo multiproteico de chaperonas, translocación al núcleo, homodimerización y unión específica a elementos respondedores a progesterona (PRE) presentes en el promotor de los genes blanco (Figura 7). Dichos elementos son secuencias consenso que consisten en repeticiones invertidas separadas por tres nucleótidos. El RP junto con el receptor de glucocorticoides (RG), el de andrógenos (RA) y el de mineralocorticoides se unen a la misma secuencia consenso: AGAACAnnnTGTTCT a través de sus DBD (84).

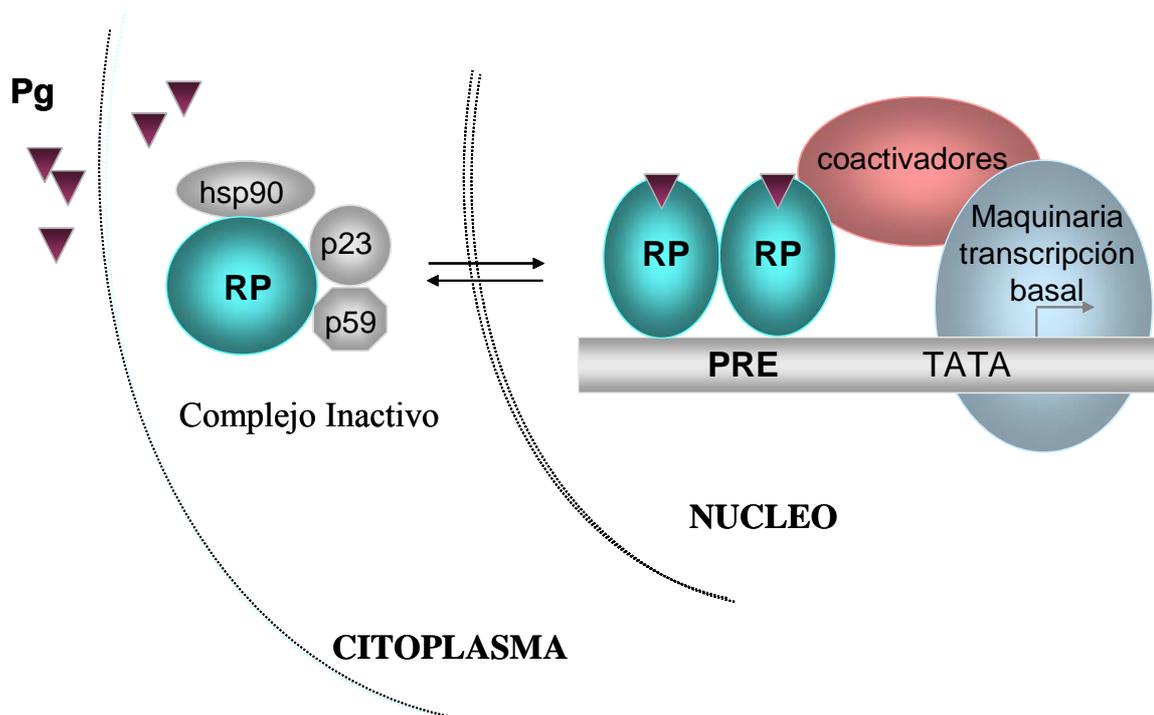


Figura 7. Mecanismo clásico de acción del RP.

La unión del ligando al complejo inactivo RP-proteínas chaperonas induce cambios conformacionales que promueven la disociación del complejo multiproteico, translocación al núcleo, homodimerización y unión específica a elementos respondedores a progesterona (PRE) presentes en el promotor de los genes blanco. Al dímero activo se le unen coactivadores y la maquinaria basal de transcripción regulando así la expresión génica.

Los receptores unidos al DNA son capaces de aumentar o disminuir la transcripción génica regulando el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción. Mediante la interacción con coactivadores o correpresores promueven la remodelación de la cromatina en promotores específicos, facilitando o reprimiendo el acceso y actividad de la maquinaria transcripcional (Figura 8). La interacción diferencial con coreguladores transcripcionales es uno de los mecanismos propuestos para explicar las diferencias en las respuestas biológicas de los receptores nucleares que se unen a los mismos elementos respondedores. En el caso del RP, O'Malley y colaboradores (85;86) determinaron que luego de la unión del ligando, el receptor es capaz de unir preferentemente miembros de la familia de coactivadores de receptores esteroideos tipo 1 (SRC-1) que a su vez unen la histona acetiltransferasa (HAT) CBP resultando en la acetilación en la lisina 5 de la histona H4. Se observó, además, que las cantidades relativas de coactivadores y correpresores regulan los efectos agonistas/antagonistas de determinados moduladores del RP como el RU486 (87).

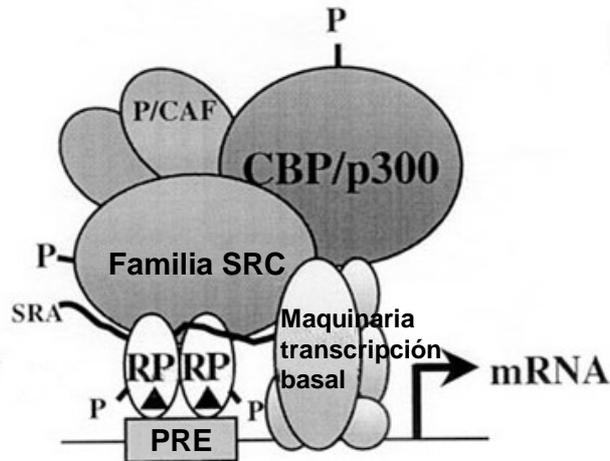


Figura 8. Interacción del RP con coreguladores transcripcionales.

Una vez unido a su elemento respondedor, el RP es capaz de interactuar con miembros de la familia SRC y reclutar histona acetiltransferasas como CBP/p300 permitiendo el acceso al promotor y la estabilización de la maquinaria basal de transcripción.

FOSFORILACIÓN, ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL Y DEGRADACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

Los miembros de la familia de receptores esteroideos presentan un nivel basal de fosforilación que aumenta sensiblemente en presencia del ligando. En particular, se ha descrito que el RP contiene al menos 13 sitios de fosforilación en serina presentes en el dominio N-terminal (88). La mayoría de estos sitios contiene motivos Ser-Pro los cuales se sabe, son secuencias consenso para quinasas como las Cdk2 y las MAPKs. En este sentido, Weigel y colaboradores demostraron que la quinasa Cdk2 es capaz de fosforilar a las Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰ y Ser⁴⁰⁰, identificadas como sitios de fosforilación basal del RP (89). Entre los sitios inducidos en presencia de ligando se encuentran las Ser¹⁰², presente exclusivamente en el RP-B, y las Ser²⁹⁴ y Ser³⁴⁵ presentes en ambas isoformas (90) (Figura 9).

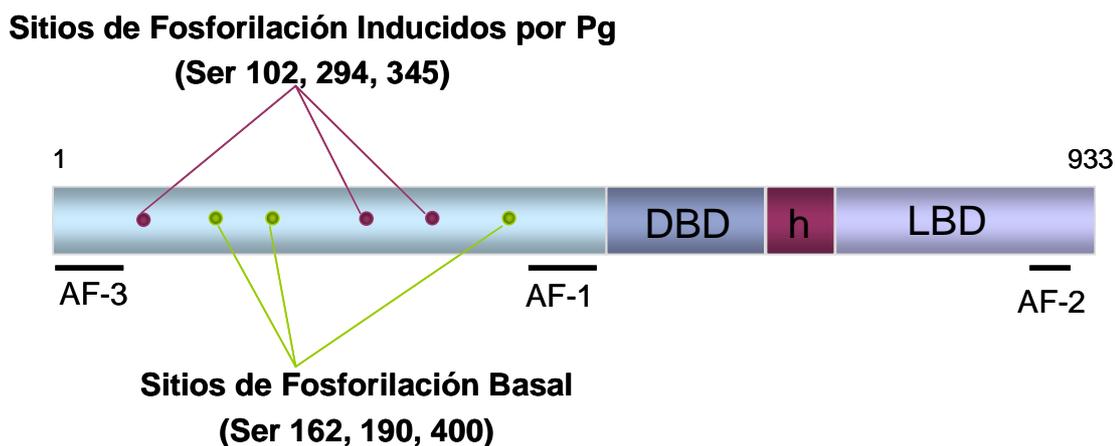


Figura 9. *Sitios de fosforilación del RP*

Alrededor de 13 residuos de serina y uno de treonina representan tanto los sitios de fosforilación basal como los sitios inducidos en presencia del ligando. La fosforilación del RP está mediada por diversas quinasas como las Cdk2 (sitios constitutivos) y las MAPKs (sitios inducibles). En la figura se muestran los sitios de fosforilación más estudiados.

Numerosos trabajos demostraron que la fosforilación del RP es un importante mecanismo de regulación de su función. En particular, se demostró que la fosforilación inducida por ligando en Ser²⁹⁴ está mediada por acción de las p42/p44 MAPKs y es necesaria para la posterior exportación nuclear, ubiquitinación y degradación citoplasmática mediante el proteasoma 26S en células de carcinoma mamario T47D (91;92). Además, Lange y colaboradores determinaron que la actividad transcripcional del RP se encuentra asociada a la fosforilación en Ser²⁹⁴ demostrando el rol de las MAPKs tanto en la estabilidad como en la funcionalidad del RP (93).

EFFECTOS RÁPIDOS NO GENÓMICOS

Tradicionalmente, se ha descripto que las hormonas esteroideas son responsables de numerosos efectos fisiológicos mediante la modulación directa de la transcripción génica. A pesar de la observación temprana de diversas respuestas rápidas a los esteroides, los efectos no genómicos fueron aceptados recién en los últimos años. Las respuestas rápidas inducidas por las hormonas esteroideas fueron observadas en distintos tejidos y especies incluyendo los efectos de la aldosterona en el flujo de calcio de linfocitos y células musculares (94), la acción de la vitamina D3 en los niveles de

GMPC de fibroblastos (95), el aumento de AMPc en células mamarias inducido por estrógenos (96), la rápida acción de los progestágenos en el flujo de calcio durante la maduración de oocitos (97) y la reacción acrosomal de los espermatozoides (98), entre otros.

Los efectos no genómicos de las hormonas esteroideas son aquellos que ocurren en forma rápida, a partir de los primeros segundos o minutos luego del tratamiento hormonal y son independientes de la transcripción y síntesis proteica (99). Esta rápida acción desencadena una serie de eventos a corto plazo, como la activación de vías de transducción de señales, y efectos fisiológicos a largo plazo como la progresión del ciclo celular y proliferación (78).

Desde la aceptación de los efectos no genómicos inducidos por las hormonas esteroideas se han buscado receptores que den cuenta de las respuestas rápidas observadas. Dependiendo del tipo de hormona y la respuesta específica de cada tejido o célula, existen diferentes receptores y mecanismos involucrados en los efectos no genómicos de las hormonas esteroideas. La identidad de dichos receptores generó una gran controversia entre los investigadores. Algunos, como M. Wehling y colaboradores, afirman la existencia de receptores de membrana con características estructurales y funcionales diferentes a los receptores nucleares clásicos ya descritos (100-103); mientras que existen aquellos investigadores que apoyan la teoría de la presencia de los mismos receptores clásicos en la membrana celular (104-106). En particular, se han descrito diversas proteínas presentes en la membrana celular capaces de unir progestágenos. White y colaboradores determinaron que la proteína P4BP (*P4-binding protein*) de 60kDa presente en la membrana de células de granulosa inhibe la apoptosis celular mediante la activación de las MAPKs luego del tratamiento con progestágenos (107;108). Por otra parte, Wehling y colaboradores purificaron y caracterizaron, a partir de membrana de células de hígado porcino, una proteína de 200kDa formada por subunidades de 28kDa y 56kDa capaz de unir progesterona con una alta afinidad e inducir la liberación de calcio de células hepáticas (109). Thomas y colaboradores en el año 2003 clonaron, a partir de DNAc de células ováricas de trucha marina, un RP de membrana de 40kDa que se expresa en tres isoformas α , β y γ en diversos tejidos como el reproductor, nervioso y digestivo (110;111). Las características estructurales de esta proteína difieren completamente del RP clásico, siendo un miembro de la familia de proteínas de siete pasos transmembrana acoplada a proteína G (GCPR) (110;111). Cabe destacar que el GCPR no es capaz de unir progestágenos sintéticos y que la presencia de

antiprogéstágenos normalmente utilizados para bloquear la acción del RP clásico no produce ningún efecto en la función del receptor de membrana.

Un claro ejemplo de la presencia del RP clásico en la membrana celular como mediador de los efectos no genómicos de los progéstágenos, es el receptor descrito por Ferrell y colaboradores presente en los oocitos de *Xenopus* (X-PR) (112). Alrededor de un 5% del X-PR clásico se encuentra en la membrana celular y es capaz de asociarse a las vías de p42 MAPK y PI-3K induciendo la maduración de los oocitos (106).

Finalmente, los efectos no genómicos de las hormonas esteroideas pueden ser mediados por una subpoblación del mismo RP clásico capaz de interactuar con vías de transducción de señales en el citosol, desencadenando efectos rápidos luego de la interacción con el ligando. La activación de vías de transducción de señales puede, en última instancia, regular la expresión génica en la célula. Dependiendo, entonces, de la acción genómica o no genómica de los receptores esteroideos, se activarán distintos patrones génicos dando diversas respuestas biológicas (113).

Auricchio y colaboradores demostraron por primera vez que los progéstágenos activan en forma rápida la vía Src/p21^{ras}/MAPKs a través del RP clásico en células de carcinoma mamario T47D (114). Ballaré y colaboradores determinó que la activación de la tirosina quinasa c-Src por el RP ocurre en forma indirecta, mediante la interacción de los dominios ERID-I y ERID-II presentes en el dominio N-terminal del RP con el LBD del RE (115). Este último, a su vez, interacciona con c-Src mediante la unión de los dominios SH2 de la quinasa y el residuo tirosina 537 del RE (115). Sin embargo, los trabajos de Edwards y colaboradores determinaron una interacción directa entre el RP y la familia de quinastas c-Src (116). La presencia del sitio rico en prolinas, PPPPLPPR, presente entre los aminoácidos 421-428 del dominio N-terminal del RP le permite interactuar con dominios SH3 de proteínas de la familia c-Src activando en forma rápida la vía Src/MAPKs luego del tratamiento con progesterona (Figura 10) (116). Esta activación ocurre fuera del núcleo y es inducida solo por la isoforma B del RP debido a la distribución principalmente nuclear que presenta el RP-A (68). Las discrepancias observadas podrían explicarse por la formación de diferentes complejos dependiendo de la presencia de diversas moléculas adaptadoras y transductoras de señales (117).

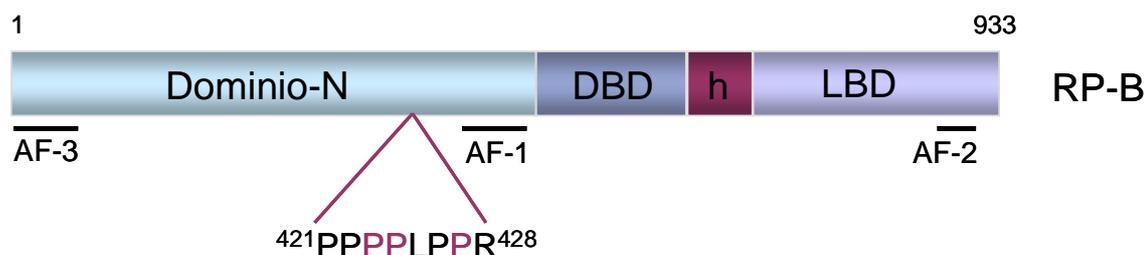


Figura 10. Dominio rico en prolinas del RP

El sitio rico en prolinas presente entre los aminoácidos 421-428 del dominio N-terminal del RP presenta una secuencia del tipo XPPLPXR característica de los ligandos clase II de los dominios SH3 de la familia de proteínas tirosina quinasa c-Src.

La activación rápida de vías, como mencionamos más arriba, regula la expresión de genes involucrados en diversas respuestas biológicas (Figura 11). En particular, se determinó la participación de estas vías en la proliferación de las células de carcinoma mamario T47D inducida por progestágenos, sugiriendo la regulación del crecimiento tumoral mediante efectos no genómicos del RP (118). En este sentido, Lange y colaboradores demostraron que, en células T47D-Y transfectadas con la mutante S294-RP (incapaz de ser fosforilada por MAPKs), los progestágenos estimulan la expresión de ciclina D1 y la entrada en fase S del ciclo mediante la activación de la vía de las MAPKs y en forma independiente de la actividad transcripcional del RP (66;119). En este sentido, en nuestro laboratorio demostramos que la rápida activación de STAT-3 por progestágenos induce el crecimiento de células de carcinoma mamario murino mediante un mecanismo dependiente de la activación de las quinasas Janus (Jaks) y c-Src (71).

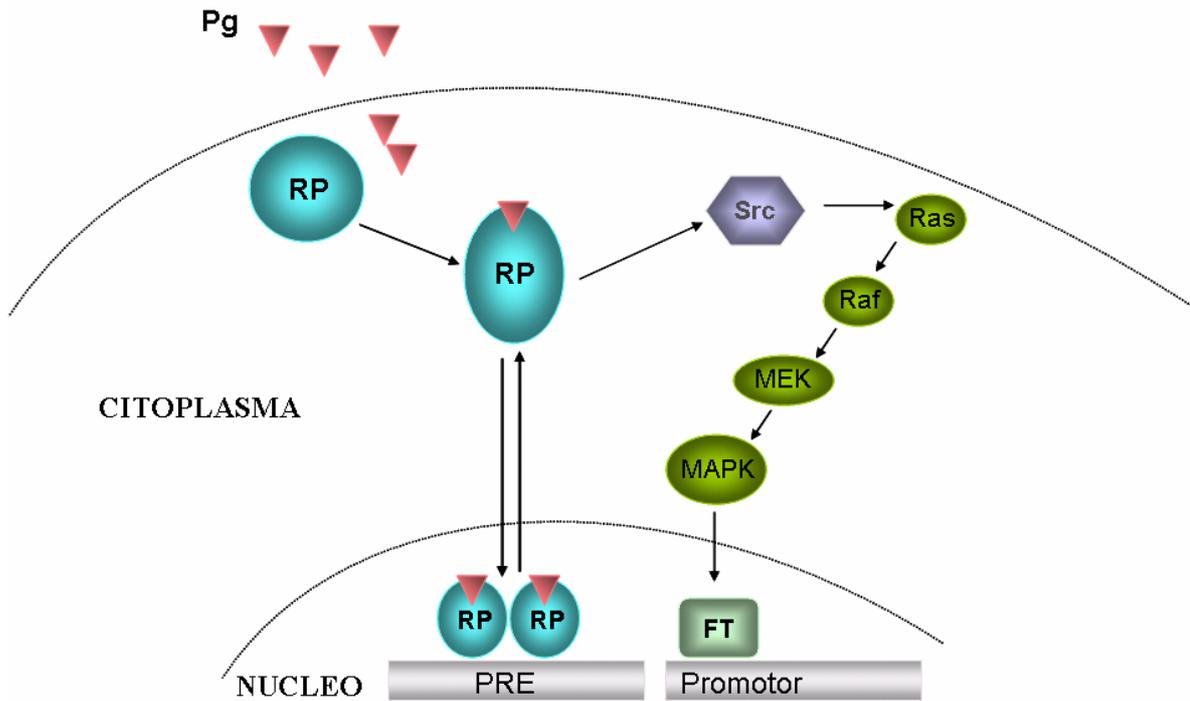


Figura 11. Efectos no genómicos del RP.

En presencia de la hormona, el RP es capaz de inducir tanto efectos genómicos clásicos como efectos rápidos no genómicos. Estos últimos se caracterizan por una activación rápida de vías de transducción de señales, como la vía de Src/Ras/MAPKs, regulando la actividad de factores de transcripción (FT) y la expresión de diversos genes que no presentan un PRE en su promotor.

La progesterona es capaz de inducir tanto efectos genómicos clásicos como efectos rápidos no genómicos. En los últimos años se ha demostrado que la activación de vías de transducción de señales por progestágenos cumple un rol esencial en el crecimiento y desarrollo del carcinoma mamario. El estudio de las vías involucradas y las diversas respuestas biológicas inducidas por los progestágenos es de suma importancia para proveer nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama.

MODELOS EXPERIMENTALES

En el presente trabajo se utilizaron tres modelos experimentales con diferentes fenotipos con el fin de estudiar los mecanismos moleculares de la acción de los progestágenos en células de cáncer de mama.

MODELO EXPERIMENTAL DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO INDUCIDO POR PROGESTÁGENOS (C4HD)

Se utilizó el modelo experimental murino de carcinogénesis hormonal C4HD (120). En este modelo, la administración prolongada del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) a ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c resultó en la aparición de adenocarcinomas mamarios (Figura 12). Entre ellos, el tumor C4HD es de histología ductal con una baja capacidad metastásica, expresa altos niveles de RE y RP (121), sobreexpresa el RTK tipo I ErbB-2 y expresa ErbB-3 y ErbB-4 (70;122;123). El tumor se mantiene por pasajes singeneicos en ratones hembra vírgenes BALB/c tratados con un *depot* de MPA (40mg) y presenta un crecimiento dependiente de progestágenos (122). Existen pocos modelos bien caracterizados de la progresión del carcinoma mamario. El modelo de carcinogénesis hormonal C4HD es una herramienta excelente dado que su histología y el patrón de expresión de receptores son similares a la presentada por los tumores de mama humanos.

Realizando pasajes a hembras sin tratar con MPA se seleccionaron variantes capaces de crecer sin el aporte exógeno de progestágenos y se las denominó progestágeno-independientes (HI) (Figura 12). En menor proporción, el MPA indujo tumores de origen lobulillar (Figura 12) (122).

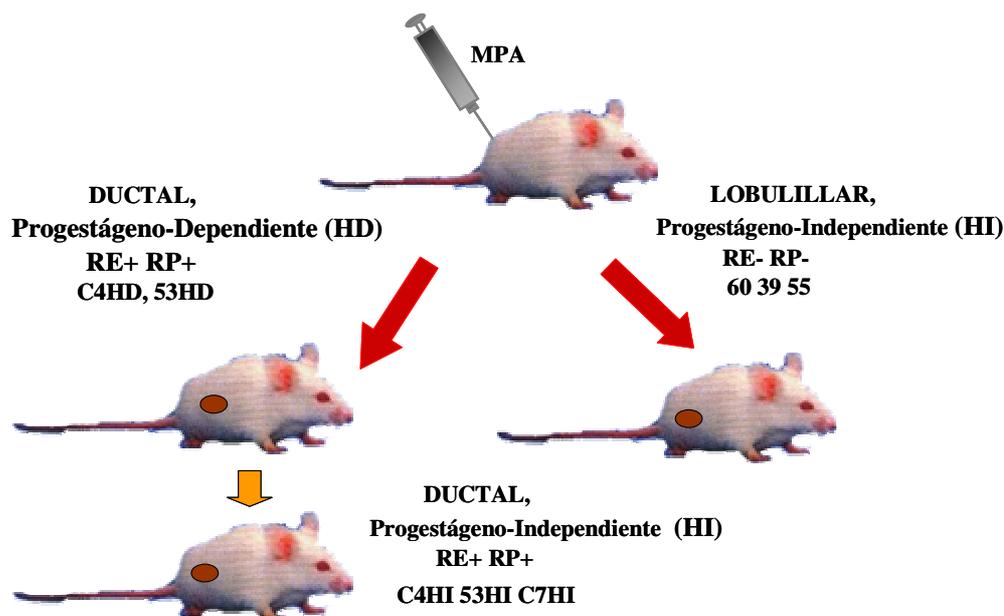


Figura 12. Modelo de carcinogénesis mamaria inducida por MPA.

La administración prolongada del progestágeno sintético MPA indujo la aparición espontánea de adenocarcinomas mamarios mayormente de histología ductal y con altos niveles de RE y RP. Son los denominados progestágeno-dependientes (HD), entre ellos, el C4HD. Realizando pasajes en ratones sin tratar con MPA además se obtuvieron los tumores progestágeno-independientes (HI). Por último, se obtuvieron en menor medida tumores de origen lobulillar, que carecen de RP y RE.

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.

LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO METASTÁSICO (LM3)

La línea celular LM3 fue desarrollada en el laboratorio de la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé (Urtreger *et al.* Int J Oncol 1997 11 489-96). Se obtuvo a partir de cultivos primarios del adenocarcinoma mamario murino M3, mantenido por pasajes singeneicos en ratones hembra vírgenes BALB/c (Bal de Kier Joffé *et al.* Invasión Metastasis 1986 6 302-12). Estos tumores presentan una alta capacidad metastásica con un 40% de incidencia de metástasis pulmonares. La inyección subcutánea de células epiteliales LM3 en ratones BALB/c produce adenocarcinomas poco diferenciados, localmente invasivos y altamente metastáticos en pulmón. La línea LM3 no presenta RE ni RP, su

crecimiento es hormono-independiente y, al igual que el tumor parental, presenta una alta capacidad invasiva con un 90-100% de incidencia de metástasis pulmonar (Urtreger *et al.* Int J Oncol 1997 11 489-96).

LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA MAMARIO HUMANA (T47D-Y)

El grupo de la Dra. Kathryn Horwitz desarrolló la línea celular de carcinoma mamario humana T47D-Y a partir de la línea parental T47D, RE y RP positiva, proveniente de una paciente con cáncer de mama metastático en pulmón (124). La línea T47D-Y se obtuvo mediante clonación por dilución límite y a diferencia de la línea parental, no expresa RP. Esta línea celular es muy utilizada para estudiar los efectos tanto genómicos como no genómicos del RP en células de carcinoma mamario humanas (119). Además, es una herramienta apropiada para determinar en forma independiente los efectos de las isoformas A y B del RP en el crecimiento de células cáncer de mama (79).

MUTANTES DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

En el presente trabajo se utilizaron dos mutantes del RP con el fin de estudiar los efectos genómicos y no genómicos de los progestágenos en células de carcinoma mamario involucrados en el crecimiento y progresión tumoral.

En primer lugar, se utilizó una isoforma B del RP que posee una mutación puntual que reemplaza una cisteína (587) conservada en el primer dedo de zinc del DBD por una alanina (C587A). Esta mutante del RP (C587A-RP), realizada y caracterizada por Horwitz y colaboradores (125), es incapaz de unirse a un PRE y por lo tanto de regular la actividad transcripcional de los promotores blanco.

En segundo lugar, se utilizó la mutante del RP desarrollada por Edwards y colaboradores en la cual tres prolinas claves en la interacción del RP con c-Src fueron reemplazadas por alaninas (RP-BmPro), impidiendo la activación de vías de transducción de señales dependientes de c-Src (116).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue **estudiar los efectos no genómicos de los progestágenos en células de carcinoma mamario, analizando su participación en la regulación de diversos aspectos del fenotipo neoplásico**. En particular se analizó:

OBJETIVOS PARTICULARES

PARTE I

Objetivo 1. Evaluar la capacidad del MPA de inducir la rápida activación de vías de transducción de señales en las células de carcinoma mamario murino C4HD y LM3 y en células de carcinoma mamario humanas T47D-Y transfectadas con el RP y sus mutantes.

Objetivo 1.1: Estudiar la activación rápida de vías de transducción de señales en las células C4HD luego del tratamiento con MPA.

Objetivo 1.2: Determinar la participación del RP clásico y el RE en la activación de vías de transducción de señales en células LM3 y T47D-Y transfectadas con el RP.

Objetivo 1.3: Evaluar la capacidad del MPA de activar vías de transducción de señales en forma independiente de la actividad transcripcional del RP en células LM3 y T47D-Y transfectadas con el RP y con la mutante C587A-RP.

PARTE II

Objetivo 2. Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación celular inducida por MPA en las células de carcinoma mamario murino C4HD y LM3 y en células de carcinoma mamario humanas T47D-Y transfectadas con el RP y sus mutantes.

Objetivo 2.1: Evaluar la participación de las vías de transducción de señales en la proliferación inducida por MPA en células C4HD.

Objetivo 2.2: Estudiar la capacidad del MPA de inducir la proliferación celular en forma independiente de la actividad transcripcional del RP en células LM3 y T47D-Y transfectadas con el RP y con la mutantes C587A-RP y RP-BmPro.

Objetivo 2.3: Estudiar el efecto del MPA en la supervivencia de células LM3 transfectadas con el RP y con la mutantes C587A-RP y RP-BmPro.

PARTE III

Objetivo 3. Evaluar los efectos no genómicos del MPA en la regulación de la actividad de proteasas y la capacidad metastásica de células LM3 transfectadas con el RP y las mutantes del RP.

Objetivo 3.1: Estudiar el efecto del MPA en la actividad de proteasas involucradas en el proceso de invasión tumoral en células C4HD y LM3 transfectadas con el RP analizando la participación de las vías de transducción de señales.

Objetivo 3.2: Determinar la capacidad del MPA de regular la actividad de proteasas en forma independiente de la actividad transcripcional del RP en células LM3 transfectadas con el RP y con la mutantes C587A-RP y RP-BmPro.

Objetivo 3.3: Evaluar los efectos genómicos y no genómicos del MPA en la regulación de la capacidad metastásica de células LM3 transfectadas con el RP y con la mutantes C587A-RP y RP-BmPro.

PARTE I

En esta primera parte del trabajo se evaluó la capacidad del MPA de inducir la rápida activación de vías de transducción de señales en los tres modelos experimentales utilizados.

MPA induce la rápida activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en células C4HD

Trabajos previos demostraron la capacidad de los progestágenos de activar la vía de Src/Ras/MAPKs durante la fase proliferativa que presentan las células de carcinoma mamario humanas T47D luego del tratamiento con progestágenos (114;119). En el presente trabajo se estudió el efecto del MPA en la actividad de vías de transducción de señales en el modelo de carcinogénesis hormonal C4HD que presenta altos niveles de RP y una proliferación sostenida en presencia de progestágenos. Como se muestra en la Figura 13A, el MPA es capaz de activar en forma rápida las p42/p44MAPKs en las células C4HD. La activación de estas quinasas se evaluó mediante ensayos de western blot (WB) con anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de las p42/p44MAPKs. El máximo de estimulación (2 veces) se observó a los 5 minutos de tratamiento llegando nuevamente a niveles basales luego de los 30 minutos. El pretratamiento de las C4HD con PD98059 10 μ M, inhibidor específico de MEK1, o con U0126 5 μ M, inhibidor específico de MEK1/MEK2, bloqueó completamente la activación de las p42/p44MAPKs por MPA (Figura 13A). A diferencia de lo observado por Lange y colaboradores (119), el tratamiento con el antiprogestágeno RU486 100nM no aumentó la fosforilación de las p42/p44MAPKs, sin embargo, disminuyó significativamente la activación inducida por MPA (Figura 13A).

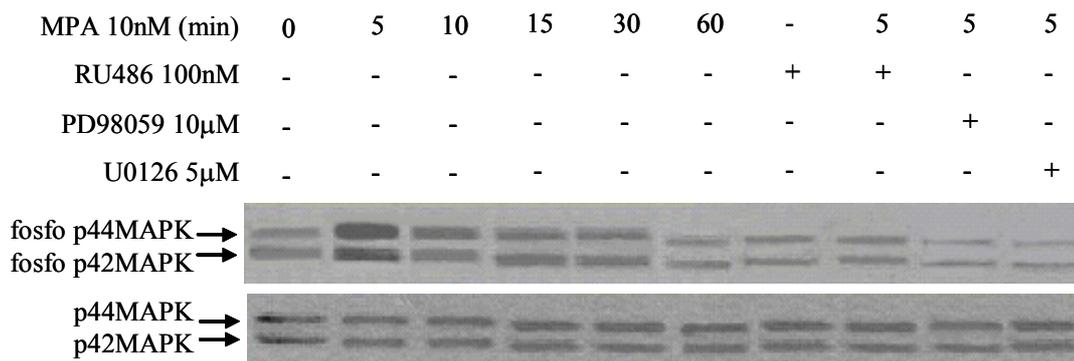


Figura 13A. MPA induce la rápida activación de las p42/p44MAPKs en células C4HD.

Cultivos primarios de células C4HD fueron tratados con MPA por los tiempos indicados, tratadas con RU486 por 5 minutos o preincubadas con los inhibidores RU486, PD98059, U0126 previo a la estimulación con MPA. Veinticinco μ g de proteínas de extracto total de C4HD fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfo p42/p44MAPKs. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra p42/p44MAPKs totales. Se muestra un experimento representativo de 4.

La regulación de la actividad de la vía PI-3K/Akt por progestágenos permanece poco explorada (126). En el presente trabajo evaluamos la capacidad del MPA de activar la vía PI-3K/Akt en células C4HD mediante ensayos de WB utilizando anticuerpos contra la fosfo serina 473 de Akt, como medida de la activación de esta vía. En la Figura 13B se muestra una rápida activación de la vía PI-3K/Akt a los 5 minutos de tratamiento con MPA llegando a un máximo (3 veces) luego de 10 minutos. Los inhibidores específicos de PI-3K, Wortmanina (1 μ M) y Ly294002 (2 μ M), bloquearon completamente la activación de Akt por MPA (Figura 13B). El tratamiento con RU486 100nM no estimuló la fosforilación de Akt, sin embargo, disminuyó significativamente la activación de la vía por MPA (Figura 13B).

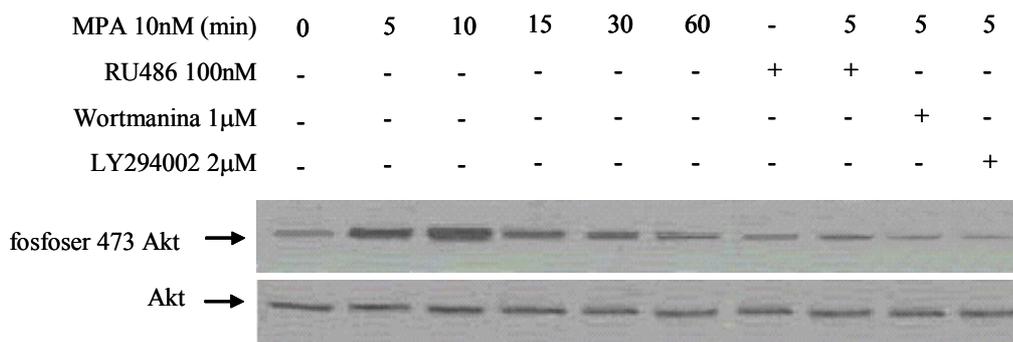


Figura 13B. MPA induce la rápida activación de la vía PI-3K/Akt en células C4HD.

Cultivos primarios de células C4HD fueron tratados con MPA por los tiempos indicados, tratadas con RU486 por 5 minutos o preincubadas con los inhibidores RU486, Wortmanina, Ly294002 previo a la estimulación con MPA. Cincuenta μ g de proteínas de extracto total de C4HD fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfoSer 473 Akt. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra Akt total. Se muestra un experimento representativo de 4.

La rápida activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt por MPA es mediada por el receptor de progesterona clásico

Los resultados obtenidos en presencia del antiprogestágeno RU486 sugieren la participación del RP clásico en la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt. Con el objetivo de demostrar efectivamente el rol del RP convencional en los efectos no genómicos del MPA se utilizó nuestro segundo modelo experimental, la línea celular de carcinoma mamario murino LM3. Como se mencionó previamente, esta línea carece de la expresión del RP y RE y su crecimiento es independiente de hormonas. Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con un vector de expresión para la isoforma B del RP humano (LM3-RP-B). En la Figura 14 se muestra la capacidad del MPA de estimular la fosforilación de la proteína quinasa c-Src a los 2 minutos del tratamiento con el progestágeno en las LM3-RP-B. Sin embargo, en las LM3 sin transfectar o transfectadas con un vector vacío (LM3-pSG5) no se observaron diferencias en el nivel de fosforilación de c-Src luego del tratamiento con MPA (Figura 14).

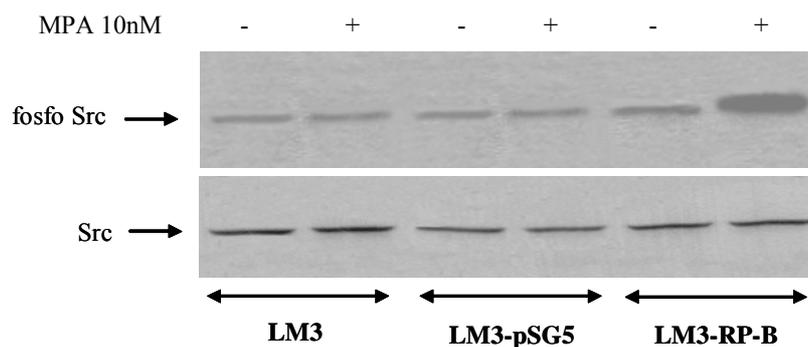


Figura 14. MPA induce la rápida activación de *c*-Src en células LM3 transfectadas con RP.

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con el RP (LM3-RP-B), con un vector vacío (LM3-pSG5) o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego estimuladas con MPA durante 2 minutos. Veinticinco μ g de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfo *c*-Src. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra *c*-Src total. Se muestra un experimento representativo de 3.

Se evaluó luego el efecto del MPA en la activación de las MAPKs en células LM3 transfectadas con el RP. Como se muestra en la Figura 15A, el tratamiento con el progestágeno estimuló la fosforilación de las p42/p44MAPKs solo en las LM3-RP-B. El tratamiento con RU486 no estimuló la fosforilación de p42/p44MAPKs y disminuyó significativamente la activación de la vía por MPA (Figura 15A). Sin embargo, esta inhibición resultó menor a la observada con U0126 (Figura 15A).

Trabajos previos demostraron que la co-transfección con el RE en células Cos-7 disminuye los niveles basales de fosforilación de *c*-Src permitiendo observar la activación de esta quinasa luego del tratamiento con progestágenos (116). En el presente trabajo se utilizó la línea LM3, que carece de RE, como modelo para estudiar el rol de este receptor en la activación de la vía Src/MAPKs por MPA. Las células LM3 fueron co-transfectadas con RE- α humano junto con el RP (LM3-RP-B-RE). La expresión del RE disminuyó el nivel basal de fosforilación de las p42/p44MAPKs en las LM3-RP-B-RE respecto al observado en las LM3-RP-B (Figura 15A), permitiendo detectar una mayor activación luego del tratamiento con MPA. La preincubación con U0126 y con RU486 disminuyó la fosforilación de las p42/p44MAPKs inducida por el progestágeno (Figura 15A).

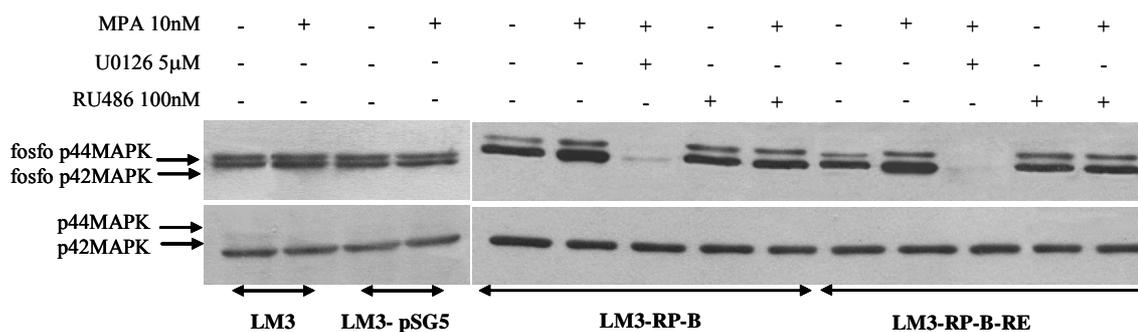


Figura 15A. MPA induce la rápida activación de p42/p44MAPKs en células LM3 transfectadas con RP.

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con el RP (LM3-RP-B), co-transfectadas con el RE (LM3-RP-B-RE), con un vector vacío (LM3-pSG5) o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego estimuladas con MPA o con RU486 durante 5 minutos o preincubadas con U0126 o RU486 previo a la estimulación con MPA. Veinticinco µg de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfo p42/p44MAPKs. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra p42/p44MAPKs totales. Se muestra un experimento representativo de 4.

Resultados similares fueron obtenidos en nuestro tercer modelo experimental, la línea de carcinoma mamario humana T47D-Y, que expresa RE pero carece de RP. Al igual que las LM3, las células T47D-Y fueron transfectadas en forma transiente con la isoforma B del RP (T47D-Y-RP-B) o con un vector vacío (T47D-Y-pSG5) y se analizó el efecto del MPA en la activación de las p42/p44MAPKs. Como se muestra en la Figura 15B, el MPA fue capaz de aumentar la fosforilación de las p42/p44MAPKs, observándose una inhibición total de este efecto al preincubar las células con U0126 y una disminución significativa en presencia de RU486. Recientemente, Lange y colaboradores (119) reportaron una estimulación de la fosforilación de las p42/p44MAPKs en presencia de RU486 en células T47D-Y transfectadas en forma estable con el RP. En el presente trabajo no se observó una activación de la vía Src/MAPKs luego del tratamiento con el antiprogéstágeno.

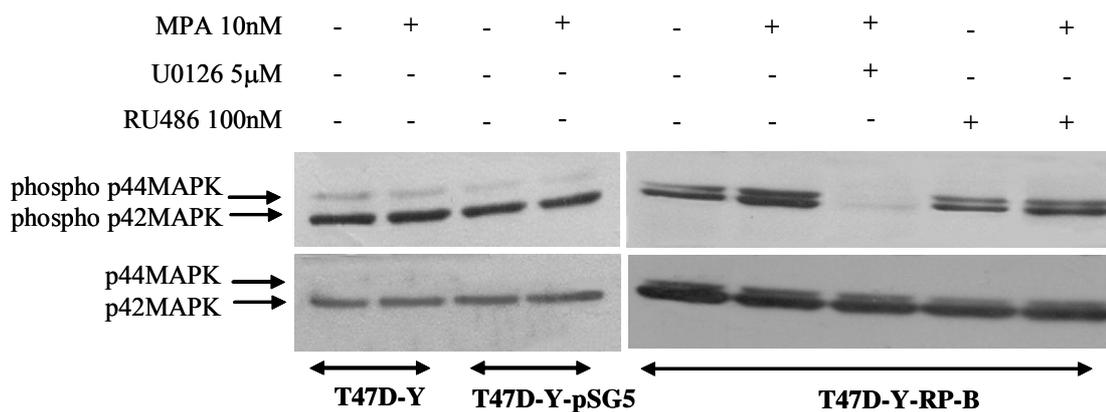


Figura 15B. MPA induce la rápida activación de p42/p44MAPKs en células T47D-Y transfectadas con RP.

Las células T47D-Y fueron transfectadas en forma transiente con el RP (T47D-Y-RP-B), con un vector vacío (T47D-Y-pSG5) o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego estimuladas con MPA o con RU486 durante 5 minutos o preincubadas con U0126 o RU486 previo a la estimulación con MPA. Veinticinco µg de proteínas de extracto total de T47D-Y fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfo p42/p44MAPKs. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra p42/p44MAPKs totales. Se muestra un experimento representativo de 4.

Se estudió luego la participación del RP clásico en la activación de la vía PI-3K/Akt por MPA tanto en las células LM3 como en las T47D-Y. El tratamiento con MPA no produjo cambios en el nivel de fosforilación de Akt en células LM3 y T47D-Y sin transfectar o transfectadas con pSG5 (Figuras 16A y 16B respectivamente). Sin embargo, el progestágeno fue capaz de inducir un aumento en la fosforilación de Akt en las células LM3-RP-B (Figura 16A). La preincubación con el inhibidor Ly294002 bloqueó completamente la estimulación de Akt por MPA en las células LM3-RP-B (Figura 16A). Asimismo, el tratamiento con RU486 no aumentó la fosforilación en serina 473 de Akt y disminuyó significativamente la estimulación de la vía por MPA en las LM3-RP-B (Figura 16A). Al igual que para la vía de las MAPKs, la co-transfección con el RE resultó en una disminución del nivel basal de fosforilación de Akt permitiendo observar una mayor activación de la vía luego del tratamiento con MPA (Figura 16A). Este efecto fue bloqueado por la presencia de los inhibidores Ly294002 y RU486 (Figura 16A). Resultados similares fueron obtenidos en las T47D-Y-RP-B donde el tratamiento con MPA indujo un aumento en la fosforilación de Akt, el cual fue bloqueado en presencia de los inhibidores Ly294002 y RU486 (Figura 16B).

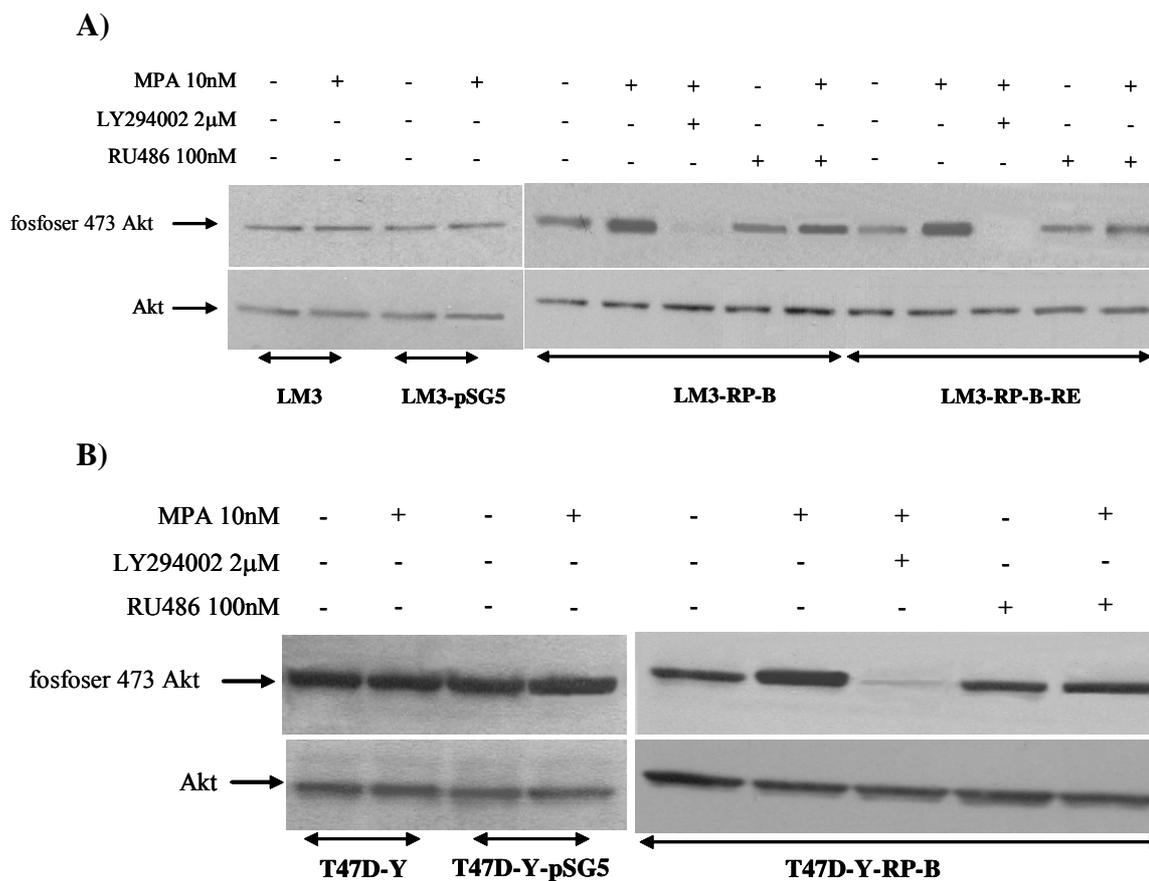


Figura 16. MPA induce la rápida activación de PI-3K/Akt en células LM3 y T47D-Y transfectadas con RP.

Las células LM3 (A) y T47D-Y (B) fueron transfectadas en forma transiente con el RP (LM3-RP-B, T47D-Y-RP-B), con un vector vacío (LM3-pSG5, T47D-Y-pSG5) o permanecieron sin tratar. Las células LM3 fueron además co-transfectadas con el RE (LM3-RP-B-RE). Las células fueron luego estimuladas con MPA o con RU486 durante 5 minutos o preincubadas con Ly294002 o RU486 previo a la estimulación con MPA. Cincuenta μ g de proteínas de extracto total de LM3 y T47D-Y fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfoSer 473 Akt. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra Akt total. Se muestra un experimento representativo de 4.

La rápida activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt por MPA es un efecto no genómico del receptor de progesterona

Con el objetivo de demostrar que la activación de las vías de transducción de señales por progestágenos es un efecto no genómico, las células LM3 y T47D-Y fueron transfectadas con una isoforma B del RP que posee una mutación puntual que

reemplaza una cisteína (587) conservada en el primer dedo de zinc del DBD por una alanina (C587A). Esta mutante del RP (C587A-RP), realizada y caracterizada por Horwitz y colaboradores (125), es incapaz de unirse a un PRE y por lo tanto de regular la actividad transcripcional de los promotores blanco. Al igual que lo observado en las células Cos-7, MPA estimuló la fosforilación de c-Src en células LM3 transfectadas con la mutante C587A (LM3-C587A-RP) (Figura 17).

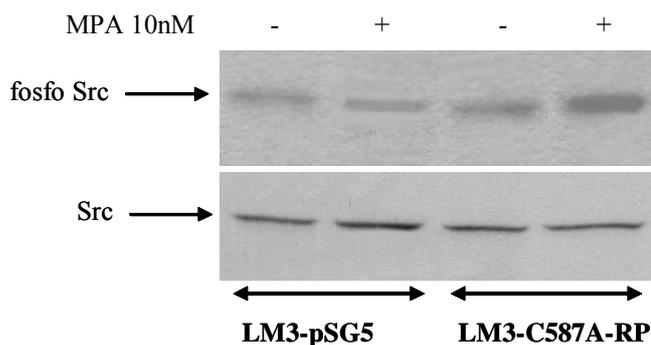


Figura 17. MPA induce la rápida activación de c-Src en células LM3 transfectadas con RP-C587A.

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con el C587A (LM3-C587A-RP), con un vector vacío (LM3-pSG5). Las células fueron luego estimuladas con MPA durante 2 minutos. Veinticinco μ g de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfo c-Src. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra c-Src total. Se muestra un experimento representativo de 3.

Se analizó luego el efecto del MPA en la activación de las MAPKs en células transfectadas con la mutante C587A. El tratamiento con el progestágeno aumentó la fosforilación de las p42/p44MAPKs en las LM3-C587A-RP, siendo este aumento disminuído significativamente por la presencia de los inhibidores U0126 y RU486 (Figura 18A). Al igual que lo observado en las LM3-RP-B, la co-transfección con el RE (LM3-C587A-RP-RE) disminuyó el nivel basal de fosforilación de las p42/p44MAPKs y la activación observada luego del tratamiento con MPA fue inhibida por la presencia de U0126 y RU486 (Figura 18A). Resultados similares fueron obtenidos en la línea celular T47D-Y, en la cual la transfección con la mutante incapaz de unirse a PREs (T47D-Y-C587A-RP) permitió observar un aumento en la fosforilación de las p42/p44MAPKs luego del tratamiento con MPA (Figura 18B). La estimulación de la vía por el progestágeno fue inhibida por U0126 y RU486 (Figura 18B).

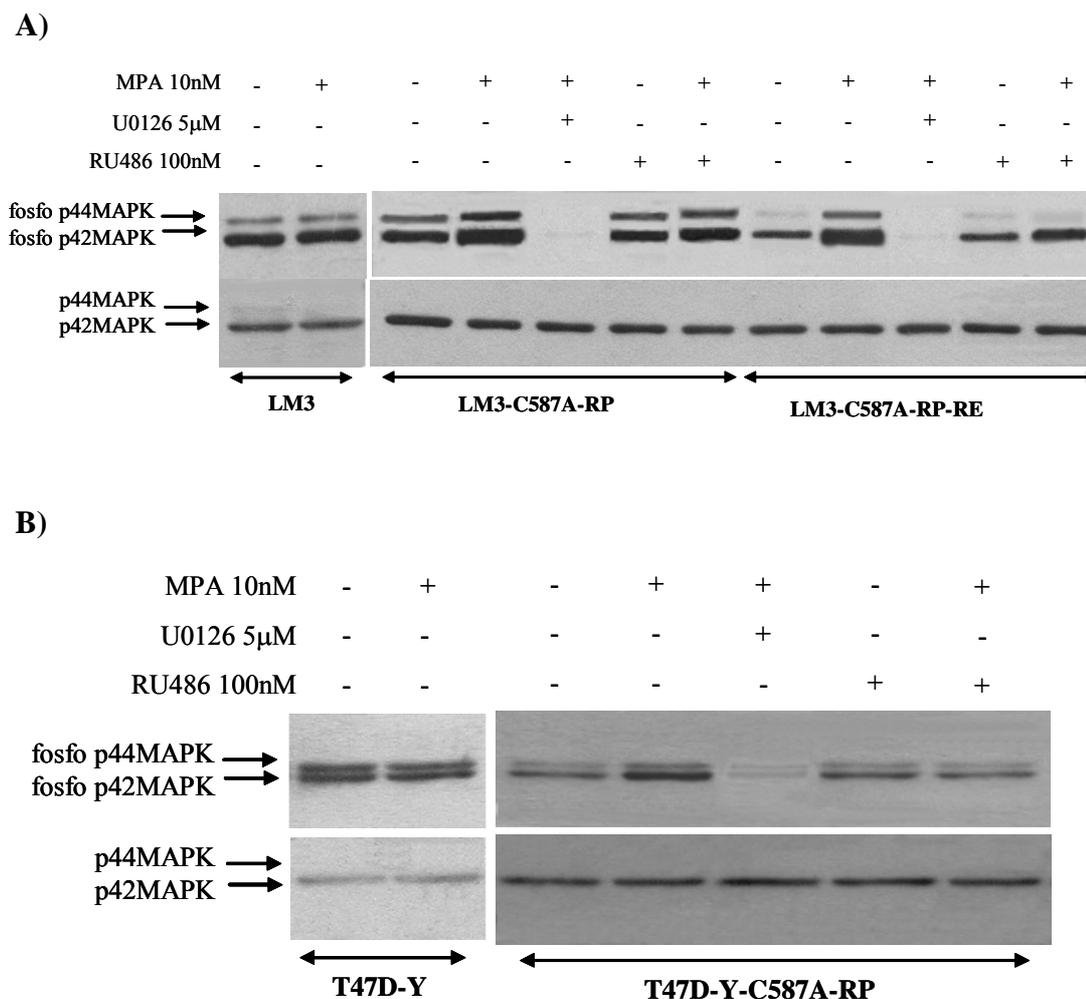


Figura 18. MPA induce la rápida activación de p42/p44MAPKs en células LM3 y T47D-Y transfectadas con RP-C587A.

Las células LM3 (A) y T47D-Y (B) fueron transfectadas en forma transiente con el C587A-RP (LM3-C587A-RP, T47D-Y-C587A-RP) o permanecieron sin tratar. Las células LM3 fueron además co-transfectadas con el RE (LM3-C587A-RP-RE). Las células fueron luego estimuladas con MPA o con RU486 durante 5 minutos o preincubadas con U0126 o RU486 previo a la estimulación con MPA. Veinticinco µg de proteínas de extracto total de LM3 y T47D-Y fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfo p42/p44MAPKs. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra p42/p44MAPKs totales. Se muestra un experimento representativo de 4.

Respecto a la vía PI-3K/Akt, se observó que el tratamiento con MPA aumentó la fosforilación de Akt en células LM3-C587A-RP y T47D-Y-C587-RP (Figura 19A y B respectivamente). La activación de la vía PI-3K/Akt inducida por MPA se inhibió en presencia de Ly294002 y RU486 en ambos tipos celulares (Figura 19). Las células LM3 co-transfectadas con RE presentaron un menor nivel basal de fosforilación de Akt

respecto a las LM3-C587A-RP, permitiendo observar una mayor estimulación luego del tratamiento con MPA (Figura 19A).

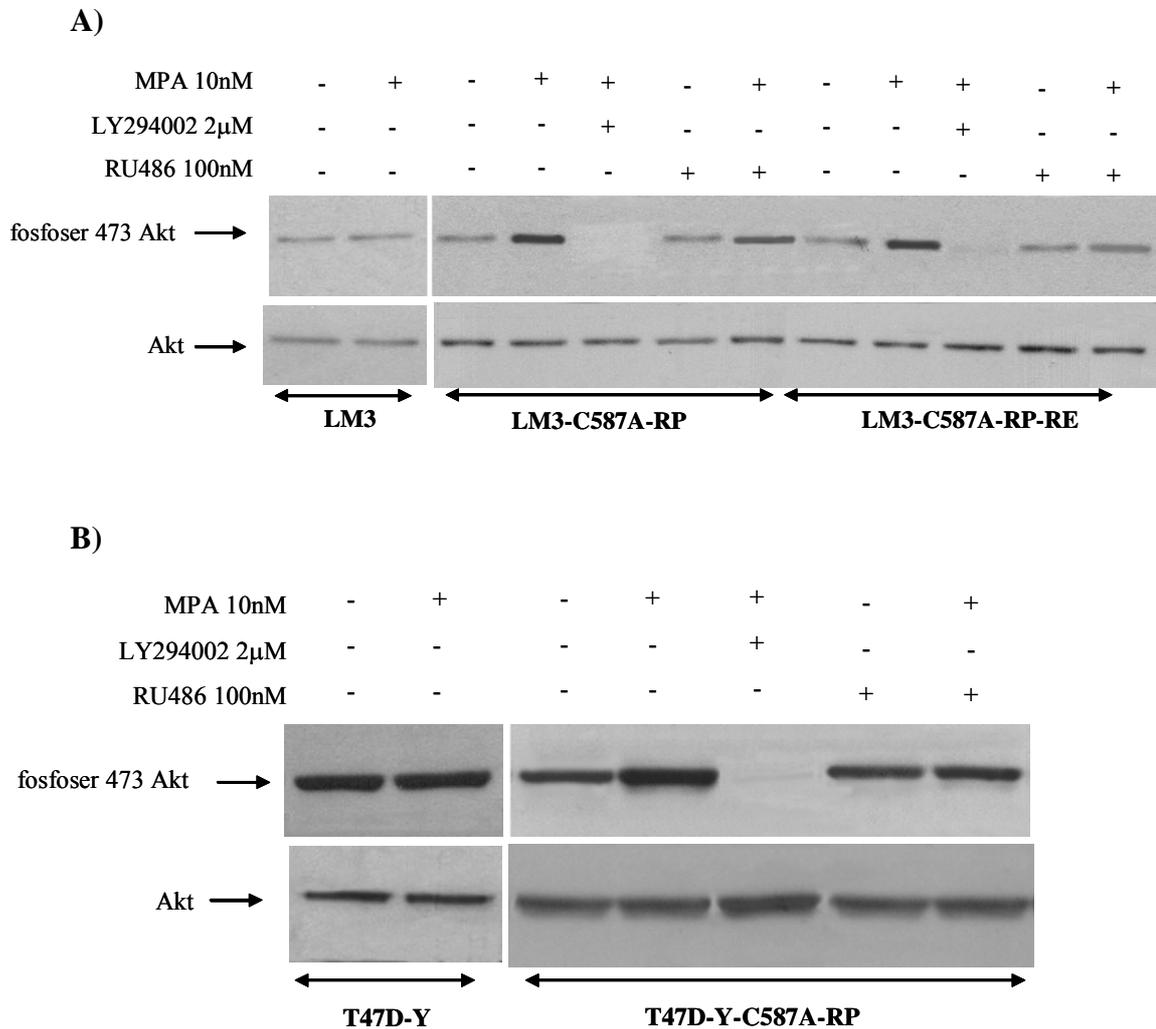


Figura 19. MPA induce la rápida activación de PI-3K/Akt en células LM3 y T47D-Y transfectadas con C587A-RP.

Las células LM3 (A) y T47D-Y (B) fueron transfectadas en forma transiente con el C587A-RP (LM3-C587A-RP, T47D-Y-C587A-RP) o permanecieron sin tratar. Las células LM3 fueron además co-transfectadas con el RE (LM3-C587A-RP-RE). Las células fueron luego estimuladas con MPA o con RU486 durante 5 minutos o preincubadas con Ly294002 o RU486 previo a la estimulación con MPA. Cincuenta μ g de proteínas de extracto total de LM3 y T47D-Y fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra fosfoSer Akt. La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra Akt total. Se muestra un experimento representativo de 4.

Expresión y actividad transcripcional del receptor de progesterona y la mutante C587A-RP

Se evaluó luego la expresión y función del RP y la mutante C587A-RP en ambos modelos experimentales utilizados para estudiar la activación de las vías p42/p44MAPKs y PI-3K/Akt. Como se muestra en la Figura 20, la transfección de ambos plásmidos resultó en una expresión concentración-dependiente tanto en las LM3 (Figura 20A) como en las T47D-Y (Figura 20B). Una medida de la unión al ligando y la funcionalidad del RP es la disminución en la expresión del receptor (*downregulation*) luego de tratamientos prolongados con el progestágeno. En la Figura 20A se muestra la disminución en los niveles del RP luego de 48hs de tratamiento con MPA en las células LM3 (calles 3 y 4). A diferencia de lo observado para el RP *wild type*, el tratamiento con el progestágeno no disminuyó la expresión de C587A (calles 6 y 7, Figura 20A). Sin embargo, se observó el característico *upshift* en la corrida electroforética de la mutante, consecuencia de un incremento en la fosforilación ligando dependiente del receptor (calles 6 y 7, Figura 20A). Cabe destacar que la expresión de la mutante C587A-RP resultó ser levemente menor a la del RP *wild type* en ambas líneas celulares (Figura 20A y B). Sin embargo, los resultados de las Figuras 18 y 19 demuestran que ambos receptores son capaces de activar vías de transducción de señales en presencia del ligando.

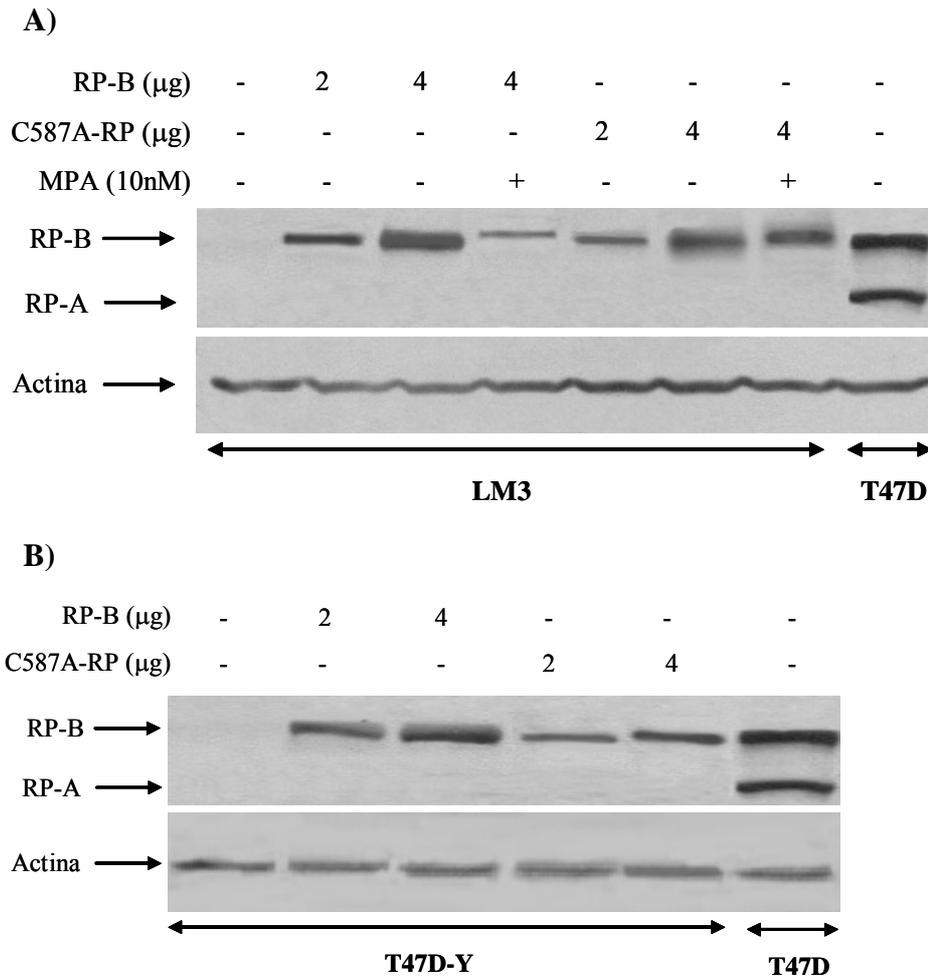


Figura 20. Expresión y función del RP y la mutante C587A-RP en células LM3 y T47D-Y transfectadas. Las células LM3 (A) y T47D-Y (B) fueron transfectadas en forma transiente con 2 y 4 μg del RP o C587A-RP o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego estimuladas o no con MPA por 48hs. Cien μg de proteínas de extracto total de LM3 y T47D-Y fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra RP o con un anticuerpo contra Actina como control de carga. Extractos de T47D fueron utilizados como control positivo. Se muestra un experimento representativo de 4.

Para determinar la actividad transcripcional del RP *wild type* y la mutante C587A-RP las células LM3 fueron co-transfectadas con el plásmido reportero MMTV-LUC, que contiene 5 PREs río arriba del gen de la luciferasa. Como se muestra en la Figura 20C, el tratamiento con MPA aumentó la actividad transcripcional del RP *wild type*, mientras que, en las LM3 transfectadas con la mutante incapaz de unirse al DNA no se observaron cambios en la actividad luciferasa.

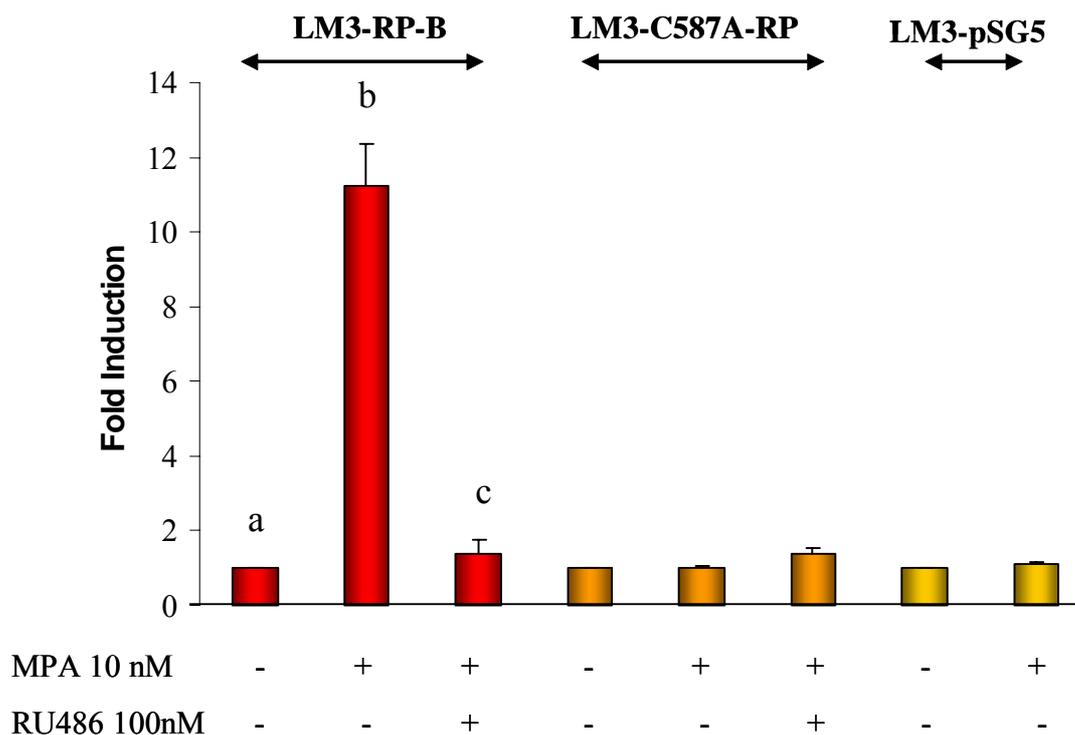


Figura 20C. Expresión y función del RP y la mutante C587A en células LM3 transfectadas

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con el plásmido reportero MMTV-luciferasa junto al vector de expresión de citomegalovirus- β galactosidasa. Además, las células fueron co-transfectadas con RP, C587A-RP o con pSG5. Luego fueron estimuladas con MPA por 48hs, preincubadas con RU486 previa a la estimulación con MPA o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego levantadas y lisadas. La medición de las actividades de luciferasa y β galactosidasa se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se representan como veces de inducción respecto a las células sin tratar. Los datos representan la media de 5 experimentos \pm ES. b vs a y c vs b $p < 0.001$.

La actividad transcripcional del RP y la mutante C587A-RP fue también evaluada mediante la expresión de genes endógenos cuyos promotores contienen PREs. Trabajos previos demostraron la capacidad de los progestágenos de aumentar la expresión del gen antiapoptótico Bcl- x_L en células de cáncer de mama (57) y la presencia de un PRE en su promotor (127). En primer lugar se analizó entonces el efecto del MPA en la expresión de Bcl- x_L en LM3 transfectadas con las distintas construcciones del receptor. Como se observa en la Figura 21A el tratamiento con MPA aumentó los niveles de Bcl- x_L en las LM3-RP-B. Sin embargo, el aumento en la expresión de Bcl- x_L en las LM3-C587A-RP fue significativamente menor al observado en las células transfectadas con el RP *wild type* (Figura 21A). La respuesta atenuada en las células transfectadas con la mutante incapaz de unirse a un PRE era esperada. El

C587A-RP aún es capaz de activar vías de transducción de señales que a su vez activan factores de transcripción con elementos respondedores en el promotor de Bcl-x_L regulando su expresión.

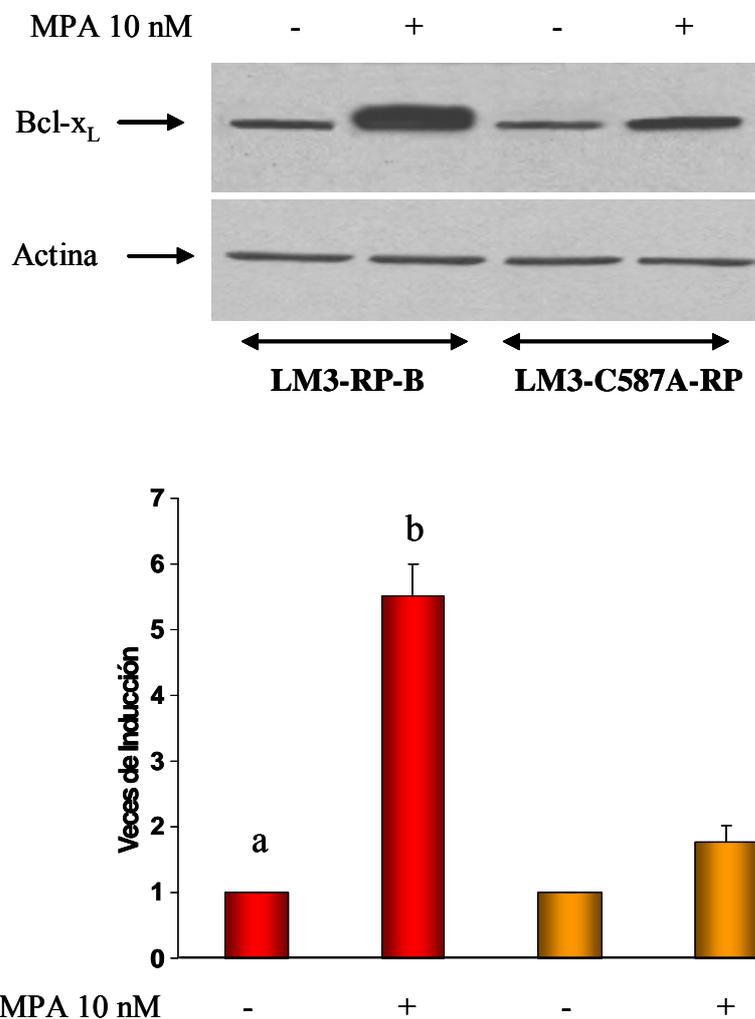


Figura 21A. Evaluación de la actividad transcripcional del RP y la mutante C587A-RP en la expresión de Bclx_L

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con RP, C587A-RP. Luego fueron estimuladas con MPA por 48hs o permanecieron sin tratar. *Panel Superior:* Cincuenta µg de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra Bcl-x_L. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con un anticuerpo contra actina como control de carga. *Panel inferior:* Las bandas de Bcl-x_L fueron densitometradas y sus valores normalizados por las bandas de actina. Los resultados se representan como veces de inducción respecto a las células sin tratar. Los datos representan la media de 4 experimentos ± ES. b vs a p<0.001.

Para continuar la caracterización de la mutante C587A-RP en su capacidad de regular la expresión de genes endógenos, se estudió la expresión de p21^{WAF1/Cip1}. El promotor de p21 no contiene un clásico PRE, aún así los progestágenos son capaces de regular su expresión mediante un mecanismo de *tethering*, en el cual el RP interactúa con el promotor de p21 a través del factor de transcripción Sp1 en el tercer y cuarto de seis sitios de unión del Sp1 (128). Horwitz y colaboradores (125) demostraron que la regulación de la transcripción independiente de la presencia de un PRE requiere un RP con un DBD intacto determinando así la incapacidad de la mutante C587A-RP de mediar este tipo de mecanismo de regulación transcripcional. En el mecanismo de *tethering* existe una interacción entre dos factores de transcripción que regulan la expresión del promotor, donde uno se une al DNA y el otro permanece como factor asociado, pero los dos necesitan un DBD intacto. Se hipotetizó entonces, que la mutante C578A-RP sería incapaz de regular la expresión de p21 mediante el mecanismo de *tethering*. Al igual que lo descrito previamente en las células T47D-Y, el tratamiento con MPA aumentó la expresión de p21 en las LM3-RP con un máximo a las 36hs (Figura 21B). Por el contrario, MPA fue incapaz de regular la expresión de p21 en las LM3-C587A-RP (Figura 21B). Resultados similares fueron obtenidos en células T47D-Y transfectadas con el RP *wild type* y con la mutante C587A-RP (datos no mostrados).

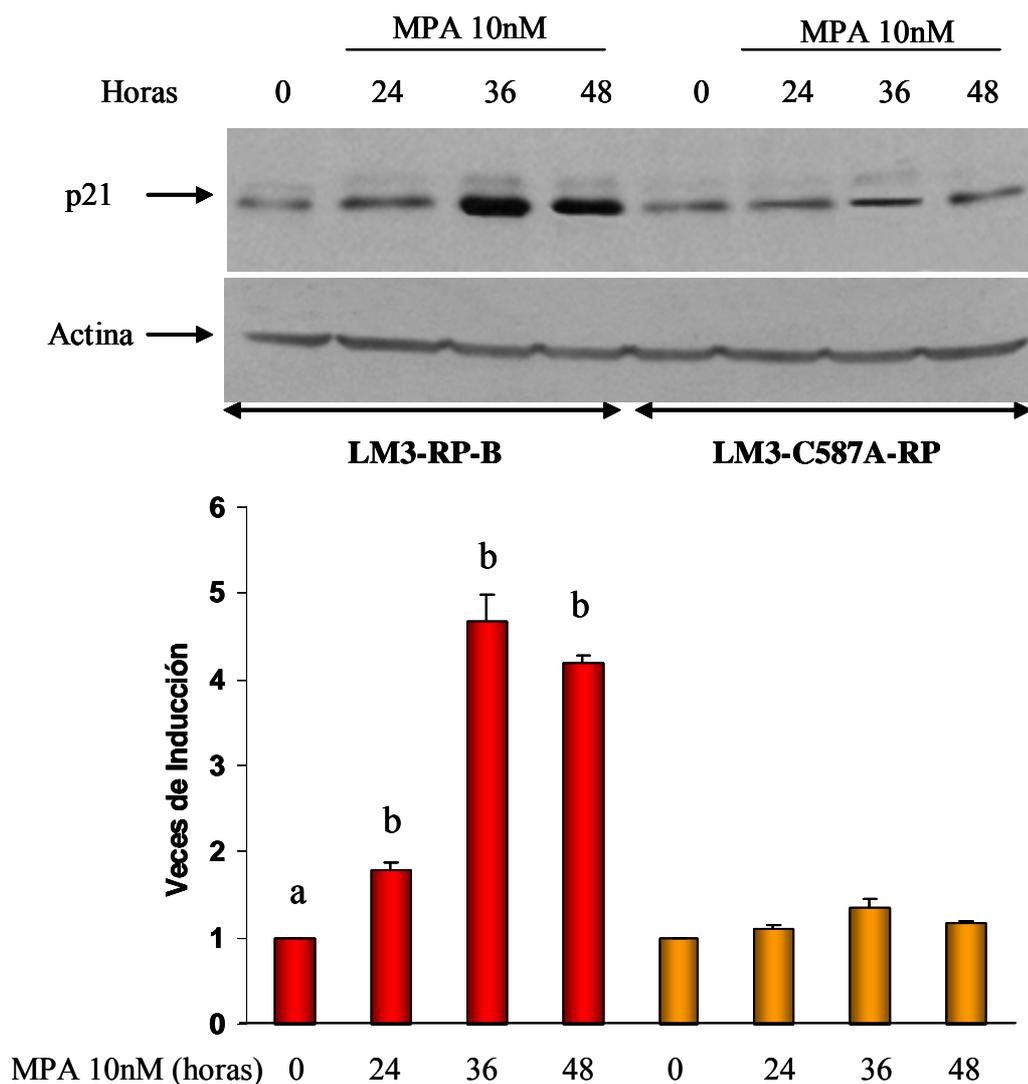


Figura 21B. Evaluación de la actividad transcripcional del RP y la mutante C587A en la expresión de p21

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con RP o C587A-RP. Luego fueron estimuladas con MPA por los tiempos indicados o permanecieron sin tratar. *Panel Superior:* Cincuenta μ g de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra p21. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con un anticuerpo contra actina como control de carga. *Panel inferior:* Las bandas de p21 fueron densitometradas y sus valores normalizados por las bandas de actina. Los resultados se representan como veces de inducción respecto a las células sin tratar. Los datos representan la media de 4 experimentos \pm ES. b vs a $p < 0.001$.

Los resultados de esta primera parte demuestran que el MPA es capaz de activar las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt a través del RP clásico y en forma independiente de su actividad transcripcional en células de carcinoma mamario murino y humano.

PARTE II

En esta segunda parte del trabajo se estudiaron los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación celular inducida por MPA en las células de carcinoma mamario murino C4HD y LM3 y en células de carcinoma mamario humanas T47D-Y. En particular, se evaluó la capacidad del RP de regular la proliferación celular en forma independiente de su actividad transcripcional.

El bloqueo de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt inhibió la proliferación de las C4HD inducida por MPA

En nuestro laboratorio se ha demostrado la capacidad del MPA de inducir una proliferación sostenida en las células C4HD la cual es inhibida por completo en presencia del antiprogestágeno RU486 (64;69;70). En el presente trabajo se demostró que el MPA es capaz de activar en forma rápida vías de transducción de señales como las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en células C4HD. Nuestro siguiente objetivo fue determinar la participación de estas vías en la proliferación de las C4HD inducida por MPA. Como se muestra en la Figura 22, la proliferación inducida por MPA disminuyó significativamente en presencia de los inhibidores de MEK1, PD98059 ($45\pm 6\%$), y de MEK1/2, U0126 ($50\pm 7\%$), y por la presencia de los inhibidores de la vía PI-3K/Akt, wortmanina ($40\pm 5\%$) y Ly294002 ($44\pm 6\%$). Es importante destacar que los inhibidores de ambas vías no tuvieron efecto sobre la proliferación basal de las C4HD (Figura 22). Estos resultados fueron obtenidos luego de un tratamiento de 48hs con el progestágeno. De acuerdo con lo esperado en este modelo experimental (64;69;70), resultados similares fueron observados luego de 24hs de tratamiento con MPA. Estos hallazgos indican que la rápida activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt por MPA está involucrada en la proliferación inducida por el progestágeno. Consistentemente, en nuestro laboratorio se demostró que el bloqueo de las MAPKs y la vía PI-3K/Akt no inhibe la capacidad del MPA de inducir la actividad transcripcional del RP (64), así como tampoco afecta la clásica *downregulation* y *upshift* del RP luego del tratamiento con el ligando (datos no mostrados).

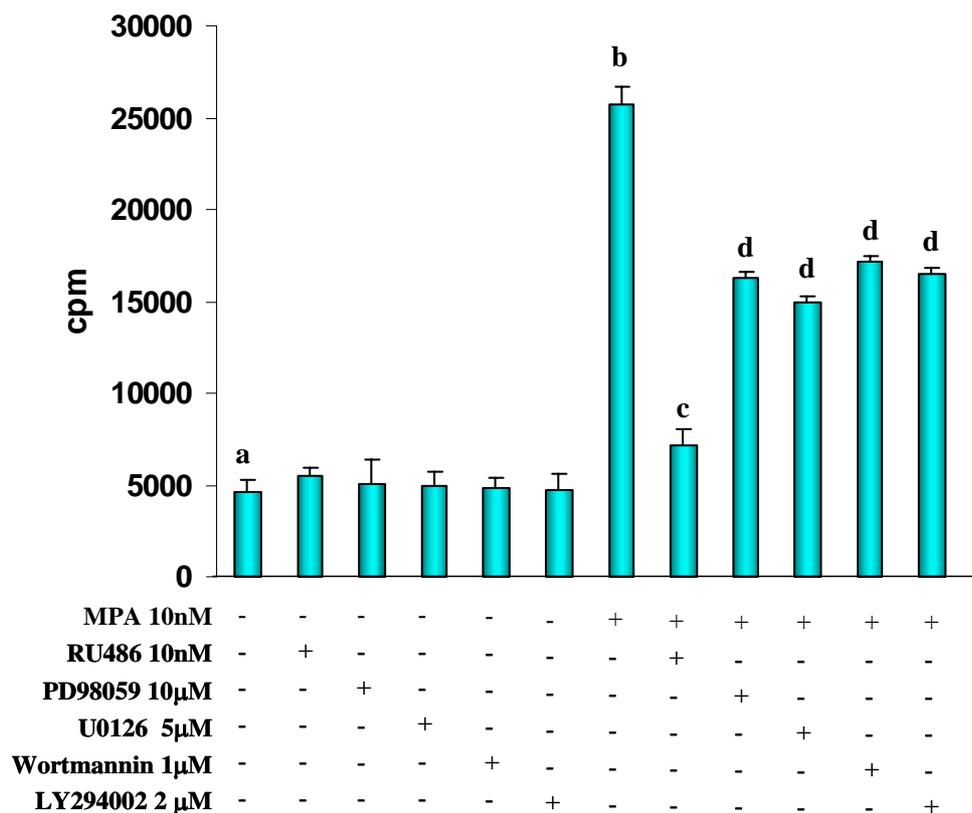


Figura 22. El bloqueo de las p42/p44MAPKs y la PI-3K/Akt inhiben la proliferación de las C4HD inducida por MPA

Las células C4HD fueron estimuladas con MPA, RU486, PD98059, U0126, wortmanina y Ly294002, preincubadas con estos inhibidores previo al tratamiento con MPA o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina [^3H] se utilizó como una medida de la síntesis de DNA. Los datos se presentan como la media \pm ES de octuplicados. b vs a, c vs b, d vs c $p < 0.001$. Se muestra un experimento representativo de 5.

Con el fin de descartar la posibilidad de que factores de crecimiento inducidos por MPA durante el ensayo sean los responsables de la activación y participación de las MAPKs y PI-3K/Akt en la proliferación inducida por progestágenos, se diseñó el siguiente experimento: Las células C4HD además de ser estimuladas con MPA o preincubadas con los inhibidores específicos para cada vía como se mostró en la figura 22, fueron estimuladas con MPA y tratadas con los inhibidores a distintos tiempos luego de la estimulación con el progestágeno. La incubación de los inhibidores a tiempos cortos (15 minutos) luego del tratamiento con MPA estaría bloqueando la estimulación de las vías por el progestágeno, debido a la falta de síntesis de nuevos factores de crecimiento en tiempos tan reducidos. La incubación de los inhibidores a tiempos más

largos (1, 2 o 6 horas), en cambio, estaría bloqueando la estimulación de las vías tanto por factores de crecimiento como por el progestágeno. En la Figura 23 se observa que solo la preincubación y el tratamiento a tiempos cortos con U0126 y Ly294002 disminuyeron significativamente la proliferación inducida por MPA, confirmando el rol de la estimulación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt por MPA en la proliferación inducida por el progestágeno.

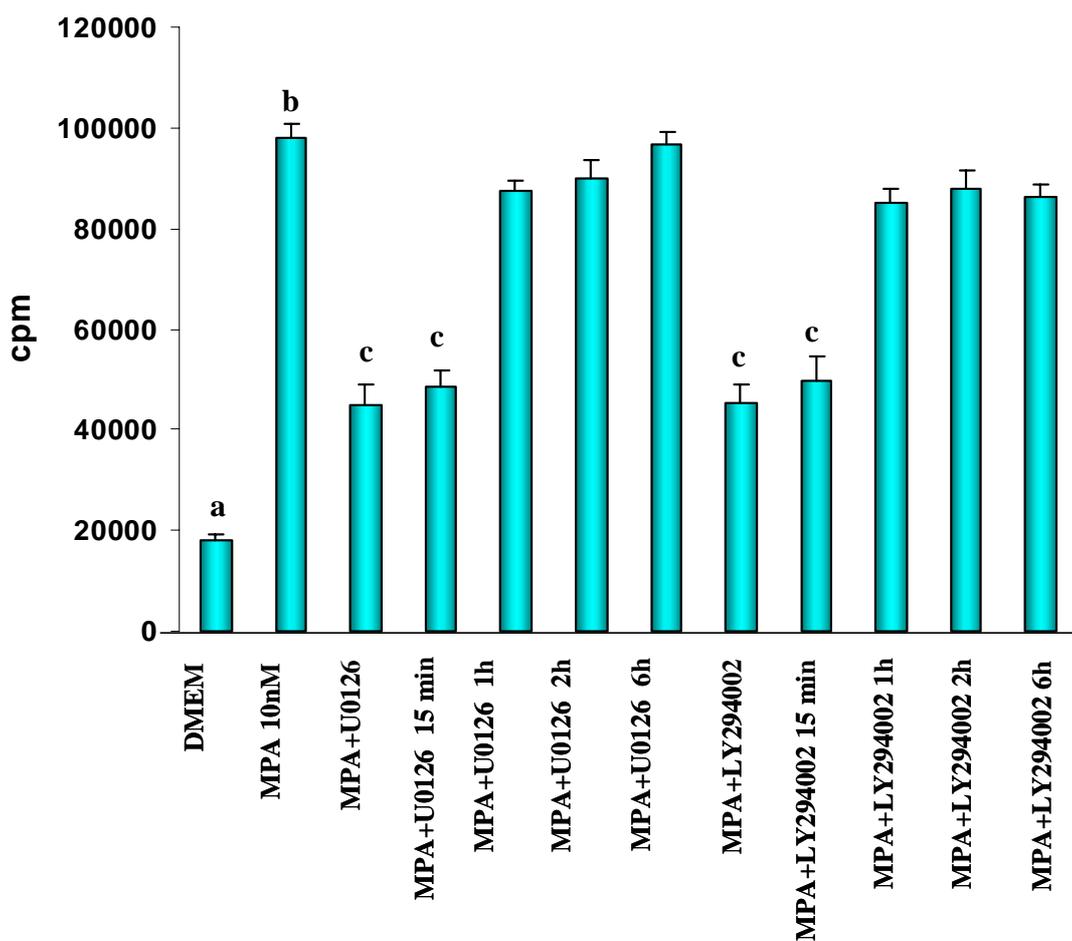
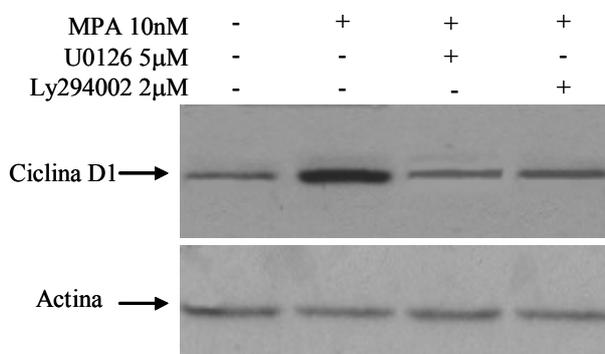


Figura 23. Participación de las p42/p44MAPKs y la PI-3K/Akt estimuladas por MPA en la proliferación de las C4HD inducida por el progestágeno

Las células C4HD fueron estimuladas con MPA, preincubadas con U0126 5 μ M y Ly294002 2 μ M previo al tratamiento con MPA (MPA+U0126 o MPA+Ly294002), estimuladas con MPA y luego tratadas con estos inhibidores por los tiempos indicados o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina [3 H] se utilizó como una medida de la síntesis de DNA. Los datos se presentan como la media \pm ES de octuplicados. b vs a, c vs b, d vs c $p < 0.001$. Se muestra un experimento representativo de 3.

Se investigó luego la importancia de la activación de las MAPKs y la vía PI-3K/Akt por MPA en la regulación de genes endógenos estimulados por progestágenos y que carecen de PREs. En particular, se estudiaron genes involucrados en la proliferación celular como ciclina D1 (66) y ErbB2 (70). Acorde a lo esperado, el tratamiento con MPA aumentó la expresión de ciclina D1 (Figura 24A) y ErbB-2 (Figura 24B) en las células C4HD. La presencia de los inhibidores específicos de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3k/Akt revirtió el efecto del MPA en la expresión de ambas proteínas (Figura 24A y B). Estos resultados indican que la rápida activación de vías de traducción de señales por progestágenos estimula la proliferación celular mediante regulación de la expresión de genes como ciclina D1 y ErbB-2.

A)



B)

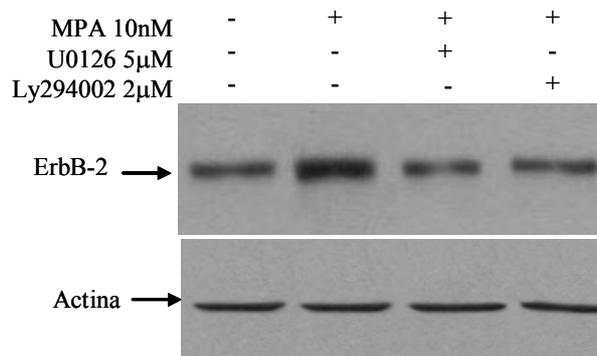


Figura 24. MPA aumenta la expresión de ciclina D1 y ErbB-2 mediante la activación de las p42/p44MAPKs y PI-3K/Akt.

Cultivos primarios de células C4HD fueron tratados con MPA por 24hs o preincubadas con los inhibidores U0126 y Ly294002 previo a la estimulación con MPA. Cincuenta μg de proteínas de extracto total de C4HD fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra ciclina D1 (A) o contra ErbB-2 (B). La membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra actina total. Se muestra un experimento representativo de 3.

El MPA induce la proliferación de las LM3 y T47D-Y en forma independiente de la actividad transcripcional del receptor de progesterona: Participación de las MAPKs y PI-3K/Akt

La participación de las vías de transducción de señales en la proliferación inducida por progestágenos fue analizada en las células LM3 y T47D-Y transfectadas con el RP. Como se muestra en la Figura 25A, la proliferación basal de las LM3-RP-B fue significativamente menor a la observada en las LM3 *wild type* o en las LM3-pSG5, indicando que la sola expresión del RP disminuye la proliferación basal de células de carcinoma mamario. El tratamiento con MPA aumentó ($50\pm 3\%$) la proliferación de las LM3-RP-B mientras que el crecimiento de las LM3 *wild type* no presentó diferencias en presencia del progestágeno (Figura 25A). La proliferación basal de las LM3 o LM3-RP-B no se modificó por el tratamiento con el antiprogestágeno RU486 y los inhibidores U0126 y Ly294002 (Figura 25A). Sin embargo, los inhibidores disminuyeron significativamente la proliferación inducida por MPA (Figura 25A).

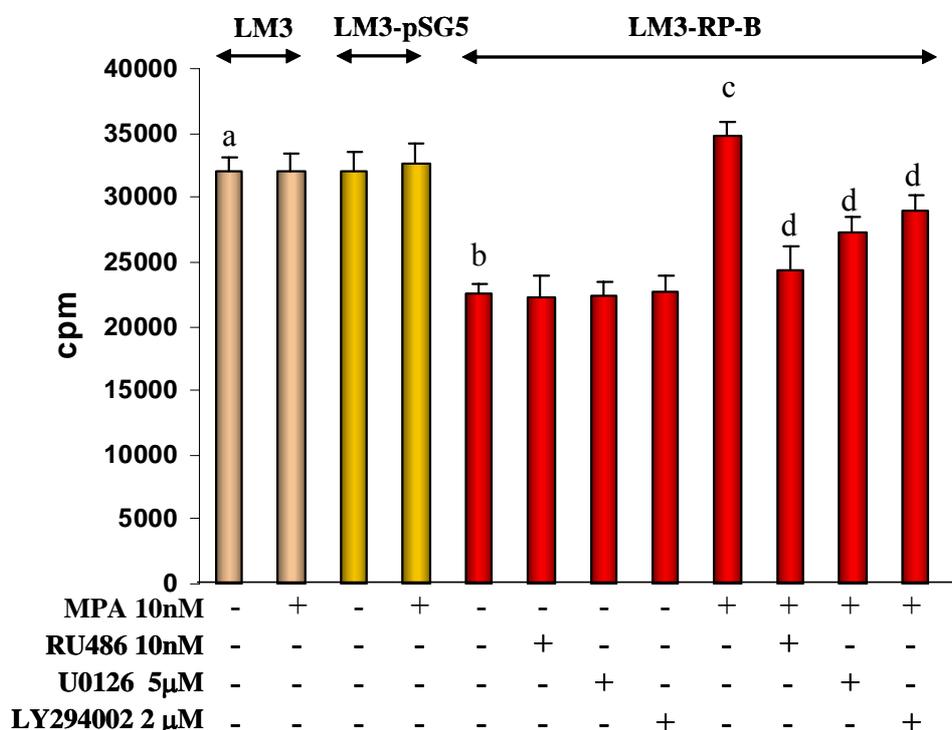


Figura 25A. El bloqueo de las p42/p44MAPKs y la PI-3K/Akt inhiben la proliferación inducida por MPA de las LM3 transfectadas con RP

Las células LM3 fueron transfectadas con pSG5, con RP-B o permanecieron sin transfectar. Luego fueron estimuladas con MPA, RU486, U0126 y Ly294002, preincubadas con estos inhibidores previo al

tratamiento con MPA o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina [^3H] se utilizó como una medida de la síntesis de DNA. Los datos se presentan como la media \pm ES de octuplicados. b vs a, c vs b, d vs c $p < 0.001$. Se muestra un experimento representativo de 4.

Resultados similares fueron obtenidos en las células T47D-Y en las cuales la expresión del RP disminuyó su proliferación basal mientras que el tratamiento con MPA aumentó la proliferación ($40 \pm 2\%$) de las T4YD-Y-RP (Figura 25B). La presencia de los inhibidores RU486, U0126 y Ly294002 disminuyó la proliferación inducida por el progestágeno sin afectar la proliferación basal de las T47D-Y *wild type* o trasfectadas con RP (Figura 25B).

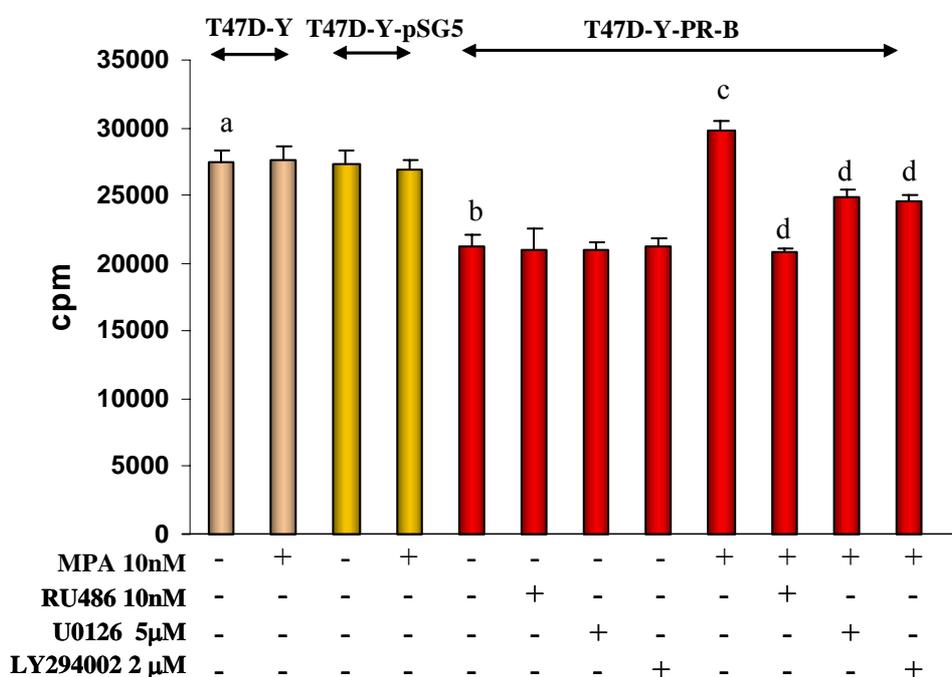


Figura 25B. El bloqueo de las p42/p44MAPKs y la PI-3K/Akt inhiben la proliferación inducida por MPA de las T47D-Y transfectadas con RP

Las células T47D-Y fueron transfectadas con pSG5, con RP-B o permanecieron sin transfectar. Luego fueron estimuladas con MPA, RU486, U0126 y Ly294002, preincubadas con estos inhibidores previo al tratamiento con MPA o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina [^3H] se utilizó como una medida de la síntesis de DNA. Los datos se presentan como la media \pm ES de octuplicados. b vs a, c vs b, d vs c $p < 0.001$. Se muestra un experimento representativo de 4.

Para determinar la capacidad del MPA de inducir la proliferación celular en forma independiente de la actividad transcripcional del RP las células LM3 fueron

transfectadas con la mutante incapaz de unirse a PRE, C587A-RP. Como se muestra en la Figura 26A, la proliferación de las LM3-C587A-RP fue menor a la observada en las LM3 sin transfectar o transfectadas con el vector vacío, indicando que la expresión de la mutante disminuye la proliferación basal de las LM3. El tratamiento con MPA aumenta significativamente la proliferación de las LM3-C587A-RP ($40\pm 5\%$) y, al igual que las LM3 transfectadas con el RP, el RU486 no induce la proliferación celular e inhibe el efecto del progestágeno (Figura 26A). Estos resultados indican que la proliferación inducida por MPA es un efecto no genómico del RP. La presencia de los inhibidores U0126 y Ly294002 bloquearon la proliferación inducida por MPA demostrando la participación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en este efecto (Figura 26A). Con el objetivo de confirmar la capacidad del MPA de inducir la proliferación celular en forma independiente de la actividad transcripcional del RP, las células LM3 fueron transfectadas con una mutante del RP, desarrollada por Edwards y colaboradores, en la cual tres prolinas claves en la interacción del RP con c-Src fueron reemplazadas por alaninas, impidiendo la activación de vías de transducción de señales dependientes de c-Src (116). Como se muestra en la Figura 26A las LM3 transfectadas con la mutante RP-BmPro presentaron una menor proliferación basal respecto a las LM3 *wild type*. A diferencia de lo observado en las LM3-RP y LM3-C587A-RP, el MPA no fue capaz de aumentar la proliferación de las LM3-RP-BmPro (Figura 26A).

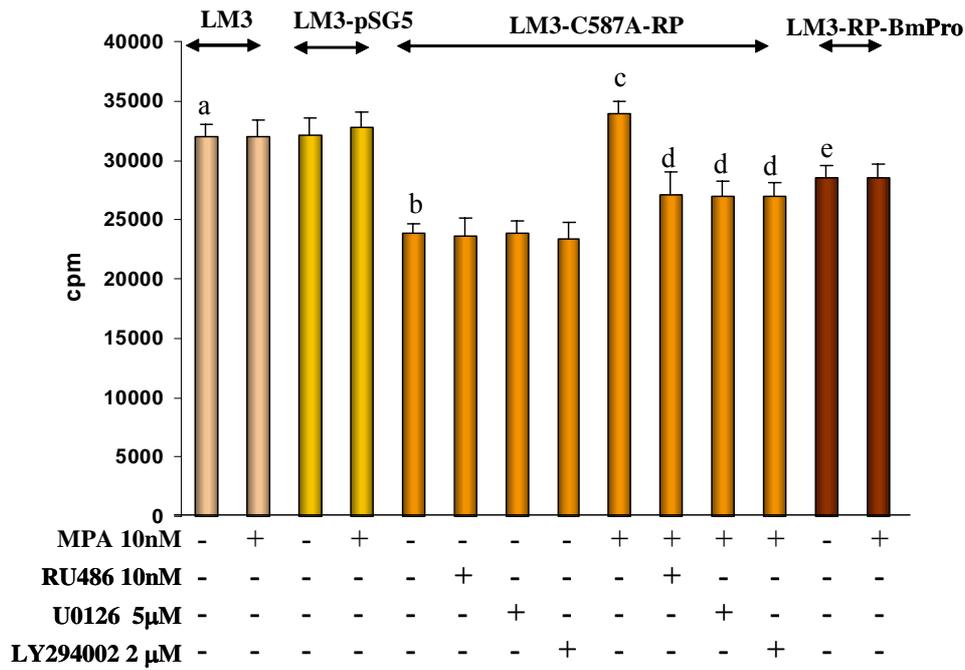


Figura 26A. MPA induce la proliferación de las LM3 en forma independiente de la actividad transcripcional del RP

Las células LM3 fueron transfectadas con pSG5, C587A-RP, RP-BmPro o permanecieron sin transfectar. Luego fueron estimuladas con MPA, RU486, U0126 y Ly294002, preincubadas con estos inhibidores previo al tratamiento con MPA o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina [3 H] se utilizó como una medida de la síntesis de DNA. Los datos se presentan como la media \pm ES de octuplicados. b y e vs a, c vs b, d vs c $p < 0.001$. Se muestra un experimento representativo de 4.

Resultados similares fueron observados en las T47D-Y en las cuales la proliferación de las células transfectadas con C587A-RP y RP-BmPro fue menor respecto a la observada en las células sin transfectar o transfectadas con pSG5 (Figura 26B). El tratamiento con MPA aumentó la proliferación de las T47D-Y-C587A-RP ($33 \pm 6\%$) siendo este efecto inhibido por la presencia de RU486, U0126 y Ly294002 (Figura 26B). De acuerdo a lo esperado, el MPA no fue capaz de inducir el crecimiento de las T47D-Y-RP-BmPro (Figura 26B).

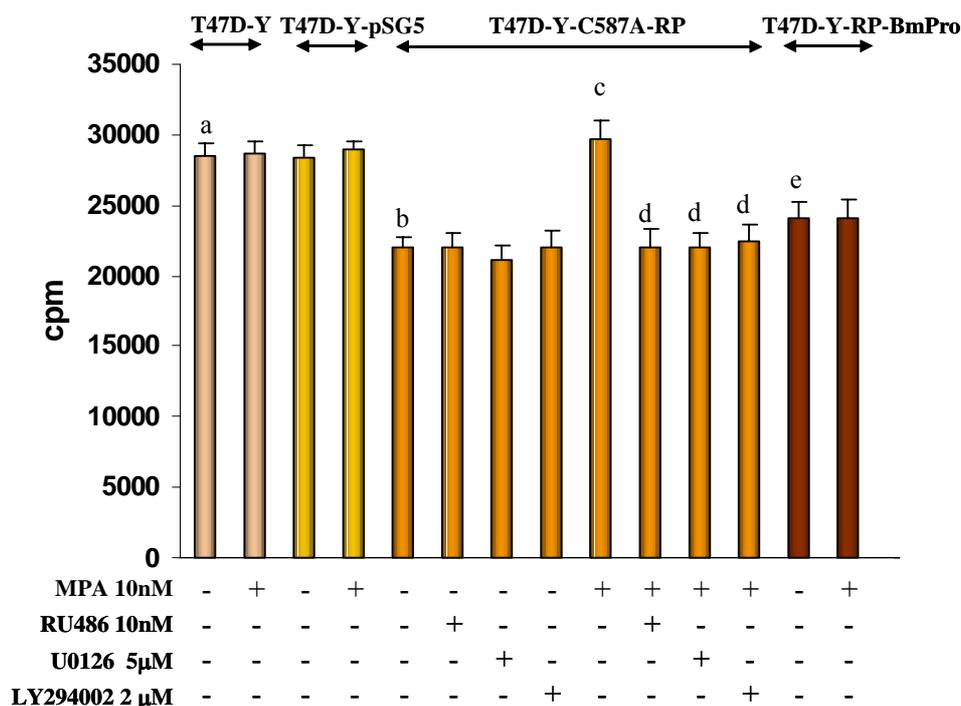


Figura 26B. MPA induce la proliferación de las T47D-Y en forma independiente de la actividad transcripcional del RP

Las células T47D-Y fueron transfectadas con pSG5, C587A-RP, RP-BmPro o permanecieron sin transfectar. Luego fueron estimuladas con MPA, RU486, U0126 y Ly294002, preincubadas con estos inhibidores previo al tratamiento con MPA o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina [^3H] se utilizó como una medida de la síntesis de DNA. Los datos se presentan como la media \pm ES de octuplicados. b y e vs a, c vs b, d vs c $p < 0.001$. Se muestra un experimento representativo de 4.

Expresión y actividad transcripcional de la mutante RP-BmPro

Los niveles de expresión de la mutante RP-BmPro y el RP *wilde type* son comparables y ambos receptores muestran el característico *upshift* y *downregulation* luego de la estimulación con el ligando (calles 4 y 5, Figura 27A). La mutante RP-BmPro además es capaz de regular la transcripción de p21 mediante el mecanismo de *tethering*. Como se muestra en la Figura 27B, el tratamiento con MPA aumentó significativamente la expresión de p21 tanto en las LM3-RP-B como en las LM3-RP-BmPro con un máximo a las 36hs de tratamiento.

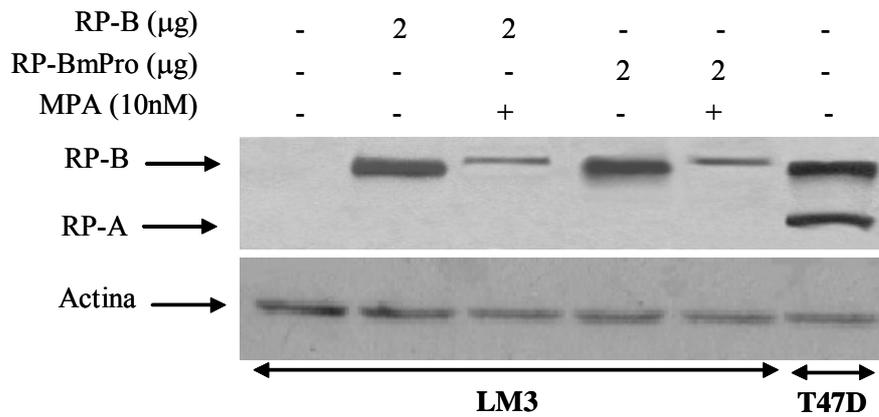


Figura 27A. Expresión de la mutante *RP-BmPro* en células *LM3* transfectadas

Las células *LM3* fueron transfectadas en forma transiente con 2 del *RP* o *RP-BmPro* o permanecieron sin tratar. Las células fueron luego estimuladas o no con *MPA* por 48hs. Cien μg de proteínas de extracto total de *LM3* fueron corridas en un *SDS-PAGE* y se revelaron con un anticuerpo contra *RP* o con un anticuerpo contra *Actina* como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3.

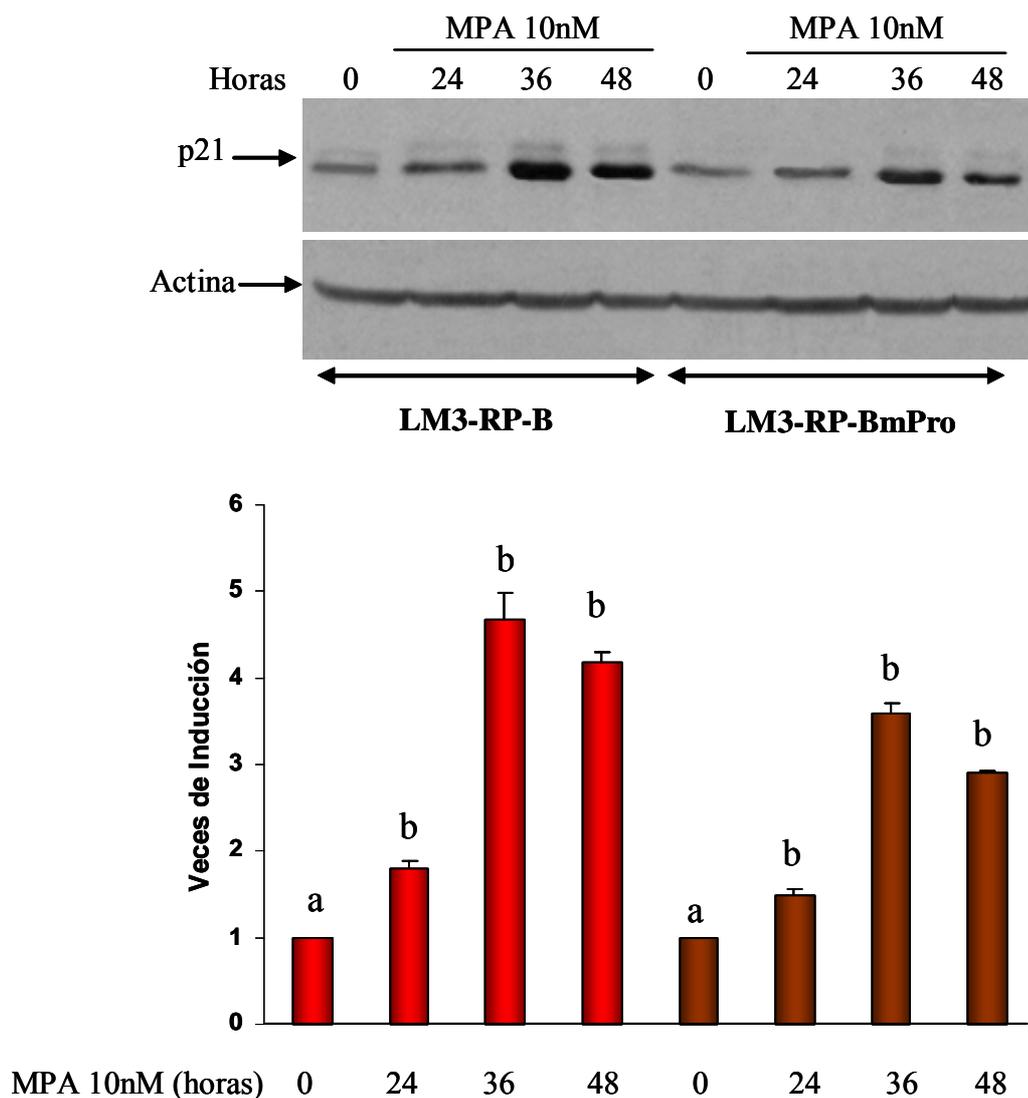


Figura 27B. Actividad transcripcional de la mutante RP-BmPro en genes endógenos

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con RP o RP-BmPro. Luego fueron estimuladas con MPA por los tiempos indicados o permanecieron sin tratar. *Panel Superior:* Cincuenta μ g de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra p21. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con un anticuerpo contra actina como control de carga. *Panel inferior:* Las bandas de p21 fueron densitometradas y sus valores normalizados por las bandas de actina. Los resultados se representan como veces de inducción respecto a las células sin tratar. Los datos representan la media de 5 experimentos \pm ES. b vs a $p < 0.001$.

Como se mencionó más arriba, la mutante RP-BmPro es incapaz de activar vías de transducción de señales dependientes de c-Src. En la Figura 27C se muestra que el tratamiento con MPA no induce la activación las p42/p44MAPKs (panel superior) y la vía PI-3K/Akt (panel inferior) en las LM3-RP-BmPro. Resultados similares en cuanto a

la expresión y función de RP-BmPro fueron observados en las T47D-Y (datos no mostrados).

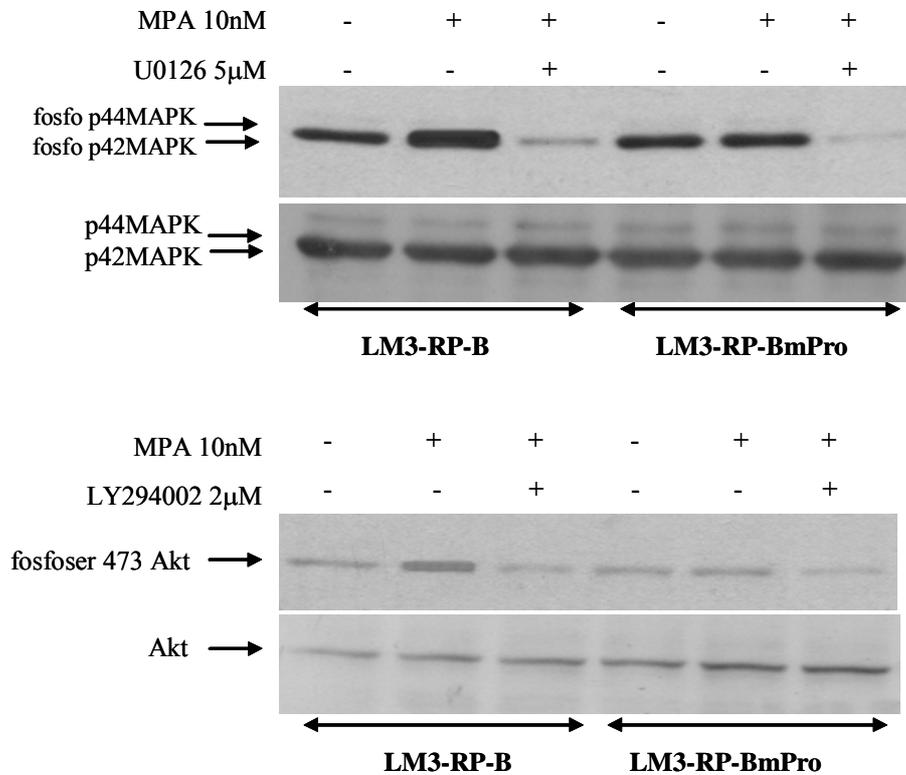


Figura 27C. La mutante RP-BmPro no es capaz de activar las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en las LM3

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con el RP, RP-BmPro o permanecieron sin transfectar. Las células fueron luego estimuladas con MPA durante 5 minutos o preincubadas con U0126 o Ly294002 previo a la estimulación con MPA. Cincuenta µg de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE. *Panel superior:* Las proteínas se revelaron con un anticuerpo contra fosfo p42/p44MAPKs y la membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra p42/p44MAPKs totales. *Panel inferior:* Las proteínas se revelaron con un anticuerpo contra fosfo ser Akt y la membrana fue luego *sometida a stripping* y revelada con un anticuerpo contra Akt total. Se muestra un experimento representativo de 4.

El MPA induce la supervivencia de las LM3 en forma independiente de la actividad transcripcional del receptor de progesterona

Se investigó además el efecto del MPA en la supervivencia de células LM3 transfectadas con el RP y sus mutantes mediante un ensayo de clonogenicidad, en el

cual las células son sometidas a condiciones extremas de cultivo al ser sembradas en muy baja densidad. Luego de 5 días de tratamiento se realiza el recuento de las colonias que sobrevivieron. A diferencia del ensayo de incorporación de timidina [^3H], el ensayo de clonogenicidad permite analizar tanto supervivencia como proliferación celular. Como se muestra en la Figura 28, la supervivencia de las LM3-RP-B, LM3-C587A-RP y LM3-RP-BmPro fue significativamente menor a la observada en las LM3 transfectadas con el vector vacío. El tratamiento con MPA aumentó la supervivencia de las LM3-RP-B y LM3-C587A-RP mientras que no se observaron diferencias en el número de colonias en las LM3-RP-BmPro en presencia del progestágeno (Figura 28). Estos resultados demuestran que el aumento en la supervivencia celular es un efecto no genómico del RP.

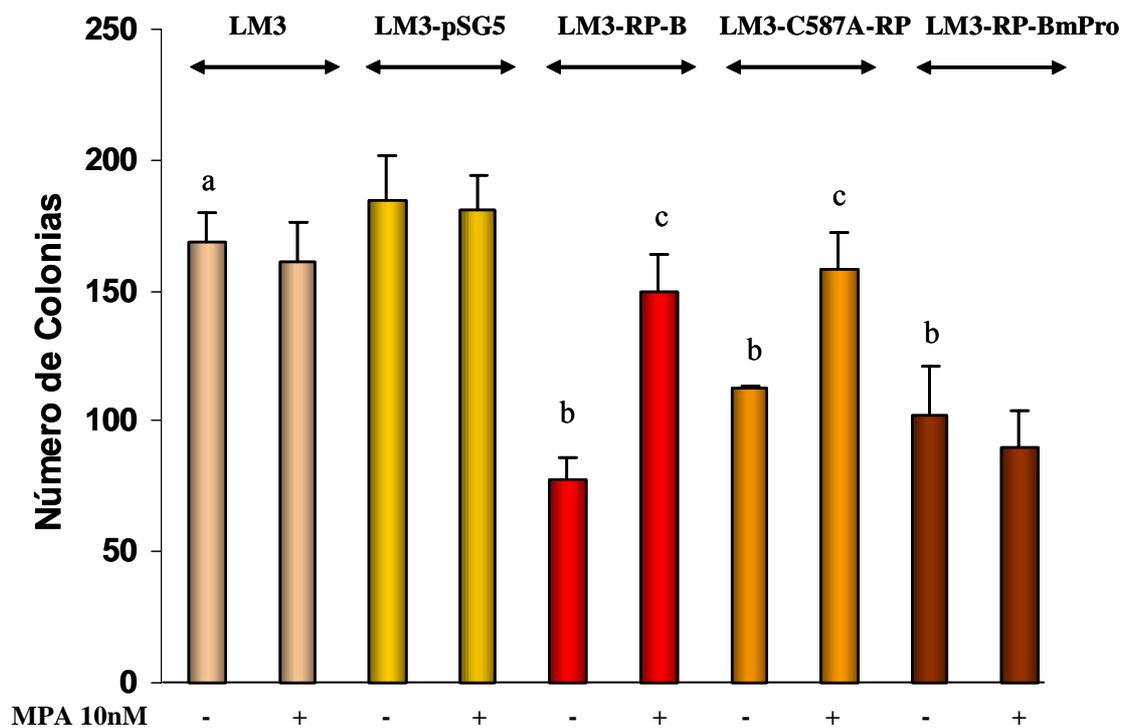


Figura 28. MPA induce la supervivencia de las LM3 en forma independiente de la actividad transcripcional del RP

Las células LM3 *wild type*, LM3-pSG5, LM3-RP-B, LM3-C587A-RP, LM3-RP-BmPro fueron sembradas en muy baja densidad (500 células/hoyo) y estimuladas con MPA en DMEM 10% SBF charcolizado por 5 días o permanecieron en DMEM 10% SBF charcolizado (Ver Materiales y Métodos). Las células fueron luego fijadas, teñidas y se realizó el recuento de colonias conteniendo más de 20

células. El ensayo de clonogenicidad se utilizó como una medida de la supervivencia celular. Los datos se presentan como la media \pm ES. b vs a y c vs b $p < 0.01$. Se muestra un experimento representativo de 4.

Los resultados de esta segunda parte demuestran que el MPA es capaz de inducir la proliferación de células de carcinoma mamario murino y humano en forma independiente de la actividad transcripcional del RP y mediante la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt.

PARTE III

En esta tercera y última parte del trabajo se evaluaron los efectos no genómicos del MPA en la regulación de la actividad de proteasas involucradas en el proceso de invasión y la capacidad metastásica de células LM3.

El MPA disminuye la actividad de proteasas involucradas en el proceso de invasión tumoral en células C4HD

La degradación proteolítica de la matriz extracelular juega un rol esencial en el proceso de invasión tumoral y forma parte de la cascada metastásica. Este proceso es realizado por proteasas, principalmente activadores de plasminógeno, como el activador de plasminógeno (PA) tipo uroquinasa (uPA), y las metaloproteasas (MMPs), incluyendo colagenasas, y gelatinasas como MMP-2 y MMP-9 (129). Generalmente, las proteasas se sintetizan como proenzimas inactivas o zimógenos, completando su activación en el exterior celular (129). Sus niveles de expresión y la regulación de sus actividades fueron el objeto de estudio de numerosos trabajos. Sin embargo, la modulación de la actividad de uPA y las MMP-2 y 9 por progestágenos en células de cáncer de mama permanece poco explorada. Trabajos previos demuestran que los progestágenos son capaces de inhibir la actividad de uPA en células endometriales (130), aumentando además los niveles de su inhibidor PAI (inhibidor de PA), su internalización y posterior degradación (131). Se observó además que la progesterona es capaz de inhibir la secreción de uPA en células de carcinoma de ovario (132) y disminuir los niveles de mRNA en células de carcinoma mamario (133). Consistentemente, la actividad de la MMP-2 y la MMP-9 disminuyó por la presencia de progestágenos en explantes de útero (134) y en células de carcinoma mamario (135).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad del MPA de regular la actividad de las MMP-2, MMP-9 y uPA en el modelo de carcinogénesis hormonal dependiente de progestágenos C4HD. La actividad proteolítica fue evaluada mediante zimografías de gelatina para las MMPs y de caseína y plasminógeno para uPA en medios condicionados de C4HD creciendo en medio libre de suero. Como se muestra en la Figura 29A, el tratamiento de las C4HD con MPA resultó en una disminución

significativa de la actividad de las MMP-2 ($58 \pm 7\%$), MMP-9 ($44 \pm 6\%$) y uPA ($51 \pm 7\%$). La presencia de RU486 no modificó la actividad de las proteasas mientras que revirtió completamente el efecto inhibitorio del MPA (Figura 29A). La especificidad de la actividad de las MMPs se determinó mediante la ausencia de bandas luego de incubación con EDTA (Figura 29A). Las zimografías en las que se evaluó la actividad de uPA no presentaron bandas inespecíficas en ausencia de plasminógeno (Figura 29A).

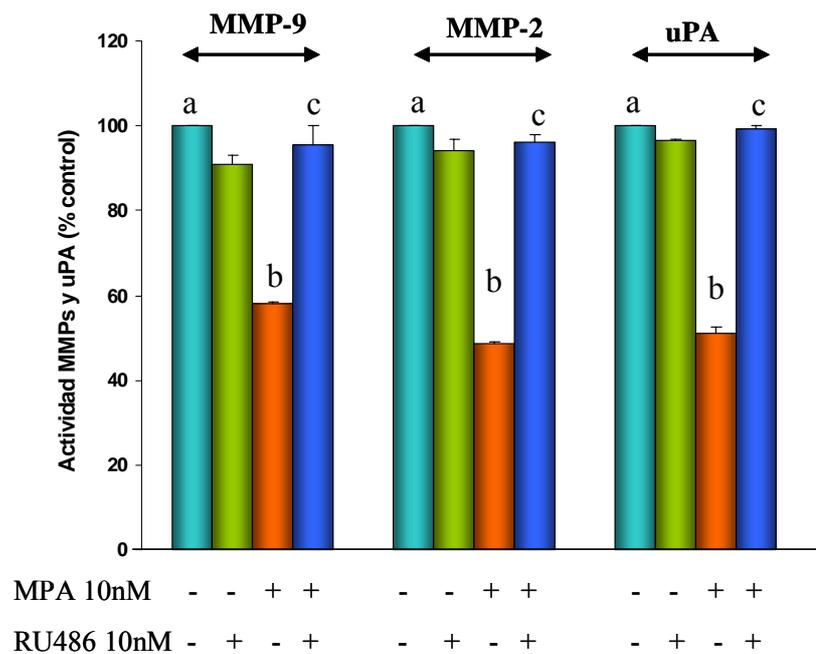
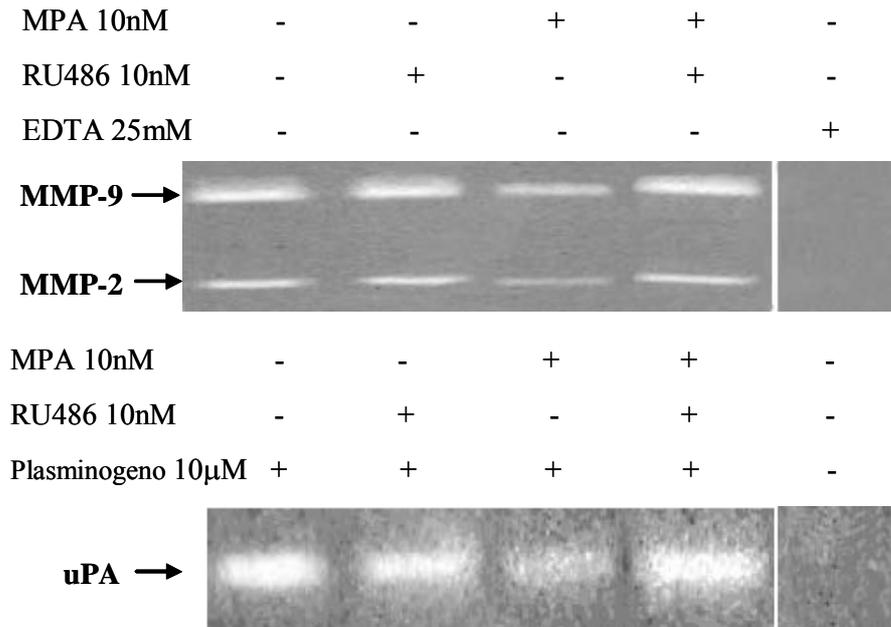


Figura 29A. MPA inhibe la actividad de las MMP-2, MMP-9 y uPA en células C4HD

Cultivos primarios de células C4HD fueron estimulados con MPA, RU486, preincubadas con RU486 previo a la estimulación con MPA o permanecieron sin tratar en DMEM libre de suero por 24hs. Se colectaron los medios condicionados y las células fueron lisadas para determinar la cantidad de proteínas. Las actividades de las MMPs (*panel superior*) y uPA (*panel medio*) fueron determinadas mediante zimografías de gelatina o caseína y plasminógeno respectivamente. Las zimografías incubadas con EDTA o sin plasminógeno se utilizaron como medida de la especificidad de la actividad de las proteasas. Se muestra un experimento representativo de 6. *Panel Inferior*: Las bandas fueron densitometradas y corregidas por la cantidad de proteínas. Los datos se presentan como porcentaje del control. b vs a y c vs b $p < 0.001$.

Para determinar el efecto del MPA en los niveles y expresión de las proteasas, se realizaron ensayos de Western Blot en medios condicionados y extractos celulares totales de C4HD. Al igual que el efecto observado sobre la actividad, los niveles (Figura 29B) y expresión (Figura 29C) de las MMP-2, MMP-9 y uPA disminuyó significativamente luego del tratamiento con MPA.

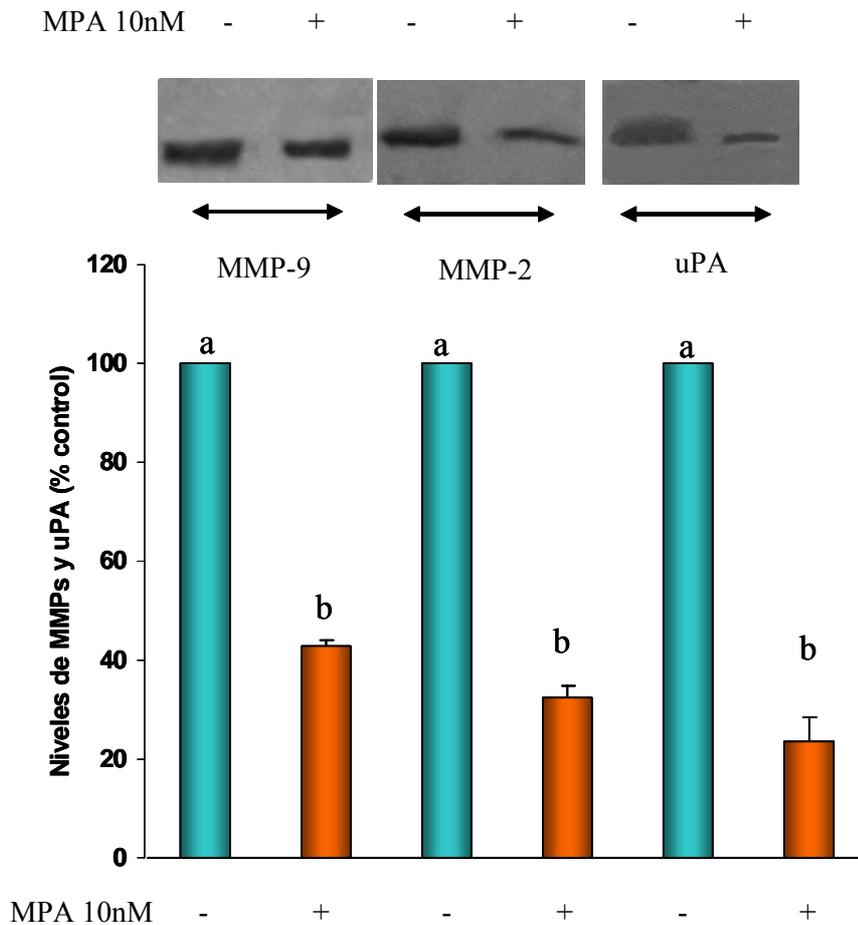
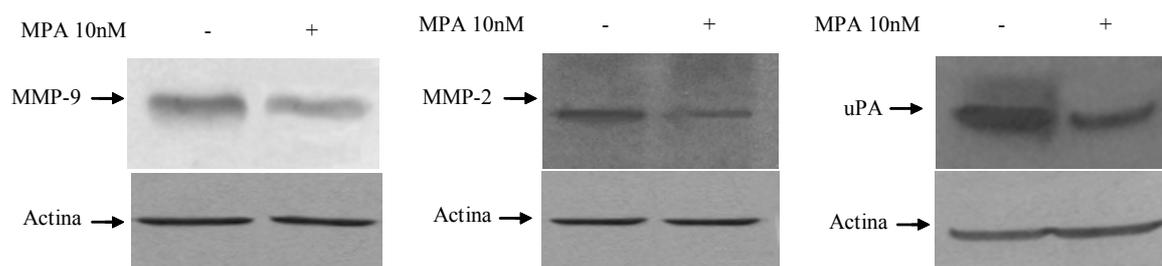


Figura 29B. MPA disminuye los niveles de las MMP-2, MMP-9 y uPA en células C4HD

Cultivos primarios de células C4HD fueron estimulados con MPA o permanecieron sin tratar en DMEM libre de suero por 24hs. Los medios condicionados se colectaron y concentraron y las células fueron lisadas para determinar la cantidad de proteínas. *Panel Superior:* Los niveles de las MMPs y uPA fueron determinados mediante ensayos de WB revelados con anticuerpos contra MMP-2, MMP-9 y uPA. Se muestra un experimento representativo de 3. *Panel Inferior:* Las bandas fueron densitometradas y corregidas por la cantidad de proteínas. Los datos se presentan como porcentaje del control. b vs a $p < 0.001$.

**Figura 29C.** MPA disminuye la expresión de las MMP-2, MMP-9 y uPA en células C4HD

Cultivos primarios de células C4HD fueron estimulados con MPA o permanecieron sin tratar en DMEM libre de suero por 24hs. Ochenta μg de proteínas de extracto total de C4HD fueron corridas en un SDS-PAGE. Las proteínas se revelaron con anticuerpos contra MMP-2, MMP-9 y uPA y la membrana fue luego sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo contra actina. Se muestra un experimento representativo de 3.

Se investigó luego la participación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en la inhibición de la actividad de proteasas por MPA. El bloqueo de las p42/p44MAPKs no tuvo efecto en la disminución de la actividad de MMPs por MPA mientras que revirtió el efecto del progestágeno en la actividad de uPA (Figura 29D). Por el contrario, la presencia del inhibidor Ly294002 revirtió la disminución en la actividad de las MMPs por MPA y no modificó el efecto del progestágeno sobre la actividad de uPA (Figura 29D). Es importante destacar que los inhibidores de ambas vías no tuvieron efecto sobre la actividad basal de las MMP-2, MMP-9 y uPA (Figura 29D).

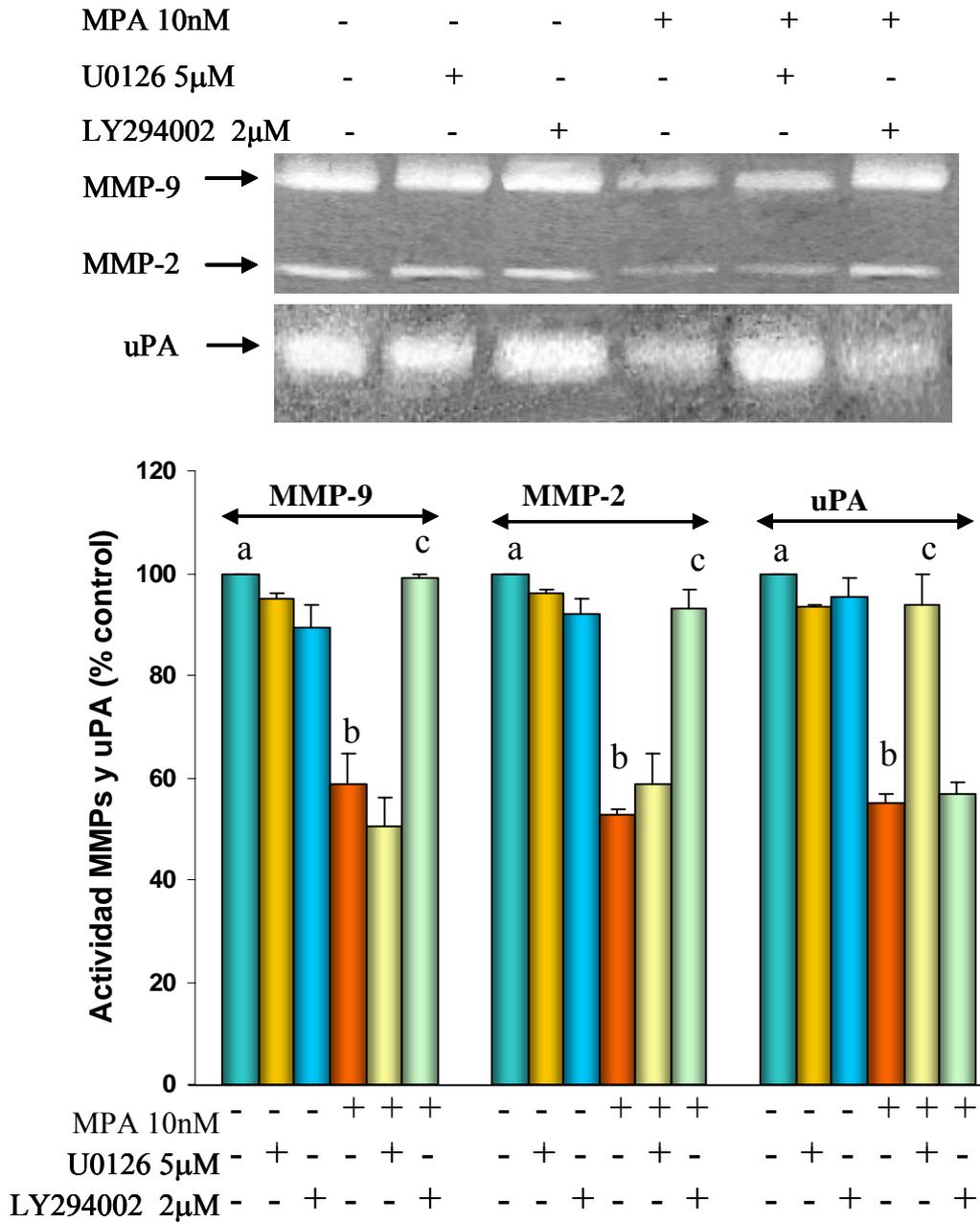


Figura 29D. Participación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en la inhibición de la actividad de proteasas por MPA en células C4HD

Cultivos primarios de células C4HD fueron estimulados con MPA, U0126, Ly294002, preincubadas con estos inhibidores previo a la estimulación con MPA o permanecieron sin tratar en DMEM libre de suero por 24hs. Los medios condicionados se colectaron y las células fueron lisadas para determinar la cantidad de proteínas. *Panel Superior:* Actividad de las MMPs y uPA. Se muestra un experimento representativo de 4. *Panel Inferior:* Las bandas fueron densitometradas y corregidas por la cantidad de proteínas. Los datos se presentan como porcentaje del control. b vs a y c vs b p<0.001.

El MPA regula la actividad de proteasas en forma independiente de la actividad transcripcional del receptor de progesterona

Para determinar los mecanismos genómicos y no genómicos del RP involucrados en la regulación de la actividad de proteasas por MPA se utilizó el modelo experimental de carcinoma mamario murino LM3. Trabajos previos demostraron la presencia de altos niveles de expresión y actividad de uPA en esta línea celular (136;137). Se analizó entonces la capacidad del MPA de regular la actividad de uPA en las LM3-RP-B y en las LM3 transfectadas con las mutantes del RP, C587A-RP y RP-BmPro. Como se muestra en la Figura 30A la actividad de uPA disminuyó significativamente luego del tratamiento con MPA en las LM3-RP-B ($35\pm 4\%$) y en las LM3-C587A-RP ($37\pm 5\%$) indicando que este efecto es independiente de la actividad transcripcional del RP. La presencia de RU486 revirtió completamente esta inhibición (Figura 30A). Por otra parte, el tratamiento con el progestágeno no indujo cambios significativos en la actividad de uPA en las células LM3-RP-BmPro (Figura 30A).

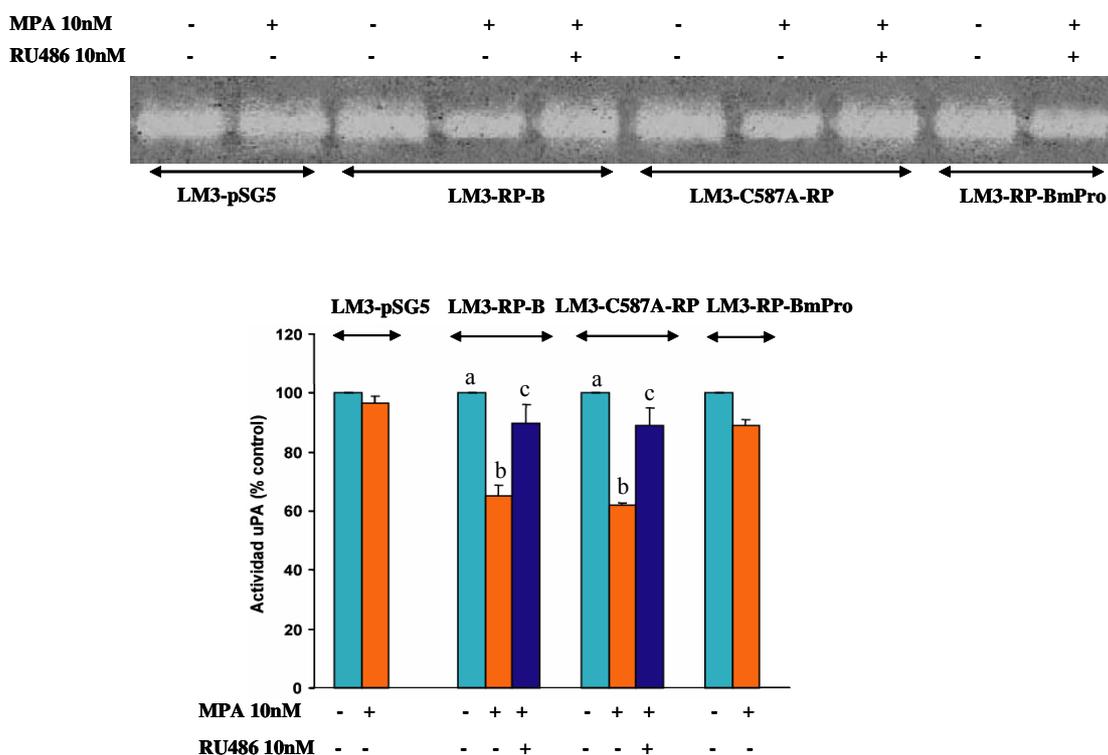


Figura 30A. MPA disminuye la actividad de uPA mediante efectos no genómicos del RP

Las células LM3-pSG5, LM3-RP-B, LM3-C587A-RP y LM3-RP-BmPro fueron estimuladas con MPA, preincubadas con RU486 previo a la estimulación con MPA o permanecieron en DMEM libre de suero

por 24hs. Los medios condicionados se colectaron y las células fueron lisadas para determinar la cantidad de proteínas. *Panel Superior*: Actividad de uPA. Se muestra un experimento representativo de 4. *Panel Inferior*: Las bandas fueron densitometradas y corregidas por la cantidad de proteínas. Los datos se presentan como porcentaje del control. b vs a y c vs b $p < 0.001$, d vs a $p < 0.05$.

Se investigó además la participación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en la inhibición de la actividad de uPA por MPA en las LM3-RP-B y en las LM3-C587A-RP. Como se muestra en la Figura 30B la presencia de los inhibidores U0126 y Ly294002 no modificaron la actividad basal de uPA en las LM3 transfectadas RP-B o con C587A-RP. Sin embargo, revirtieron completamente la inhibición de la actividad de uPA por MPA en las LM3 transfectadas con ambos tipos de receptores (Figura 30B).

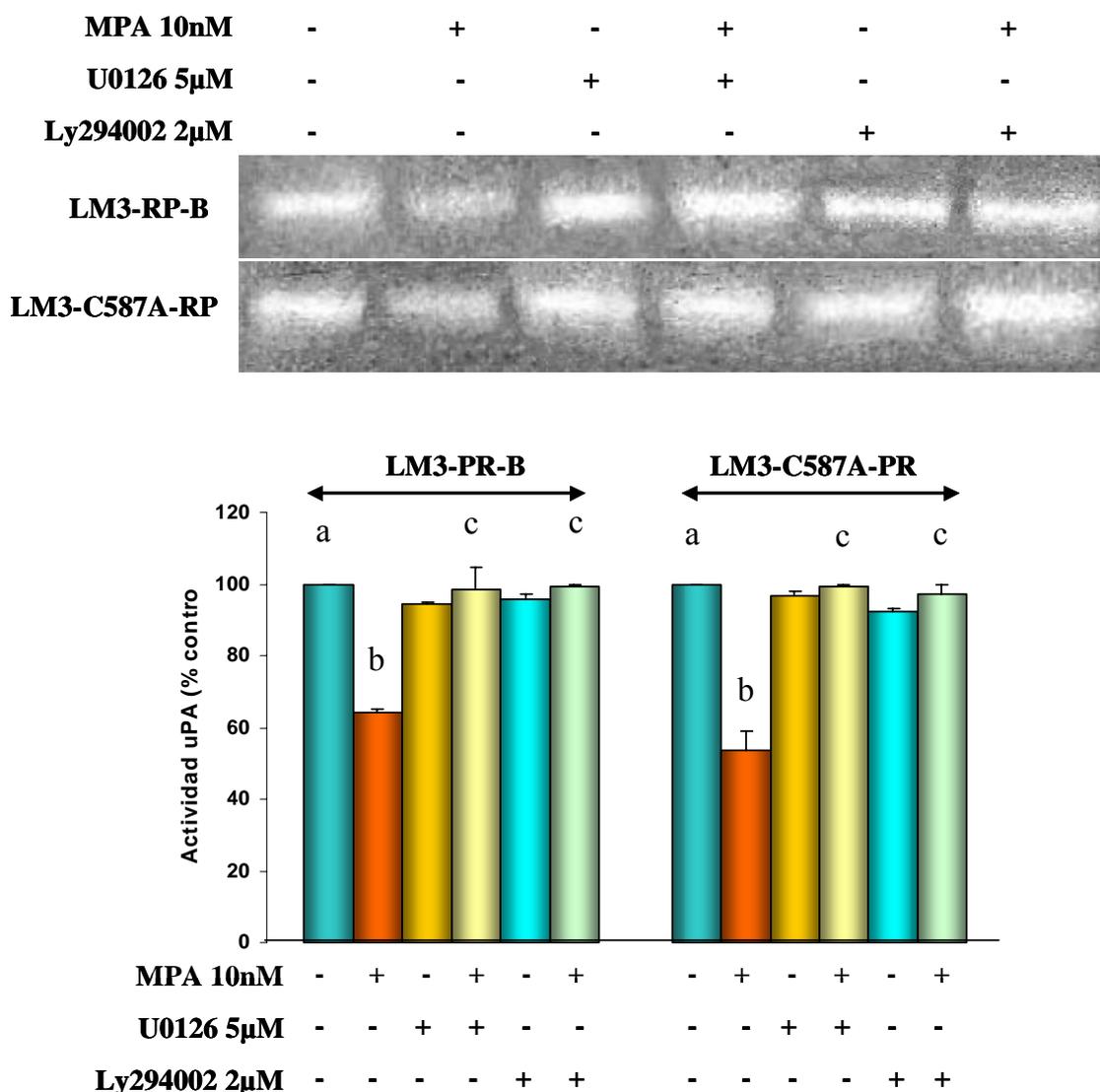


Figura 30B. Participación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en la inhibición de la actividad de uPA por MPA en las LM3

Las células LM3-RP-B y LM3-C587A-RP fueron estimuladas con MPA, U0126, Ly294002, preincubadas con estos inhibidores previo a la estimulación con MPA o permanecieron en DMEM libre de suero por 24hs. Los medios condicionados se colectaron y las células fueron lisadas para determinar la cantidad de proteínas. *Panel Superior:* Actividad de uPA. Se muestra un experimento representativo de 3. *Panel Inferior:* Las bandas fueron densitometradas y corregidas por la cantidad de proteínas. Los datos se presentan como porcentaje del control. b vs a y c vs b $p < 0.001$.

Efectos genómicos y no genómicos del receptor de progesterona en la regulación de la capacidad metastásica de células LM3

En el presente trabajo se demostró que la expresión del RP disminuye la proliferación basal de las células LM3. Como se mencionó previamente, este modelo experimental presenta una gran capacidad invasiva y metastásica. Se investigó entonces el efecto de la expresión del RP en la capacidad metastásica de las LM3, analizando los mecanismos transcripcionales o no transcripcionales involucrados. Para ello se realizó un ensayo de metastásis experimental *in vivo* en el cual se evalúa la habilidad de las LM3 de formar metástasis pulmonares. En este tipo de ensayos las células son inyectadas directo en la circulación del animal omitiendo los primeros pasos de la cadena metastásica y evaluando el crecimiento en un tejido secundario distante (138-142). Una vez en la circulación, las células se anclan rápidamente en la red de capilares que primero encuentren y se extravasan al órgano blanco (139). En el caso de las LM3 el órgano blanco es generalmente el pulmón (Urtreger *et al.* Int J Oncol 1997 11 489-96). El destino de diferente tipos de células metastásicas, como melanomas murinos, fibroblastos transformados, carcinomas mamarios, entre otros, se analizó por videomicroscopía (revisado en ref. 129). Los resultados indican que entre el 87 y el 98% de las células inyectadas se arrestan en el órgano blanco entre 60 y 90 minutos luego de la inoculación (138;140). Se observó además, que 3 días luego de la inyección el 83% de las células B16F1 de melanoma murino se encontraban ancladas en el parénquima hepático (138). Estos trabajos demostraron que los primeros pasos de extravasación y anclaje son altamente eficientes e indican que el desarrollo exitoso de una metástasis experimental depende de la capacidad de las células de iniciar el crecimiento y sostenerlo incluso induciendo la neovascularización del nuevo tumor. En el presente trabajo las células LM3 fueron transfectadas con el RP o sus mutantes en forma transiente previo a la inyección. Como se muestra en la Figura 31, el RP y las mutantes

C587A-RP y RP-BmPro mantienen altos niveles de expresión hasta el 7^{mo} día post-transfección indicando que las LM3 podrán extravasarse, anclarse e iniciar su crecimiento en el pulmón aún expresando el RP.

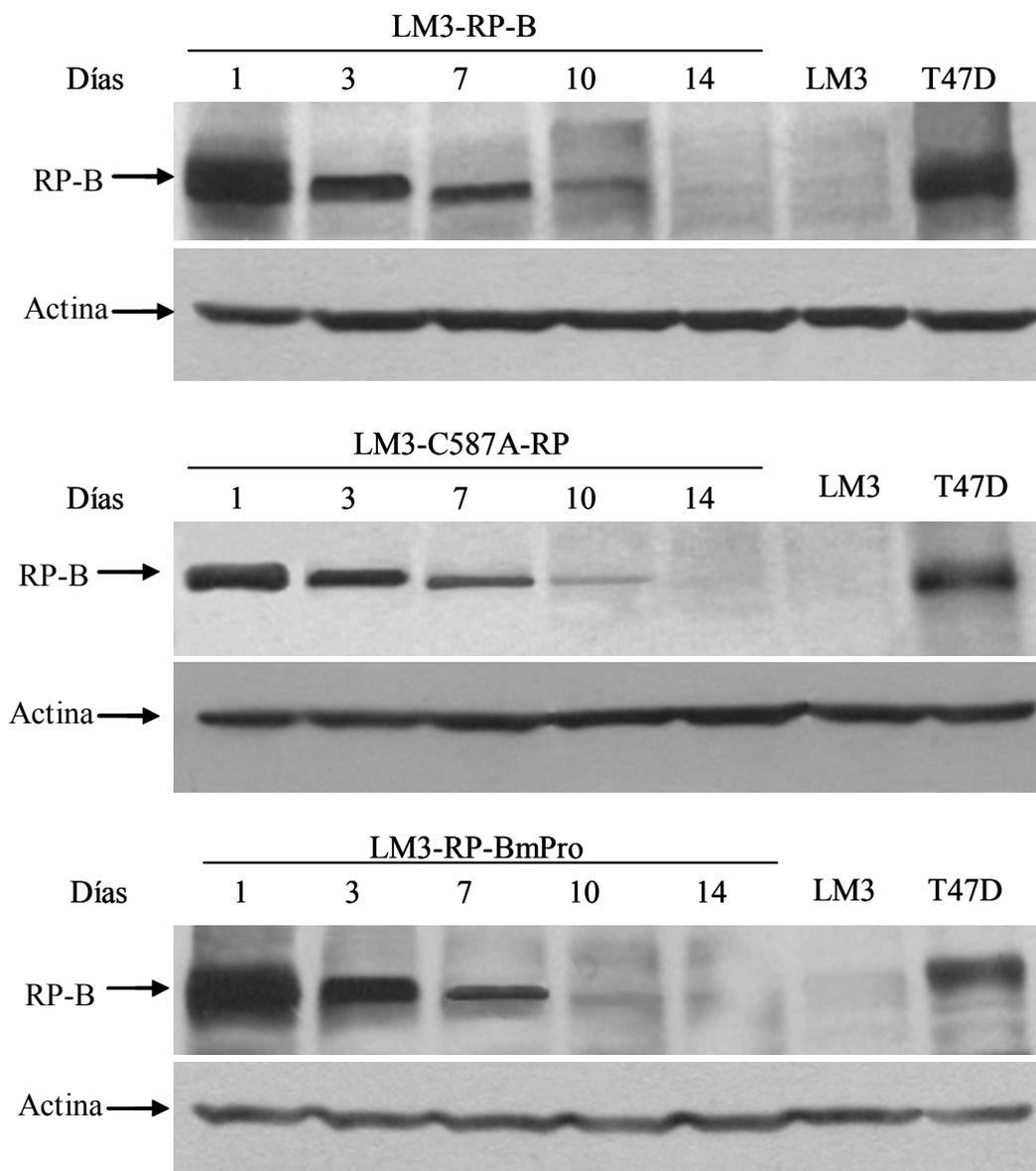


Figura 31. El RP y las mutantes C587A-RP y RP-BmPro mantienen altos niveles de expresión hasta el séptimo día post-transfección de las LM3

Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con RP (*panel superior*), C587A-RP (*panel medio*) o RP-BmPro (*panel inferior*). Las células fueron lisadas en los tiempos indicados. Cien μ g de proteínas de extracto total de LM3 fueron corridas en un SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo contra RP o con un anticuerpo contra actina como control de carga. Extractos totales de LM3 sin transfectar fueron utilizados como control negativo y extractos totales de T47D se utilizaron como control positivo. Se muestra un experimento representativo de 4.

Las LM3 *wild type*, LM3-pSG5, LM3-RP-B, LM3-C587A-RP, LM3-RP-BmPro fueron inoculadas en la vena de la cola de ratones hembra BALB/c. Estas células estuvieron expuestas a concentraciones fisiológicas de progesterona en circulación (5ng/ml). Con el objetivo de determinar el efecto de altas dosis de progestágenos administrados en forma exógena, el mismo protocolo fue realizado en ratones tratados con un pellet de 40mg de MPA. En nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que este tratamiento eleva la concentración de progestágenos a niveles no fisiológicos (49ng/ml) (121). Al cabo de 28 días los animales fueron sacrificados y se determinó el número de metástasis pulmonares. Como se muestra en la Tabla 1, el número de metástasis pulmonares en ratones inoculados con las LM3-RP-B, LM3-C587A-RP, LM3-RP-BmPro fue significativamente menor al observado en ratones inyectados con LM3 sin transfectar o transfectadas con el vector vacío. Es importante destacar que las LM3-RP-BmPro presentaron menor capacidad metastásica no solo respecto a las LM3-RP-B sino también a las LM3-C587A-RP (Tabla 1). Las LM3-RP-B y LM3-C587A-RP presentaron una mayor capacidad metastásica al ser inyectadas en ratones tratados con el pellet de MPA. Sin embargo, el número de metástasis pulmonares no se modificó al inyectar LM3-RP-BmPro en ratones tratados con MPA (Tabla 1). De acuerdo a lo esperado luego de 28 días de la inoculación, la incidencia fue pareja entre un 90 y 100% en todos los grupos. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las metástasis en cada grupo experimental (datos no mostrados). Los niveles del RP en las metástasis pulmonares analizadas por inmunohistoquímica no fueron detectables por tratarse de una transfección transiente. Sin embargo, este hallazgo no invalida los resultados obtenidos dado que, como mencionamos previamente, la capacidad y el éxito en la formación de metástasis para cada tipo celular se define en los primeros días post-inoculación donde todavía se encuentran niveles detectables del RP y sus mutantes.

Tabla 1. La expresión del RP disminuye las metástasis pulmonares

Tipo celular	Metástasis pulmonares/ratón	
	-MPA	+MPA
LM3	29 (21-41) ^a	27 (17-37)
LM3-pSG5	26 (19-37) ^a	28 (17-32)
LM3-RP-B	7 (1-23) ^b	19 (8-24) ^c
LM3-C587A-RP	9 (2-25) ^b	23 (12-31) ^c
LM3-RP-BmPro	3 (0-19) ^d	4 (0-18)

Las células LM3 (3×10^5) fueron transfectadas en forma transiente con pSG5, RP-B, C587A-RP, RP-BmPro o permanecieron sin tratar. Luego, fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones hembra BALB/c tratados o no con un pellet de 40mg de MPA (+MPA). Al cabo de 28 días los animales fueron sacrificados y se realizó el recuento del número de metástasis pulmonares superficiales. Los resultados se muestran como la mediana y rango de metástasis para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por el test de Kruskal-Wallis. b vs a, c vs b, d vs a y d vs b $p < 0.05$. Se muestra un experimento representativo de 5.

Para confirmar que la expresión del RP regula la capacidad metastásica de las LM3, el mismo protocolo experimental fue realizado sacrificando a los animales al 7^{mo} día post-inyección. Como vimos previamente, la expresión del RP y sus mutantes es detectable una semana después de la transfección (Figura 31). De acuerdo a lo esperado, el número de metástasis pulmonares al cabo de 7 días fue menor al observado en el protocolo de más larga duración. Sin embargo, los resultados obtenidos, en cuanto a la disminución de la capacidad metastásica en presencia del RP y los mecanismos moleculares involucrados, fueron similares en ambos diseños experimentales (Tabla 2).

Tabla 2. La expresión del RP disminuye las metástasis pulmonares a los 7 días post-inoculación

Tipo celular	Metástasis pulmonares/ratón	
	-MPA	+MPA
LM3	7 (2-13) ^a	5 (1-15)
LM3-pSG5	7(2-20) ^a	6 (1-19)
LM3-RP-B	2 (1-5) ^b	5 (2-15) ^c
LM3-C587A-RP	2 (1-4) ^b	6 (2-19) ^c
LM3-RP-BmPro	0 (0-2) ^d	1 (0-2)

Las células LM3 (3×10^5) transfectadas como se describió en la Tabla 1 fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones hembra BALB/c tratados o no con un pellet de 40mg de MPA (+MPA). Al cabo de 7 días los animales fueron sacrificados y se realizó el recuento del número de metástasis pulmonares superficiales. Los resultados se muestran como la mediana y rango de metástasis para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por el test de Kruskal-Wallis. b vs a, c vs b, d vs a y d vs b $p < 0.05$. Se muestra un experimento representativo de 4.

Finalmente, estos resultados demuestran por primera vez que los progestágenos regulan la capacidad metastásica de células de carcinoma mamario murino en forma independiente de la actividad transcripcional del RP.

PARTE I

En el presente trabajo se demostró que el MPA es capaz de inducir una activación rápida no genómica de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en células de carcinoma mamario murinas progestágeno dependientes C4HD y las líneas de carcinoma mamario murina LM3 y humana T47D-Y transfectadas con el RP. De acuerdo a los antecedentes encontrados en la literatura, este efecto podría estar mediado tanto por el RP clásico (114;116) como por un RP de membrana estructuralmente diferente al ya descrito (108;111). Los resultados obtenidos con el antiprogestágeno RU486 en las células C4HD y los experimentos de reconstitución del RP en las líneas LM3 y T47D-Y, demuestran que la estimulación de las vías de transducción de señales está mediada por el RP clásico. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados observados originalmente por Auricchio y colaboradores donde se determinó que la activación de la vía c-Src/p21^{ras}/MAPKs por progestágenos es un efecto no transcripcional rápido mediado por el RP clásico en células de cáncer de mama (114). Asimismo, estudios recientes de Lange y colaboradores demostraron que el RP clásico es capaz de inducir una activación sostenida de c-Src y las p42/p44MAPKs en células de carcinoma mamario T47D (67).

Es importante destacar que el tratamiento con MPA resultó en la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt tanto en las LM3 como en las T47D-Y transfectadas con la mutante C587A-RP incapaz de unirse a PREs, demostrando que la activación de las vías de transducción de señales es independiente de la actividad transcripcional del RP. Estos hallazgos están de acuerdo con la activación de las p42/p44MAPKs por progestágenos observada en células T47D-Y transfectadas en forma estable con la mutante S294-RP (119). El receptor S294-RP posee una mutación puntual que reemplaza la serina 294 por una alanina, impidiendo la fosforilación del RP por MAPKs e inhibiendo su actividad transcripcional (93).

Los trabajos pioneros de Auricchio y colaboradores (114;118) demostraron que la estimulación de c-Src por progestágenos es dependiente de la presencia del RE. Estos resultados plantean la formación de un complejo en el cual el RP interacciona con el RE y este, a su vez, interacciona directamente con la proteína quinasa c-Src (115). Sin embargo, las investigaciones de Edwards y colaboradores (113;116), como se mencionó previamente, demuestran una interacción directa del RP con la familia de proteínas

quinasas c-Src. Esta interacción es llevada a cabo mediante un sitio rico en prolinas presente en el dominio N-terminal del RP y los dominios SH3 de la quinasa. Por otra parte, estos estudios determinaron que la co-transfección con el RE disminuye los niveles basales de fosforilación de c-Src, permitiendo observar mejor la estimulación de la vía luego del tratamiento con progestágenos (116). Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo tanto en las LM3-RP-B como en las LM3-C587A-RP están de acuerdo con estos últimos resultados, donde si bien la presencia del RE permite observar una mayor estimulación de las vías de transducción de señales, los progestágenos son capaces de estimularlas en forma independiente de la expresión del RE. Con el objetivo de conciliar estas discrepancias, recientemente se sugirió que una gran variedad de complejos podrían formarse dependiendo de la presencia de diversas moléculas adaptadoras y transductoras de señales en los distintos tipos celulares (117).

La regulación de la vía PI-3K/Akt por progestágenos en células de cáncer de mama ha sido poco explorada (126). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron por primera vez la activación y participación de la vía PI-3K/Akt en el crecimiento tumoral *in vivo* dependiente de progestágenos (65). En el presente trabajo se demostró la capacidad del MPA de inducir la fosforilación de Akt en células transfectadas tanto con el RP *wild type* como con la mutante incapaz de unirse al DNA. Estos hallazgos están de acuerdo con resultados recientes que demuestran la fosforilación de Ser473 Akt luego del tratamiento con progestágenos en las células B-474, T47D y T47D-Y transfectadas con el RP (126). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican, además, que el MPA es capaz de estimular la vía PI-3K/Akt independientemente de la presencia del RE. En este trabajo, se demostró por primera vez que la expresión del RE disminuye el nivel basal de fosforilación de Akt permitiendo observar una mayor estimulación de la vía PI-3K/Akt por progestágenos en células de cáncer de mama.

Existen pocos trabajos acerca del efecto del antiprogestágeno RU486 en la activación de vías de traducción de señales en células de carcinoma mamario (114;119). En el presente trabajo el tratamiento con RU486 no indujo la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt y, de acuerdo con lo observado en trabajos previos (78;114), el antiprogestágeno inhibió significativamente la estimulación de ambas vías por MPA en los tres modelos experimentales utilizados. Sin embargo, Lange y colaboradores recientemente determinaron que la presencia de RU486 induce la activación de las p42/p44MAPKs en células de carcinoma mamario T47D-Y

transfectadas en forma estable con RP o con la mutante S294-RP que no posee actividad transcripcional (119). Se observó, además, que el RU486 es capaz de activar las p42/p44MAPKs en células de carcinoma mamario MDA-MB-231A transfectadas con el RP (143). Diferencias en los niveles de expresión del RP en los distintos sistemas experimentales utilizados, ya sea los niveles endógenos en las C4HD, transfecciones transientes en las T47D-Y y LM3 o bien transfecciones estables en las T47D-Y (119) y MDA-MB-231A (143), podrían dar cuenta de las diferencias observadas en la modulación de las p42/p44MAPKs por RU486. Los resultados presentados en este trabajo demuestran, además, que el RU486 disminuye significativamente la estimulación de la vía PI-3K/Akt inducida por MPA en las células C4HD, LM3 y T47D-Y transfectadas con el RP *wild type* o con la mutante C587A-RP. Estos resultados describen por primera vez el efecto del antiprogestágeno en la modulación de la actividad de la vía PI-3K/Akt por MPA en células de cáncer de mama. En este sentido, Ferrel y colaboradores demostraron una asociación entre el RP y la PI-3K durante la maduración de oocitos de *Xenopus* inducida por progestágenos (106). De acuerdo con nuestros resultados, la presencia del RU486 no estimuló la actividad de la PI-3K e inhibió completamente la asociación con el RP luego del tratamiento con progestágenos (106).

En resumen, en esta primera parte del trabajo se demostró que el MPA es capaz de activar las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt a través del RP clásico y en forma independiente de su actividad transcripcional en células de carcinoma mamario murinas y humanas.

PARTE II

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten caracterizar aún más el complejo rol del RP en la biología de los carcinomas mamarios.

En primer lugar se demostró que los progestágenos son capaces de inducir un crecimiento sostenido en células de carcinoma mamario C4HD a través del RP clásico y mediante la activación de vías de transducción de señales. De acuerdo con los resultados de Lange y colaboradores (119), las p42/p44MAPKs cumplen un rol esencial en la progresión del ciclo celular inducida por progestágenos. Además, en el presente trabajo fue demostrada una de las primeras evidencias de la participación de la vía PI-3K/Akt en la proliferación inducida por MPA en células de carcinoma mamario (144).

Los progestágenos son capaces de regular la expresión de diversos genes que carecen de un PRE en su promotor mediante la activación de vías de transducción de señales. En este sentido, Lange y colaboradores demostraron que los progestágenos inducen la expresión de ciclina D1 a través de la activación de las p42/p44MAPKs en células T47D-Y transfectadas con el RP (119). De acuerdo con estos resultados, en el presente trabajo se demostró que el aumento en la expresión de ciclina D1 por MPA se revierte en presencia de inhibidores específicos de las p42/p44MAPKs en células de carcinoma mamario C4HD. Además, fue demostrada una de las primeras evidencias de la participación de la vía PI-3K/Akt en el aumento de la expresión de ciclina D1 por MPA en células de carcinoma mamario (144). Por otra parte, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran la participación del receptor tirosina quinasa tipo I ErbB-2 en la proliferación de las células C4HD inducida por MPA (70). Al igual que el gen de ciclina D1, ErbB-2 posee un promotor complejo que carece de PREs. Los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez que el MPA aumenta los niveles de ErbB-2 mediante la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en células de cáncer de mama. Estos hallazgos indican que los progestágenos son capaces de regular diversos genes de acuerdo a la función del RP como factor de transcripción o activador de vías de transducción de señales.

La inducción de la proliferación de células transfectadas con la mutante C587A-RP por MPA indica que una vez expresado el RP con capacidad de activar vías de transducción de señales los progestágenos son capaces de inducir la proliferación de células de carcinoma mamario. Es importante destacar que esto ocurre tanto en células

negativas (LM3) como positivas (T47D-Y) para el RE, en concordancia con los resultados obtenidos en la activación de las vías de transducción de señales por MPA. De acuerdo a lo esperado, la capacidad del MPA de aumentar los niveles de Bcl-x_L en células LM3 transfectadas con la mutante C587A-RP fue significativamente menor a la observada en las LM3-RP-B. Asimismo, el MPA no fue capaz de regular la expresión de p21 mediante el mecanismo de *tethering* en las células LM3-C587A-RP, demostrando claramente las consecuencias de la mutación puntual en el DBD. Al igual que lo observado en las células de carcinoma mamario MCF-7 (119), es notable la falta de respuesta proliferativa luego del tratamiento con MPA en células transfectadas con la mutante incapaz de activar vías de transducción de señales, RP-BmPro, a pesar de conservar su actividad transcripcional. En este sentido, la mutante RP-BmPro provocó un retraso significativo en la maduración de los oocitos de *Xenopus* así como también un retraso en la inhibición del crecimiento por progestágenos en células de carcinoma mamario MCF-12 (116). Los resultados obtenidos en el presente trabajo están de acuerdo con las evidencias que demuestran el rol positivo de los progestágenos en el desarrollo del carcinoma mamario (57;114;145), principalmente a través de la activación de vías de transducción de señales (118;119). En particular, los resultados obtenidos con la mutante RP-BmPro demuestran que la activación de las vías dependientes de la proteína quinasa c-Src por progestágenos es esencial para la inducción la proliferación de células de carcinoma mamario. En este sentido, trabajos previos demostraron que la transfección con un vector dominante negativo para c-Src inhibió significativamente la proliferación y migración de células MCF-7 y MDA-MB-468 (146;147). En resumen, estos hallazgos demuestran que la respuesta celular frente al tratamiento con progestágenos dependerá de la función del RP ya sea como factor de transcripción o como activador de vías de transducción de señales.

La presencia del antiprogestágeno RU486 no fue capaz de inducir la proliferación de las C4HD, las LM3 o T47D-Y transfectadas con el RP o con C587A-RP, de acuerdo con los resultados que demuestran la falta de activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt luego del tratamiento con el inhibidor. Contrariamente a estas observaciones, se encontró que el antiprogestágeno aumentó la proliferación de células T47D (148) y T47D-Y transfectadas en forma estable con el RP *wild type* o con la mutante S294-RP (119) en concordancia con la activación de las p42/p44MAPKs observada luego del tratamiento con RU486 en estas células. Como mencionamos previamente, los distintos niveles de expresión del RP sumado a las

diversas moléculas señalizadoras presentes en cada sistema experimental pueden dar cuenta de las distintas respuestas observadas. Cabe destacar que los resultados obtenidos con RU486 favorecen aún más la hipótesis en la cual solo los ligandos del RP capaces de activar vías de transducción de señales podrán inducir la proliferación de células de cáncer de mama.

Uno de los hallazgos más interesantes del presente trabajo fue la modulación de la proliferación, tanto de células negativas (LM3) como positivas (T47D-Y) para el RE, por la expresión del RP en ausencia de ligando. El RP fue capaz de inhibir la proliferación basal de las LM3-RP-B y las T47D-Y-RP-B. Numerosas evidencias, incluyendo trabajos realizados en nuestro laboratorio (64), indican que el RP presenta actividad transcripcional aún en ausencia de ligando mediante la interacción con vías de transducción de señales inducidas por factores de crecimiento (91;149). Al igual que el RP *wild type*, la expresión de la mutante C587A-RP inhibe la proliferación basal de las LM3-C587A-RP y T47D-Y-C587A-RP de manera ligando independiente. La mutante, activada por la interacción con vías de transducción de señales, regula la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular mediante la activación de moléculas señalizadoras. La expresión de la mutante RP-BmPro también inhibió la proliferación basal de las LM3 y T47D-Y en ausencia de ligando. A pesar de no mediar la activación de vías de señalización dependientes de c-*Src*, mantiene su capacidad transcripcional y podría ser activada por vías de señalización. Estos hallazgos están de acuerdo con los trabajos pioneros de Horwitz y colaboradores, en los cuales se demostró que la expresión de las distintas isoformas del RP en células T47D-Y son capaces de inducir la transcripción de numerosos genes en ausencia de ligando (72;73). Estos genes están involucrados en diversos aspectos del fenotipo neoplásico como la interacción célula-célula, la adhesión, degradación de la matriz extracelular, migración e invasión. Además, se encontraron reguladas moléculas de señalización intracelular y genes involucrados en el crecimiento tumoral y la apoptosis (72;73). Al igual que en el presente trabajo, los autores observaron una disminución de la proliferación celular como consecuencia de la expresión del RP demostrando efectos ligando independientes del receptor (73).

Por último, en esta segunda etapa del trabajo, se demostró la capacidad de los progestágenos de aumentar la supervivencia de las células LM3 transfectadas con el RP. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en la literatura dónde se observó que el crecimiento independiente de anclaje y la supervivencia de células MCF-7 son

inducidos por progestágenos mediante la activación de la sintasa de ácidos grasos (FAS) (150) y a su vez, que el MPA es capaz de aumentar la proliferación y supervivencia de células MCF-7 y H466-B regulando la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos (151). Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran por primera vez que la modulación de la supervivencia de células de carcinoma mamario es independiente de la actividad transcripcional del RP. Por otra parte, datos clínicos indican que la expresión del RP se correlaciona con una menor capacidad de crecimiento y supervivencia de células de carcinoma mamario (152). De acuerdo con estos datos, la expresión del RP o sus mutantes C587A-RP y RP-BmPro resultó en una disminución en el número de colonias, demostrando además ser un efecto ligando independiente.

En resumen, en esta segunda parte del trabajo se demostró que el MPA es capaz de inducir la proliferación y supervivencia de células de carcinoma mamario murino y humano en forma independiente de la actividad transcripcional del RP y mediante la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt. Además, entre los efectos ligando-independientes se demostró que la expresión del RP, ya sea como factor de transcripción o como activador de vías de transducción de señales, inhibe la proliferación y supervivencia de las células de carcinoma mamario.

PARTE III

En esta tercera y última parte del trabajo se estudió la regulación de la capacidad invasiva y metastásica de las células C4HD y LM3 por progestágenos analizando los mecanismos moleculares involucrados.

La habilidad de los tumores de producir enzimas proteolíticas capaces de degradar uno o más componentes de la matriz extracelular (MEC) define en gran medida su potencial metastático (153). Como resultado de la actividad de proteasas, se ven alteradas las interacciones célula-célula, célula-MEC, se generan nuevos componentes activos de la MEC y se modifica la biodisponibilidad y actividad de numerosos factores de crecimiento, receptores y citoquinas (154). Además, las proteasas juegan un rol esencial en el proceso de angiogénesis, donde regulan la proliferación de células endoteliales y la morfogénesis vascular (154). Las principales proteasas involucradas en el proceso de invasión y metástasis son las metaloproteasas, como la MMP-2 y MMP-9, y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa uPA (129). En el presente trabajo demostramos que el MPA inhibe significativamente la actividad y expresión de las MMP-2, MMP-9 y uPA en las células C4HD y de uPA en las células LM3 transectadas con el RP. Los resultados obtenidos con RU486 y los experimentos de reconstitución de la expresión del RP en las LM3 indican que este efecto está mediado por el RP clásico. El antiprogestágeno, además, no posee efectos agonistas sobre la actividad de proteasas. Es interesante destacar que en las células C4HD, que expresan en forma endógena tanto el RP-A como el RP-B, sólo la vía PI-3K/Akt participa en la regulación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 por MPA, sin la participación de las p42/p44MAPKs. La disminución de la actividad de uPA por MPA, en cambio, está mediada por las p42/p44MAPKs y no por la vía PI-3K/Akt. Sin embargo, MPA inhibe la actividad de uPA en las células LM3-RP-B y LM3-C587A-RP mediante la participación de ambas vías de transducción de señales. Estos resultados demuestran por primera vez que los progestágenos son capaces de regular la actividad de proteasas mediante mecanismos no genómicos del RP y a través de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt en células de carcinoma mamario. Estos hallazgos indicarían, además, que diferentes vías de señalización estarían involucradas en la modulación de la actividad de uPA en respuesta a progestágenos, dependiendo de las

isoformas del RP expresadas en cada tipo celular. En este sentido, Horwitz y colaboradores determinaron que según se expresara la isoforma A o la isoforma B del RP se inducen distintos genes involucrados en migración e invasión de células de carcinoma mamario (72;73). A su vez, la presencia del RE podría dar cuenta de las diferencias observadas en la modulación de la actividad de uPA por MPA en células C4HD (RE positivas) y células LM3 (RE negativas), dado que el RE es capaz de modular la activación de vías de transducción de señales por MPA. Numerosos trabajos han encontrado que los progestágenos disminuyen la secreción y actividad de MMPs en células de endometriales (134;135;155;156). Asimismo, se demostró que los progestágenos inhiben la actividad de uPA (130), aumentan los niveles de su inhibidor PAI en células endometriales (131) y disminuyen su secreción en células de carcinoma de ovario (132). Sin embargo, los efectos de la progesterona en la actividad de proteasas en células de carcinoma mamario han sido poco estudiados. En particular, se demostró que el aumento en la actividad de uPA se correlaciona positivamente con un peor pronóstico en carcinomas mamarios y, a su vez, esta inversamente relacionada con los niveles de los receptores de estrógeno y progesterona (157). Estudios recientes, en los cuales se analiza el efecto de la progesterona en las propiedades invasivas y el crecimiento tumoral de células de carcinoma mamario MDA-MB-231, se demuestra que esta hormona inhibe la expresión de uPA (133;158) y MMP-9 (159).

Finalmente, utilizando un ensayo de metástasis experimental se estudió el efecto del MPA en la capacidad metastásica de las LM3 transfectadas con el RP o las diferentes mutantes del receptor. De acuerdo con los datos clínicos donde la expresión de RP es indicador de buen pronóstico para carcinomas mamarios (160;161), los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la expresión del RP disminuye significativamente el número de metástasis pulmonares. Este efecto ocurre cuando el RP actúa tanto como factor de transcripción como activador de vías de transducción de señales. Además, los resultados obtenidos en ratones tratados con MPA demuestran por primera vez que los progestágenos favorecen el desarrollo de metástasis pulmonares de células de carcinoma mamario mediante mecanismos no genómicos del RP. Asimismo, los hallazgos observados con la mutante RP-BmPro demuestran que la activación de la proteína quinasa c-Src por MPA es esencial para la inducción de la capacidad metastásica de células de carcinoma mamario por progestágenos. Estos resultados están de acuerdo con los datos de la literatura que indican que c-Src participa en la colonización de hueso y pulmón (162), favoreciendo la invasión y capacidad

metastásica de células de carcinoma mamario (163;164). Es importante destacar que mediante la utilización del ensayo de metástasis experimental se logró detectar diferencias en la capacidad metastásica de las LM3 *wild type* y las LM3 transfectadas con el RP así como también entre las LM3-C587A-RP y las LM3-RP-BmPro. De acuerdo a lo esperado, los ensayos de inmunohistoquímica realizados con el fin de detectar la expresión del RP en las metástasis pulmonares resultaron negativos. Es muy probable que a lo largo de los 28 días del ensayo *in vivo* las células hayan perdido la expresión del RP. Sin embargo, como mencionamos previamente, este hallazgo no invalida los resultados del ensayo dado que la capacidad metastásica de los distintos tipos celulares se define en los primeros días post-inyección cuando todavía expresan altos niveles del RP. En el presente trabajo se demostró que las células LM3 transfectadas en forma transiente con el RP mantienen la expresión del receptor hasta 7 días luego de la transfección. Además, cabe recordar que en este tipo de ensayos los pasos de arresto y extravasación son completados en forma rápida y eficiente durante los primeros días del ensayo pudiendo analizar el desarrollo exitoso de una metástasis experimental según la capacidad de las células de iniciar el crecimiento y sostenerlo en el tejido distante. Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos al séptimo día post-inyección, se demostró que las diferencias en la capacidad metastásica de los distintos tipos celulares pueden atribuirse a la reconstitución de la expresión del RP o sus mutantes en las células LM3.

En resumen, en esta última parte del trabajo se demostró la capacidad de los progestágenos de regular actividad de proteasas involucradas en el proceso de invasión tumoral y la capacidad metastásica de células de carcinoma mamario murino en forma independiente de la actividad transcripcional del RP.

Integrando los resultados tanto *in vitro* como *in vivo* obtenidos en el presente trabajo, se postula que la expresión del RP en ausencia de ligando confiere a las células de carcinoma mamario, RE positivas o RE negativas, una menor capacidad proliferativa en comparación con las células que no expresan el receptor. Estos efectos independientes de ligando ocurren cuando el RP funciona como factor de transcripción y activador de vías de señalización (RP *wild type*), solo como activador de vías de señalización, en particular las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Akt (C587A-RP), o solo como factor de transcripción (RP-BmPro). Cuando las células transfectadas con el RP son sometidas a concentraciones fisiológicas de progesterona en circulación en animales intactos, se obtienen diferentes capacidades metastásicas dependiendo de la función del RP como factor de transcripción o como activador de vías de señalización. Las células transfectadas con el RP *wild type* o con la mutante C587A-RP responderán a la progesterona con una tasa proliferativa que, de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, será similar a la de las células que no expresan el RP. Además, la progesterona podrá aumentar la supervivencia de las células transfectadas con RP o con C587A-RP, en base a los resultados obtenidos en los ensayos de clonogenicidad. Sin embargo, esta hormona disminuirá significativamente la actividad de uPA en las células transfectadas con el RP o con C587A-RP respecto a las células negativas para el receptor. Las células que expresen el RP *wild type* o la mutante C587A-RP tendrán, entonces, una tasa proliferativa similar a las células que no expresan el RP y, al mismo tiempo, una menor actividad de proteasas. El balance entre estas respuestas será una célula con una menor capacidad metastásica en comparación con una célula que no expresa el RP. Por otra parte, en células que expresan la mutante incapaz de activar vías dependientes de c-Src (RP-BmPro), la proliferación basal es menor respecto a las células negativas para el RP. Sin embargo, considerando los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, la progesterona no inducirá cambios en la capacidad proliferativa de estas células. Como consecuencia, las células que expresan la mutante RP-BmPro presentan una menor capacidad metastásica no solo respecto a las células transfectadas con RP *wild type* sino respecto a las transfectadas con C587A-RP. Estos hallazgos proveen por primera vez una explicación molecular de los datos clínicos que muestran que la expresión del RP en tumores mamarios, independientemente de la presencia del RE, es indicador pronóstico de baja agresividad y un mayor período libre de enfermedad (160;161).

Es interesante destacar resultados previos obtenidos en las células LM3 que indican que la inhibición de la actividad de uPA reduce la incidencia de metástasis pulmonares espontáneas y experimentales (165), demostrando una relación causal entre la disminución de la actividad de la proteasa por progestágenos y la reducción de la capacidad metastásica de las LM3-RP-B respecto a las LM3 *wild type*. Además, las proteasas juegan un rol esencial en el proceso metastático favoreciendo la extravasación. En base a esto y de acuerdo con resultados obtenidos *in vitro*, las células LM3-RP-B y LM3-C587A-RP inyectadas en ratones con concentraciones fisiológicas de progesterona o en ratones tratados con MPA serían menos eficientes en la extravasación al pulmón respecto a las LM3 negativas para el RP. Recientemente se demostró la participación de las proteasas en la proliferación de células tumorales en sitios distantes o secundarios, favoreciendo la formación de metástasis (139). Se espera, entonces, que las células transfectadas con RP o con C587A-RP presenten una menor capacidad proliferativa respecto a las LM3 que no expresan el receptor.

La administración exógena de progestágenos indujo un aumento en el número de metástasis de las LM3 transfectadas tanto con RP como con la mutante C587A-RP. El efecto proliferativo y de supervivencia inducido por altas dosis de progestágenos en circulación sobre las células que expresan el RP podría superar la inhibición de la actividad de proteasas determinando así una mayor capacidad metastásica respecto a las células sometidas a concentraciones fisiológicas de la hormona. Sin embargo, las LM3 transfectadas con la mutante RP-BmPro no proliferarán en respuesta a la administración de MPA, impidiendo así la regulación de la capacidad metastásica de estas células en los animales tratados con el progestágeno. Estos hallazgos resultan particularmente interesantes a la luz de datos epidemiológicos recientes obtenidos de estudios de terapias de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas, como el *Women Health Initiative*, que indican que la combinación de estrógenos más progestágenos aumentan la incidencia de carcinomas mamarios respecto a las terapias con estrógenos solos (32;166). A su vez, los resultados obtenidos en el presente trabajo alertan sobre el uso terapéutico del MPA en el tratamiento de tumores de endometrio y mama, llegando a concentraciones en circulación comparables a las obtenidas en estos ensayos *in vivo* (167;168).

Los resultados obtenidos con las células LM3-RP-B y LM3-C587A-RP permiten, entonces, comprender los datos clínicos obtenidos a partir de los estudios de las terapias de reemplazo hormonal. En base a esto, se especula tanto que la respuesta a

progestágenos de las células de mama normal es proliferativa resultando en el desarrollo tumoral, como que una pequeña población de células transformadas preexistentes y posiblemente latentes son estimuladas en presencia de progestágenos induciendo la progresión neoplásica. Asimismo, estudios previos determinaron que los progestágenos no son protectores en la glandula mamaria (169).

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron dilucidar los efectos genómicos y no genómicos de los progestágenos en células de carcinoma mamario involucrados en la regulación de diversos aspectos del fenotipo neoplásico. A su vez, estos hallazgos proveen por primera vez un mecanismo molecular y fisiológico para la utilización de terapias en las cuales bloqueando específicamente la interacción del RP con vías de señalización se podría inhibir el crecimiento y desarrollo de metastásis en tumores de mama que expresan el RP.

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 y en el Bioterio del Instituto de Oncología Angel H. Roffo. 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 cuidado de animales de laboratorio del NIH y fueron, a su vez, aprobados por el comité de ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

TUMORES

Se utilizó el modelo experimental de adenocarcinoma mamario murino C4HD (120). 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 (120). 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* (121). En cuanto a la expresión de receptores, el tumor C4HD expresa receptores de progesterona y receptores de estrógeno, sobreexpresa ErbB-2, expresa ErbB-3 y ErbB4 y carece de receptores de glucocorticoides y de receptores de EGF (EGFR)(121;170).

HORMONA

El MPA (6 α -metil-17 α -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 (171). En los tratamientos *in vivo* se utilizó

MPA (Medrosterona, Gador, Buenos Aires) en forma de *depot* (40 mg/ratón) gentilmente donado por laboratorios Gador.

MEDIOS DE CULTIVO Y SUERO FETAL BOVINO

Para el cultivo de células epiteliales C4HD se utilizó DMEM/F12 (*Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1*) (Sigma, St. Louis, MO) 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 µm 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 suero ya deplementado 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.

El medio MEM (41500), utilizado para mantener la línea LM3, fue adquirido en Gibco BRL. Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua hexadestilada agregando 2 g/l de bicarbonato de sodio. Se esterilizó por filtración.

SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LOS CULTIVOS

Buffer fosfato (PBS)

Na Cl 8g/l

KCl 0.2g/l

Na₂HPO₄ 1.44g/l

KH₂PO₄ 0.24g/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 St. Louis, MO) (AE: 485U/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 los cultivos primarios o para el repique de las líneas celulares, se utilizó una solución de Tripsina (Gibco BRL) 0.25% p/v más EDTA 0.02% p/v en PBS. Se esterilizó por filtración.

CULTIVOS PRIMARIOS

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 (172) 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 400g 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 traslúcido. En la última decantación las células epiteliales se resuspendieron en medio de cultivo + SFB 10%

v/v y se sembraron en placas de cultivo. Se comprobó que más del 95% de las células eran positivas para la tinción con citoqueratina.

Los cultivos primarios de células epiteliales se dejaron adherir durante 48 hs en DMEM/F12 + 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 de dejó 48 hs más. Las células se trataron por 48hs con medio + SFBch 0,1% v/v en presencia o ausencia de MPA 10nM. En los casos en que se utilizó RU486 en presencia de MPA, las células se trataron con este antagonista 90 minutos antes del tiempo indicado de incubación con MPA.

Para bloquear la activación de las p42/p44MAPKs, las células fueron tratadas 90 minutos antes de la incubación con MPA con el inhibidor de MEK1 PD98059 (10 μ M disuelto 1/2000 en DMSO), o con el inhibidor de MEK1/2 U0126 (5 μ M disuelto 1/2000 en DMSO) ambos de Sigma St. Louis, MO. Para bloquear la activación de la vía PI-3K/Akt, las células fueron tratadas 90 minutos antes de la incubación con MPA con Wortmanina (1 μ M disuelta 1/2000 en DMSO) o Ly294002 (2 μ M disuelta 1/2000 en DMSO) ambos de Sigma St. Louis, MO. Se realizaron los controles pertinentes para verificar que el DMSO (1:2000) no modificó la fosforilación de las p42/p44MAPKs y Akt inducida por MPA.

LÍNEAS CELULARES

La línea celular LM3, desarrollada en el laboratorio de la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, se obtuvo a partir de cultivos primarios de un adenocarcinoma mamario murino M3 (Urtreger *et al.* Int J Oncol 1997 11 489-96). El adenocarcinoma M3 es mantenido por pasajes singeneicos en ratones hembra vírgenes BALB/c (Bal de Kier Joffé *et al.* Invasión Metastasis 1986 6 302-12). Al igual que el tumor parental, la línea LM3 presenta un comportamiento altamente invasivo con un 90-100% de incidencia de metástasis pulmonar (Urtreger *et al.* Int J Oncol 1997 11 489-96). Esta línea no presenta RE ni RP y su crecimiento es hormono-independiente (137). Las células LM3 fueron mantenidas en medio MEM (Gibco BRL) suplementado con SFB 5% v/v.

La línea de carcinoma mamario humana T47D-Y fue donada por el laboratorio de la Dra Horwitz (*University of Colorado. Health Sciences Center Denver*) y se obtuvo mediante clonación por dilución límite a partir de la línea T47D (124). Estas células presentan RE y, a diferencia de la línea parental, no expresan RP (124). La línea fue cultivada en DMEM/F12 (Sigma) suplementado con SFB 10% v/v.

La línea de adenocarcinoma mamario T47D, proveniente de una paciente con cáncer de mama metastático en pulmón (124), fue adquirida en *American Type Culture Collection* (ATCC) y es positiva para el RP y RE. En el presente trabajo, fue utilizada como control positivo en los ensayos de WB para detectar la expresión del RP. La línea fue mantenida en DMEM/F12 suplementado con SFB 10% v/v.

Las células LM3, T47D-Y y T47D se mantuvieron por repiques sucesivos al llegar a un 90% de confluencia aproximadamente. Las células se incubaron durante 5-10 minutos a 37°C con solución de tripsina-EDTA estéril de manera de cubrir la monocapa celular. Una vez despegadas, se las pasó a un tubo con 10ml de medio suplementado con SFB y se centrifugó a 400g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en el medio correspondiente a cada línea suplementado con SFB. Para cada experimento se realizó el recuento y dilución celular y se sembraron en las placas correspondientes.

Para bloquear la activación de las p42/p44MAPKs y la vía PI-3K/Ak, las células fueron tratadas con inhibidores farmacológicos específicos como se describe para los cultivos primarios de las células C4HD. En los casos en que se utilizó RU486 en presencia de MPA, las células se trataron con este antagonista 90 minutos antes del tiempo indicado de incubación con MPA.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Para los ensayos de proliferación, las células C4HD que estaban creciendo en medio + SFBch 2,5% v/v + MPA 10 nM, se repicaron en placas de 96 hoyos de fondo plano. En el caso de las células LM3 y T47D-Y se sembraron 2×10^3 y 1×10^4 células por hoyo respectivamente. Las células repicadas se dejaron adherir durante 24 hs en el medio correspondiente suplementado con SFB. El medio de las células C4HD fue luego reemplazado por medio+SFBch 0.1% v/v con los tratamientos cuyo efecto se deseaba

evaluar. Las células se incubaron durante 48 hs, reemplazándose a las 24 hs el 50 % del volumen de cada hoyo por medio tratado fresco. El medio de las LM3 y T47D-Y fue reemplazado por medio sin SFB con los tratamientos a evaluar y las células fueron incubadas por 24hs. Todos los ensayos se realizaron por octuplicado. Durante las últimas 24 hs. de incubación se aplicó un pulso de 1 μ Ci de 3 H-timidina (NEN, Boston, MA, actividad específica 20 Ci/mmol) en cada hoyo. Los cultivos se tripsinizaron (50 μ l/hoyo) y se cosecharon en un cosechador de células Nunc. La radioactividad incorporada se midió por métodos estándar de centelleo líquido. Previamente se demostró que la incorporación de timidina 3 [H] se correlacionó con el número de células (171) siendo de este modo un método apropiado para medir proliferación celular. La incorporación de timidina 3 [H] se muestra como cuentas por minuto (cpm).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada experimento individual se promedian los octuplicados, se muestra la media \pm ES (error estándar) y se evaluó la significación estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de los distintos tratamientos entre sí se usó el test de Tuckey.

TRANSFECCIONES TRANSIENTES

Las células LM3 y T47D-Y fueron transfectadas en forma transiente con 40ng del vector de expresión que codifica para la subunidad B del RP humano (RP-B) donado por la Dra. K Horwitz (62) y con 40 ng de la mutante C587A-RP, que contiene una mutación puntual que reemplaza una cisteína (587) conservada en el primer dedo de zinc del DBD por una alanina. Esta mutante del RP, realizada y caracterizada por Horwitz y colaboradores (125), es incapaz de unirse a un PRE y por lo tanto de regular la actividad transcripcional de los promotores blanco. Las células fueron transfectadas, además, con 40ng del vector de expresión que codifica para la mutante RP-BmPro. En esta mutante tres prolinas claves en la interacción del RP con c-Src (P422A, P423A, P426A) fueron reemplazadas por alaninas, impidiendo la interacción con dominios SH3 de la quinasa y finalmente la activación de vías de traducción de señales dependientes

de c-Src. Como control las células fueron transfectadas con 40ng del vector vacío pSG5. Las células LM3 y T47D-Y fueron transfectadas por 24hs en DMEM/F12 suplementado con SFB 5% o 10% v/v respectivamente en ausencia de antibióticos, siguiendo las indicaciones del fabricante para el uso del reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Biochemicals, Indianápolis IN). Luego, las células fueron lavadas con DMEM/F12 en ausencia de SFB y cultivadas por 24-48hs en medio sin suero previo al correspondiente tratamiento. Para ensayos de WB, se prepararon extractos totales de proteínas como se describe más abajo. En los ensayos de proliferación, las células fueron transfectadas en forma transiente como se describió previamente, evaluando luego la incorporación de timidina $^3\text{[H]}$.

Para analizar la actividad transcripcional del RP, las células LM3 y T47D-Y fueron transfectadas en forma transiente con 40ng de los vectores de expresión para el RP-B o la mutante C587A-RP o bien con el vector vacío pSG5 y co-transfectadas con 2 μg del plásmido reportero MMTV-luc junto con 1 μg del vector de expresión de citomegalovirus- β galactosidasa (BD Bioscience Clontech). El plásmido reportero MMTV-luc contiene 5 elementos respondedores a progesterona y el vector CMV- β gal fue utilizado para corregir variaciones internas en las eficiencias de transfección. Las células fueron luego lavadas con DMEM/F12 y tratadas con MPA por 48hs o preincubadas con RU486 previo al tratamiento con el progestágeno en medio sin suero. Luego, fueron lavadas 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 método de Bradford. La actividad luciferasa fue determinada en un luminómetro 20⁰/20 (Turner Bio Systems, Sunnyvale, CA) e informada como la razón entre la actividad luciferasa y la actividad β -galactosidasa. Se realizaron duplicados para cada tratamiento.

La medición de la actividad β -galactosidasa se realizó incubando alícuotas idénticas de cada muestra con 100 μl de orto-nitro-fenil- β galactósido (ONPG) (4mg/ml) en un volumen final de 500 μl a 28°C hasta aparición de una leve coloración amarilla. Luego se agregaron 250 μl de Na_2CO_3 1M y se determinó la actividad de la enzima por una lectura en un espectrofotómetro a 405nm.

La eficiencia de transfección 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). La eficiencia de la transfección fue alrededor de 60-70% en ambas líneas celulares.

ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD

Las células LM3 *wild type* y las LM3 transfectadas con RP-B, C587A-RP, RP-BmPro, o con pSG5 fueron cultivadas en muy baja densidad (500 células por hoyo de placa de 6 hoyos) y tratadas por 5 días con DMEM/F12 + SFBch 10% v/v en presencia o ausencia de MPA 10nM. Las células fueron luego lavadas con PBS 1X, fijadas en formol neutro 10% por 30 minutos y teñidas con solución de Giemsa por 20 minutos para la observación al microscopio. Se realizó el recuento del número de colonias mayores a 20 células. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada grupo experimental.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada experimento individual se calcula el número de colonias, se muestra la media \pm ES (error estándar) y se evaluó la significación estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de los distintos tratamientos entre sí se usó el test de Tuckey.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES

Las células C4HD, LM3 y T47D-Y, tratadas como se indica en cada experimento, se recolectaron de las placas de cultivo utilizando un *scraper* y se homogeneizaron en presencia del 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, MgCl₂ 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).

El lisado celular se completó mediante ruptura física con una jeringa 25G (Terumo) en frío. El homogenato celular se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 30 min. Se descartó el *pellet* y el contenido proteico del sobrenadante fue determinado de acuerdo al método de Lowry (173).

ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Los extractos proteicos se prepararon como se describió previamente y se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). El extracto proteico (25, 50 o 100µg de proteínas) 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 durante 5 min. Las muestras se corrieron en geles de 7,5-15% 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 O.N. a 4°C con leche descremada 5% p/v o BSA 3% p/v (Albúmina Sérica Bovina fracción V, Sigma) en el caso de los anticuerpos anti-fosfo-serina, ambos en PBS-tween 20 0.1% v/v. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos diluídos en PBS-Tween 20 0,1% v/v durante 2 hs. a temperatura ambiente con agitación o bien O.N. con leche descremada 5% p/v o BSA 3% p/v con agitación.

Fosfo p42/p44 MAPK (E-4), monoclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
1/2000

p42/p44MAPK (C-14), policlonal de conejo, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
1/2000

Fosfo-Akt-ser 473, policlonal de conejo (Cell Signaling, Beverly, MA,USA) 1/1000

Akt, policlonal de conejo (Cell Signaling, Beverly, MA,USA) 1/2000

Fosfo Src (Tyr416), policlonal de conejo, (Cell Signaling, Beverly, MA,USA)
1/4000

c-Src (N-16), policlonal de conejo, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 1/7000

hPR (Ab-7), monoclonal, (Neomarkers, Freemont, CA, USA) 1/500

Actina (Ab-5), monoclonal, (Neomarkers, Freemont, CA; USA) 1/5000

Bcl-x_L (S-18), policlonal de conejo, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 1/1000

p21 (C-19), policlonal de conejo, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 1/500

ErbB-2 (Neu C-18), policlonal de conejo, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 1/500

Ciclina D1 (72-13G), monoclonal, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 1/1000

MMP-9 (Ab-2), monoclonal, (Oncogene, San Diego, CA, USA) 1/100

MMP-2 (Ab-3), monoclonal, (Oncogene, San Diego, CA, USA) 1/200

uPA (M-20), policlonal de cabra, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 1/200

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. Las bandas obtenidas se scanearon, y se midió la densidad de cada una con el programa Image Quant (Sunnyvale, CA). Las formas fosforiladas de las proteínas fueron corregidas con sus respectivas proteínas totales. La significancia de las diferencias de intensidad entre dos tratamientos se analizó realizando un “t test” de muestras apareadas o mediante un ANOVA, comparando los tratamientos con el test de Tuckey.

OBTECIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

Los medios condicionados de células C4HD y LM3 tratadas por 24hs en medio libre de suero como se indica en cada experimento se recolectaron y centrifugaron a 500g para eliminar restos celulares. Las células fueron lisadas utilizando un *scraper* y se homogeneizaron en presencia del buffer de extracción como se describió previamente. El contenido proteico de cada extracto fue determinado de acuerdo al

método de Lowry. Los tratamientos indicados en cada experimento se realizaron por triplicado.

Para determinar los niveles de proteasas presentes en los medios condicionados mediante ensayos de WB, las células C4HD fueron tratadas por 24hs en medio libre de suero como se indica en cada experimento. Los medios condicionados se recolectaron, centrifugaron a 500g para eliminar restos celulares y concentraron 100 veces utilizando las unidades filtrantes Centricon YM-10 (Millipore, Bedford, MA). Las células fueron lisadas utilizando un *scraper* y se homogeneizaron en presencia del buffer de extracción como se describió previamente. El contenido proteico de cada extracto fue determinado de acuerdo al método de Lowry.

ZIMOGRAFÍAS DE MMPs Y UPA

MMPs

La actividad colagenolítica de MMP-2 y MMP-9 se evaluó en los medios condicionados preparados como se mencionó más arriba. Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida 7.5% con SDS co-polimerizado con gelatina 0.1% v/v como se describió previamente (174). Finalizada la corrida, los geles se lavaron con Triton X-100 2% v/v y se incubaron por 24hs a 37°C en un buffer colagenasa conteniendo Tris-Cl 50mM, NaCl 200mM, CaCl₂ 5mM (pH 7.4) para la detección específica de la actividad colagenolítica. Para la detección de bandas de actividad inespecífica se agregó EDTA 40mM al buffer colagenasa. Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de Comassie Blue R250 en 10% v/v de ácido acético y 30% v/v de metanol. Las bandas fueron detectadas por tinción negativa y la actividad gelatinolítica fue evaluada mediante densitometría con el programa ImageQuant (Sunnyvale, CA) corrigiéndola por la cantidad de proteínas.

UPA

La actividad de uPA fue evaluada en medios condicionados como se describió previamente (174). Brevemente, las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida 10% con SDS co-polimerizado con caseína 0.2% v/v y plasminógeno

10µg/ml para la detección de actividad específica o en ausencia de plasminógeno para la detección de actividad inespecífica. Los geles se lavaron con Tritón X-100 2% y se incubaron por 12hs para muestras de células C4HD y 2hs para muestras de células LM3 a 37°C en un buffer conteniendo Tris-Cl 20mM, EDTA 15mM (pH 8.3). Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de Comassie Blue R250 en 10% v/v de ácido acético y 30% v/v de metanol. Las bandas fueron detectadas por tinción negativa y la actividad caseinolítica fue evaluada mediante densitometría corrigiendo por la cantidad de proteínas al igual que para las MMPs.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada experimento se analizó la media de los triplicados \pm ES (error estándar) y se evaluó la significación estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de los distintos tratamientos entre sí se usó el test de Tuckey.

ENSAYO DE METÁSTASIS EXPERIMENTAL

La habilidad de las células LM3 de producir metástasis pulmonares se evaluó mediante un ensayo de metástasis experimental realizado en el Laboratorio de Investigación del Instituto de Oncología Angel H. Roffo (140). Para ello, se inyectaron en la vena de la cola de ratones hembra BALB/c 3×10^5 células LM3 *wild type* o LM3 transfectadas con el vector vacío pSG5, RP-B, C587A-RP o RP-BmPro como se describió previamente. Las células se inocularon en DMEM libre de suero y se utilizaron 10 ratones por cada grupo experimental. Con el objetivo de evaluar el efecto de la administración exógena de progestágenos, el mismo diseño experimental se llevó a cabo en ratones inoculados s.c. con 40mg de un *depot* de MPA. A los 28 días los ratones fueron sacrificados y se realizó el recuento de las metástasis pulmonares superficiales. Para confirmar que la expresión del RP regula la capacidad metastásica de las LM3, el mismo protocolo experimental fue realizado sacrificando a los animales al 7^{mo} día post-inyección.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico del número de metástasis en cada grupo experimental se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se presentan como la mediana y rango de metástasis para cada grupo experimental.

Reference List

1. Cancer incidence in five continents. Volume VIII 2002 IARC Sci Publ1-781
2. Jallal H, Valentino ML, Chen G, Boschelli F, Ali S, Rabbani SA 2007 A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 67:1580-1588
3. Schuetz F, Diel IJ, Poeschel M, von Holst T, Solomayer EF, Lange S, Sinn P, Bastert G, Sohn C 2007 Reduced incidence of distant metastases and lower mortality in 1072 patients with breast cancer with a history of hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 196:342-349
4. Palmieri D, Smith QR, Lockman PR, Bronder J, Gril B, Chambers AF, Weil RJ, Steeg PS 2006 Brain metastases of breast cancer. *Breast Dis* 26:139-147
5. Lux MP, Fasching PA, Beckmann MW 2006 Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med* 84:16-28
6. Claus EB, Schildkraut J, Iversen ES, Jr., Berry D, Parmigiani G 1998 Effect of BRCA1 and BRCA2 on the association between breast cancer risk and family history. *J Natl Cancer Inst* 90:1824-1829
7. Yang X, Lippman ME 1999 BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 54:1-10
8. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S 1970 Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* 43:209-221
9. 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
10. 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
11. Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P 1972 Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 48:605-613
12. Pike MC, Ross RK 2000 Progestins and menopause: epidemiological studies of risks of endometrial and breast cancer. *Steroids* 65:659-664
13. Berstad P, Ma H, Bernstein L, Ursin G 2007 Alcohol intake and breast cancer risk among young women. *Breast Cancer Res Treat*
14. McTiernan A, Ulrich C, Slate S, Potter J 1998 Physical activity and cancer etiology: associations and mechanisms. *Cancer Causes Control* 9:487-509
15. Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R, Sullivan-Halley J, Ross RK 1994 Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst* 86:1403-1408

16. Bernstein L 2002 Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:3-15
17. Pike MC, Spicer DV 2000 Hormonal contraception and chemoprevention of female cancers. *Endocr Relat Cancer* 7:73-83
18. Bernstein L, Ross RK 1993 Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:48-65
19. McManus MJ, Welsch CW 1984 The effect of estrogen, progesterone, thyroxine, and human placental lactogen on DNA synthesis of human breast ductal epithelium maintained in athymic nude mice. *Cancer* 54:1920-1927
20. Key TJ 1999 Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 6:175-180
21. Henderson BE, Feigelson HS 2000 Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:427-433
22. Greenblatt RB, Gambrell RD, Jr., Stoddard LD 1982 The protective role of progesterone in the prevention of endometrial cancer. *Pathol Res Pract* 174:297-318
23. Siiteri PK 1978 Steroid hormones and endometrial cancer. *Cancer Res* 38:4360-4366
24. King RJ 1993 William L. McGuire Memorial Symposium. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 27:3-15
25. Smith DC, Prentice R, Thompson DJ, Herrmann WL 1975 Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 293:1164-1167
26. Ziel HK, Finkle WD 1975 Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med* 293:1167-1170
27. Hemminki E, Kennedy DL, Baum C, McKinlay SM 1988 Prescribing of noncontraceptive estrogens and progestins in the United States, 1974-86. *Am J Public Health* 78:1479-1481
28. Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC 2000 Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst* 92:328-332
29. Magnusson C, Baron JA, Correia N, Bergstrom R, Adami HO, Persson I 1999 Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy. *Int J Cancer* 81:339-344
30. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R 2000 Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 283:485-491

31. Haslam SZ, Osuch JR, Raafat AM, Hofseth LJ 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
32. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A 2003 Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 289:3243-3253
33. Beral V 2003 Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-427
34. Jonat W, Kaufmann M, Sauerbrei W, Blamey R, Cuzick J, Namer M, Fogelman I, de Haes JC, de Matteis A, Stewart A, Eiermann W, Szakolczai I, Palmer M, Schumacher M, Geberth M, Lisboa B 2002 Goserelin versus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as adjuvant therapy in premenopausal patients with node-positive breast cancer: The Zoladex Early Breast Cancer Research Association Study. *J Clin Oncol* 20:4628-4635
35. Jakesz R, Hausmaninger H, Kubista E, Gnant M, Menzel C, Bauernhofer T, Seifert M, Haider K, Mlineritsch B, Steindorfer P, Kwasny W, Fridrik M, Steger G, Wette V, Samonigg H 2002 Randomized adjuvant trial of tamoxifen and goserelin versus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil: evidence for the superiority of treatment with endocrine blockade in premenopausal patients with hormone-responsive breast cancer--Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 5. *J Clin Oncol* 20:4621-4627
36. Schmid P, Untch M, Wallwiener D, Kosse V, Bondar G, Vassiljev L, Tarutinov V, Kienle E, Luftner D, Possinger K 2002 Cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil (CMF) versus hormonal ablation with leuprorelin acetate as adjuvant treatment of node-positive, premenopausal breast cancer patients: preliminary results of the TABLE-study (Takeda Adjuvant Breast cancer study with Leuprorelin Acetate). *Anticancer Res* 22:2325-2332
37. Bonneterre J, Thurlimann B, Robertson JF, Krzakowski M, Mauriac L, Koralewski P, Vergote I, Webster A, Steinberg M, von Euler M 2000 Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J Clin Oncol* 18:3748-3757
38. Mouridsen H, Gershonovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Janicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D, Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Lassus M, Verbeek JA, Staffler B, Chaudri-Ross HA, Dugan M 2001 Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 19:2596-2606
39. Kurebayashi J 2007 Current clinical trials of endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 14:200-214

40. Spicer DV, Pike MC 2000 Future possibilities in the prevention of breast cancer: luteinizing hormone-releasing hormone agonists. *Breast Cancer Res* 2:264-267
41. Utsumi T, Kobayashi N, Hanada H 2007 Recent perspectives of endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 14:194-199
42. Johnston JB, Navaratnam S, Pitz MW, Maniate JM, Wiechec E, Baust H, Gingerich J, Skliris GP, Murphy LC, Los M 2006 Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. *Curr Med Chem* 13:3483-3492
43. Engel RH, Kaklamani VG 2007 HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies. *Drugs* 67:1329-1341
44. Anderson E, Clarke RB 2004 Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9:3-13
45. Lamote I, Meyer E, Massart-Leen AM, Burvenich C 2004 Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69:145-159
46. Lydon JP, Sivaraman L, Conneely OM 2000 A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:325-338
47. Hennighausen L, Robinson GW 1998 Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* 12:449-455
48. Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK 2002 Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:17-38
49. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW 1995 Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266-2278
50. Kregge JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O 1998 Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15677-15682
51. Brisken C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'Malley BW, Weinberg RA 1998 A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5076-5081
52. Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, Dickson C 1995 Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9:2364-2372
53. Musgrove EA, Lee CS, Buckley MF, Sutherland RL 1994 Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8022-8026

54. Said TK, Conneely OM, Medina D, O'Malley BW, Lydon JP 1997 Progesterone, in addition to estrogen, induces cyclin D1 expression in the murine mammary epithelial cell, in vivo. *Endocrinology* 138:3933-3939
55. Ismail PM, Amato P, Soyala SM, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW, Lydon JP 2003 Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis--as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids* 68:779-787
56. Lange CA, Richer JK, Horwitz KB 1999 Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol Endocrinol* 13:829-836
57. Moore MR, Conover JL, Franks KM 2000 Progesterone effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 277:650-654
58. Sutherland RL, Prall OW, Watts CK, Musgrove EA 1998 Estrogen and progesterone regulation of cell cycle progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:63-72
59. Clarke CL, Sutherland RL 1990 Progesterone regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev* 11:266-301
60. Lydon JP, Ge G, Kittrell FS, Medina D, O'Malley BW 1999 Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function. *Cancer Res* 59:4276-4284
61. Groshong SD, Owen GI, Grimison B, Schauer IE, Todd MC, Langan TA, Sclafani RA, Lange CA, Horwitz KB 1997 Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol Endocrinol* 11:1593-1607
62. Lange CA, Richer JK, Shen T, Horwitz KB 1998 Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273:31308-31316
63. Richer JK, Lange CA, Manning NG, Owen G, Powell R, Horwitz KB 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
64. Labriola L, Salatino M, Proietti CJ, Pecci A, Coso OA, Kornblihtt AR, Charreau EH, Elizalde PV 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
65. Salatino M, Schillaci R, Proietti CJ, Carnevale R, Frahm I, Molinolo AA, Iribarren A, Charreau EH, Elizalde PV 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
66. Faivre E, Skildum A, Pierson-Mullany L, Lange CA 2005 Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70:418-426
 67. Faivre EJ, Lange CA 2007 Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 27:466-480
 68. Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ, Edwards DP 2007 The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol* 21:359-375
 69. Balana ME, Labriola L, Salatino M, Movsichoff F, Peters G, Charreau EH, Elizalde PV 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
 70. Balana ME, Lupu R, Labriola L, Charreau EH, Elizalde PV 1999 Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 18:6370-6379
 71. Proietti C, Salatino M, Roseblit C, Carnevale R, Pecci A, Kornblihtt AR, Molinolo AA, Frahm I, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV 2005 Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 25:4826-4840
 72. Jacobsen BM, Richer JK, Sartorius CA, Horwitz KB 2003 Expression profiling of human breast cancers and gene regulation by progesterone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8:257-268
 73. Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK, Horwitz KB 2005 Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol* 19:574-587
 74. Edwards DP, Wardell SE, Boonyaratanakornkit V 2002 Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:173-186
 75. Beato M, Chavez S, Truss M 1996 Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61:240-251
 76. 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
77. Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT, O'Malley BW 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
 78. Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP 2003 Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68:761-770
 79. Sartorius CA, Shen T, Horwitz KB 2003 Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Res Treat* 79:287-299
 80. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL 2002 Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 72:163-172
 81. Shyamala G, Yang X, Silberstein G, Barcellos-Hoff MH, Dale E 1998 Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:696-701
 82. Shyamala G, Yang X, Cardiff RD, Dale E 2000 Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3044-3049
 83. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SA 2004 Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* 10:2751-2760
 84. Weigel NL 1996 Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319 (Pt 3):657-667
 85. Li X, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW 2003 Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol* 23:3763-3773
 86. Rowan BG, O'Malley BW 2000 Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65:545-549
 87. Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen JD, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW 2002 Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7940-7944
 88. Qiu M, Lange CA 2003 MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:147-157
 89. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement JP, Prendergast P, Yip TT, Hutchens TW, Edwards DP, Weigel NL 1997 Phosphorylation of human progesterone

- receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol* 11:823-832
90. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL 1995 Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 9:1029-1040
 91. Lange CA, Shen T, Horwitz KB 2000 Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1032-1037
 92. Qiu M, Olsen A, Faivre E, Horwitz KB, Lange CA 2003 Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 17:628-642
 93. Shen T, Horwitz KB, Lange CA 2001 Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 21:6122-6131
 94. Wehling M, Kasmayr J, Theisen K 1990 Aldosterone influences free intracellular calcium in human mononuclear leukocytes in vitro. *Cell Calcium* 11:565-571
 95. Barsony J, Marx SJ 1991 Rapid accumulation of cyclic GMP near activated vitamin D receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1436-1440
 96. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS 1994 Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8517-8521
 97. Wasserman WJ, Pinto LH, O'Connor CM, Smith LD 1980 Progesterone induces a rapid increase in $[Ca^{2+}]_i$ in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1534-1536
 98. Turner KO, Meizel S 1995 Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 213:774-780
 99. Wehling M 1997 Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59:365-393
 100. Christ M, Haseroth K, Falkenstein E, Wehling M 1999 Nongenomic steroid actions: fact or fantasy? *Vitam Horm* 57:325-373
 101. Wehling M, Losel R 2006 Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:180-183
 102. Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M 2006 Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology* 147:3133-3140

103. Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M 2000 Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 21:57-94
104. Funder JW 2005 The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 26:313-321
105. Song RX, Santen RJ 2006 Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol Reprod* 75:9-16
106. Bagowski CP, Myers JW, Ferrell JE, Jr. 2001 The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 276:37708-37714
107. Peluso JJ, Fernandez G, Pappalardo A, White BA 2001 Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 65:94-101
108. Peluso JJ, Bremner T, Fernandez G, Pappalardo A, White BA 2003 Expression pattern and role of a 60-kilodalton progesterone binding protein in regulating granulosa cell apoptosis: involvement of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Reprod* 68:122-128
109. Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M 1996 Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* 239:726-731
110. Zhu Y, Bond J, Thomas P 2003 Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2237-2242
111. Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P 2003 Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2231-2236
112. Ferrell JE, Jr. 1999 *Xenopus* oocyte maturation: new lessons from a good egg. *Bioessays* 21:833-842
113. Edwards DP 2005 Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67:335-376
114. 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
115. 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

116. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP 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
117. Lange CA 2004 Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol* 18:269-278
118. Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F 1999 Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J* 18:2500-2510
119. Skildum A, Faivre E, Lange CA 2005 Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 19:327-339
120. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD 1986 Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 33:215-223
121. Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD 1987 Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 79:1341-1350
122. Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD, Charreau EH 1989 Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int J Cancer* 43:845-850
123. Kordon EC, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH, Pazos P, Dran G, Lanari C 1993 Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between progestin dependence and morphology. *Breast Cancer Res Treat* 28:29-39
124. Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB 1994 New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Res* 54:3868-3877
125. Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB 1993 Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol* 7:1256-1265
126. Wu J, Brandt S, Hyder SM 2005 Ligand- and cell-specific effects of signal transduction pathway inhibitors on progestin-induced vascular endothelial growth factor levels in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 19:312-326

127. Viegas LR, Vicent GP, Baranao JL, Beato M, Pecci A 2004 Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4. *J Biol Chem* 279:9831-9839
128. Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB 1998 Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 273:10696-10701
129. Dano K, Romer J, Nielsen BS, Bjorn S, Pyke C, Rygaard J, Lund LR 1999 Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types. *APMIS* 107:120-127
130. Lockwood CJ, Krikun G, Papp C, Aigner S, Schatz F 1995 Biological mechanisms underlying the clinical effects of RU 486: modulation of cultured endometrial stromal cell plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1100-1105
131. Casslen B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert M, Lund LR 1995 Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (u-PA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the u-PA receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2776-2784
132. McDonnell AC, Murdoch WJ 2001 High-dose progesterone inhibition of urokinase secretion and invasive activity by SKOV-3 ovarian carcinoma cells: evidence for a receptor-independent nongenomic effect on the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78:185-191
133. Lin VC, Eng AS, Hen NE, Ng EH, Chowdhury SH 2001 Effect of progesterone on the invasive properties and tumor growth of progesterone receptor-transfected breast cancer cells MDA-MB-231. *Clin Cancer Res* 7:2880-2886
134. Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y 1992 Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11789-11793
135. van den Brule FA, Engel J, Stetler-Stevenson WG, Liu FT, Sobel ME, Castronovo V 1992 Genes involved in tumor invasion and metastasis are differentially modulated by estradiol and progestin in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 52:653-657
136. Aguirre Ghiso JA, Farias EF, Alonso DF, Bal de Kier JE 1998 Secretion of urokinase and metalloproteinase-9 induced by staurosporine is dependent on a tyrosine kinase pathway in mammary tumor cells. *Int J Cancer* 76:362-367
137. Puricelli L, Proietti CJ, Labriola L, Salatino M, Balana ME, Aguirre GJ, Lupu R, Pignataro OP, Charreau EH, Bal de Kier JE, Elizalde PV 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
138. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC 2000 Temporal progression of metastasis in lung:

- cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60:2541-2546
139. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC 2002 Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2:563-572
 140. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC 1998 Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153:865-873
 141. Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P, Baserga R 1995 The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 55:2463-2469
 142. Welch DR 1997 Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis* 15:272-306
 143. Lin VC, Jin R, Tan PH, Aw SE, Woon CT, Bay BH 2003 Progesterone induces cellular differentiation in MDA-MB-231 breast cancer cells transfected with progesterone receptor complementary DNA. *Am J Pathol* 162:1781-1787
 144. Saitoh M, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohta T, Doshida M, Takahashi T, Igarashi H, Mori-Abe A, Du B, Tsutsumi S, Kurachi H 2005 Medroxyprogesterone acetate induces cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 expression via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor-kappaB cascade in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146:4917-4925
 145. Moore MR 2004 A rationale for inhibiting progesterone-related pathways to combat breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 4:183-189
 146. Gonzalez L, Agullo-Ortuno MT, Garcia-Martinez JM, Calcabrini A, Gamallo C, Palacios J, Aranda A, Martin-Perez J 2006 Role of c-Src in human MCF7 breast cancer cell tumorigenesis. *J Biol Chem* 281:20851-20864
 147. Ishizawa RC, Tice DA, Karaoli T, Parsons SJ 2004 The C terminus of c-Src inhibits breast tumor cell growth by a kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* 279:23773-23781
 148. Bowden RT, Hissom JR, Moore MR 1989 Growth stimulation of T47D human breast cancer cells by the anti-progestin RU486. *Endocrinology* 124:2642-2644
 149. Zhang Y, Bai W, Allgood VE, Weigel NL 1994 Multiple signaling pathways activate the chicken progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 8:577-584
 150. Menendez JA, Oza BP, Colomer R, Lupu R 2005 The estrogenic activity of synthetic progestins used in oral contraceptives enhances fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival. *Int J Oncol* 26:1507-1515

151. Ory K, Lebeau J, Levalois C, Bishay K, Fouchet P, Allemand I, Therwath A, Chevillard S 2001 Apoptosis inhibition mediated by medroxyprogesterone acetate treatment of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 68:187-198
152. Dittrich C, Jakesz R, Wrba F, Havelec L, Haas O, Spona J, Holzner H, Kolb R, Moser K 1985 The human tumour cloning assay in the management of breast cancer patients. *Br J Cancer* 52:197-203
153. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA 1993 Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9:541-573
154. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M 2004 Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 164:1131-1139
155. Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, Rogers PA, Affandi B, Kovacs G, Salamonsen LA 2002 Decreased tissue inhibitor of metalloproteinase in the endometrium of women using depot medroxyprogesterone acetate: a role for altered endometrial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase balance in the pathogenesis of abnormal uterine bleeding? *Hum Reprod* 17:1189-1198
156. Park DW, Ryu HS, Choi DS, Park YH, Chang KH, Min CK 2001 Localization of matrix metalloproteinases on endometrial cancer cell invasion in vitro. *Gynecol Oncol* 82:442-449
157. Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ 1988 Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62:531-533
158. Leo JC, Wang SM, Guo CH, Aw SE, Zhao Y, Li JM, Hui KM, Lin VC 2005 Gene regulation profile reveals consistent anticancer properties of progesterone in hormone-independent breast cancer cells transfected with progesterone receptor. *Int J Cancer* 117:561-568
159. Sumida T, Itahana Y, Hamakawa H, Desprez PY 2004 Reduction of human metastatic breast cancer cell aggressiveness on introduction of either form a or B of the progesterone receptor and then treatment with progestins. *Cancer Res* 64:7886-7892
160. Costa SD, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M 2002 Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer--results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *Eur J Cancer* 38:1329-1334
161. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM 2003 Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21:1973-1979

162. Myoui A, Nishimura R, Williams PJ, Hiraga T, Tamura D, Michigami T, Mundy GR, Yoneda T 2003 C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis. *Cancer Res* 63:5028-5033
163. Tan M, Li P, Klos KS, Lu J, Lan KH, Nagata Y, Fang D, Jing T, Yu D 2005 ErbB2 promotes Src synthesis and stability: novel mechanisms of Src activation that confer breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65:1858-1867
164. Rucci N, Recchia I, Angelucci A, Alamanou M, Del Fattore A, Fortunati D, Susa M, Fabbro D, Bologna M, Teti A 2006 Inhibition of protein kinase c-Src reduces the incidence of breast cancer metastases and increases survival in mice: implications for therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 318:161-172
165. Todaro LB, Ladeda V, Bal de Kier JE, Farias EF 2003 Combined treatment with verapamil, a calcium channel blocker, and B428, a synthetic uPA inhibitor, impairs the metastatic ability of a murine mammary carcinoma. *Oncol Rep* 10:725-732
166. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J 2002 Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-333
167. Saegusa M, Okayasu I 1998 Progesterone therapy for endometrial carcinoma reduces cell proliferation but does not alter apoptosis. *Cancer* 83:111-121
168. Camaggi CM, Strocchi E, Canova N, Costanti B, Pannuti F 1985 Medroxyprogesterone acetate (MAP) and tamoxifen (TMX) plasma levels after simultaneous treatment with 'low' TMX and 'high' MAP doses. *Cancer Chemother Pharmacol* 14:229-231
169. Bergkvist L, Adami HO, Persson I, Hoover R, Schairer C 1989 The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *N Engl J Med* 321:293-297
170. Elizalde PV, Lanari C, Molinolo AA, Guerra FK, Balana ME, Simian M, Iribarren AM, Charreau EH 1998 Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:305-317
171. Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Montecchia F, Charreau EH, Pasqualini CD, Lanari C 1995 Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 35:173-186
172. 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

173. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
174. Urtreger AJ, Grossoni VC, Falbo KB, Kazanietz MG, Bal de Kier Joffe ED 2005 Atypical protein kinase C-zeta modulates clonogenicity, motility, and secretion of proteolytic enzymes in murine mammary cells. *Mol Carcinog* 42:29-39