

Tesis Doctoral

Efectos genómicos y no genómicos de progestágenos en carcinomas mamarios murinos en estadios diferentes de hormono-dependencia

Bottino, María Cecilia

2008

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

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

Cita tipo APA:

Bottino, María Cecilia. (2008). Efectos genómicos y no genómicos de progestágenos en carcinomas mamarios murinos en estadios diferentes de hormono-dependencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bottino, María Cecilia. "Efectos genómicos y no genómicos de progestágenos en carcinomas mamarios murinos en estadios diferentes de hormono-dependencia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**EFFECTOS GENOMICOS Y NO GENOMICOS DE
PROGESTAGENOS EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS
EN ESTADIOS DIFERENTES DE HORMONO-DEPENDENCIA**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

María Cecilia Bottino

Director de Tesis: Claudia L. M. Lanari

Consejero de estudios: Omar Coso

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental
Buenos Aires, 2008.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
PARTE I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	8
I. Cáncer de mama.....	9
Cáncer de mama y hormonas.....	12
Marcadores predictivos en cáncer de mama.....	14
II. Receptores hormonales.....	18
Receptores de estrógenos.....	18
Receptores de progesterona.....	19
III. Mecanismos no-genómicos. Localización extra nuclear de receptores.....	24
Señalización iniciada por receptores de glucocorticoides.....	26
Señalización iniciada por receptores de mineralocorticoides.....	27
Señalización iniciada por receptores de andrógenos.....	29
Señalización iniciada por receptores de estrógenos.....	32
Señalización iniciada por receptores de progesterona.....	35
IV. Tratamiento del cáncer de mama.....	43
Antiprogestágenos.....	45
V. Modelos experimentales.....	49
Modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios por progestagenos.....	52
OBJETIVOS	57
PARTE II: MATERIALES Y METODOS	58
I. Animales, tumores y líneas celulares.....	59
Animales.....	59
Pasajes tumorales.....	59
Tumores.....	59
Líneas celulares.....	61
II. Cultivo celular.....	62
Cultivos primarios.....	64

Ensayos de proliferación celular.....	66
III. Estudios de microscopia.....	66
Ensayo de Pg-BSA-FITC.....	66
Inmunofluorescencia.....	67
Ensayo de colocacion por inmunofluorescencia.....	68
IV. Obtención de extractos.....	68
Extractos de membrana.....	69
Actividad de Lactato Deshidrogenasa.....	71
Extractos totales.....	72
V. <i>Western Blot</i>	73
Método de Lowry.....	73
<i>Western Blot</i>	74
VI. Determinación de AMPc intracelular.....	78
VII. Ensayos de PCR.....	79
VIII. Análisis estadístico.....	83
PARTE III: RESULTADOS.....	84
I. Respuesta al tratamiento hormonal de los tumores C4-HD y C4-HI.....	85
II. Presencia del receptor de progesterona clásico en la membrana celular.....	90
A.Detección del RP mediante microscopía confocal.....	90
B.Detección del RP en extractos de membrana mediante western blot.....	100
III. Presencia de los receptores n6veles (mRP) en la membrana celular.....	105
IV. Efectos no gen6micos inducidos por MPA y RU-486.....	109
A.Efectos de MPA y RU-486 sobre la v6a de ERK1-2 (MAPK p44 y p42).....	109
B.Efectos de MPA y RU-486 sobre la v6a de AMPc.....	115
V. Efectos del RU-486 sobre la proliferaci6n celular.....	117
VI. Efectos inducidos por el tratamiento un antiprogest6geno n6vel (ZK 230 211) y progesterona.....	120
A.Efectos inducidos por ZK 230 211 sobre la proliferaci6n celular.....	120
B.Efectos inducidos por progesterona.....	122
PARTE IV: DISCUSI6N Y CONCLUSIONES.....	128
Conclusiones Parciales.....	145
Conclusi6n General.....	147
PARTE V: BIBLIOGRAFIA.....	148

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis pudo ser realizado gracias a la colaboración y apoyo de muchas personas que estuvieron a mi lado durante estos casi 6 años...

A mi familia, mama, papá, Juli, la abuela Rubi y la abuela Celia, y los abuelos que ya no están con nosotros pero siguen a nuestro lado. Porque desde el día que empecé esta carrera nunca dudaron de mí; aprendieron conmigo, y me acompañaron siempre. Especialmente a mi abuelo Tito, que no me canso de repetir, que fue quien sembró en mí la curiosidad y las ganas de investigar.

A mi novio y futuro esposo Mauro porque, no sólo sabe sobre esta tesis casi lo mismo que yo de tanto escucharme, sino porque además no me dejó rendirme nunca, me acompañó y estuvo al lado mío en los buenos momentos y en los no tan lindos.

A todos los chicos del laboratorio: Caro, Vic, Pao, Virgi, Pao, Sebas, Juan, Viqui, Juli, María, Rocío y Pablo, que hicieron que estos años fuesen divertidos y casi verdes de tanto mate. Que sumaron al trabajo risas y que estuvieron siempre dispuestos a darme una mano. Por su colaboración en este trabajo quiero agradecer especialmente a Ro por la compañía en nuestros primeros tiempos y por sus conocimientos de inmuno, a Juli porque gracias a sus ratonas pude hacer todo, a Sebas por ver infinitas veces bandas en placas de revelado, a María por toda la ayuda en cultivo, a Pao por soportar todas y cada una de mis preguntas sobre PCR, a Pablo por su ayuda con el microscopio. A Caro y Vic porque, por ser las más antiguas del laboratorio, me ayudaron prácticamente con todo y corrigieron este manuscrito. Por si tantos no eran suficientes, quiero agradecerle también a Ari, que es casi como del laboratorio, por estar siempre presente, por las clases de francés compartidas y por su alegría.

A Claudia, porque con su paciencia, su capacidad de ver siempre el medio vaso lleno (y resultados positivos), y su apoyo constante fue una excelente directora de tesis. Porque es una INVESTIGADORA con mayúscula, capaz no sólo de investigar sino de transmitir los conocimientos y las ganas de hacerlo. Gracias por no dudar nunca de mis capacidades y ayudarme a seguir adelante siempre.

A Isabel, Juan Carlos y Omar. Porque siendo los jefes de sus respectivos laboratorios siempre tuvieron tiempo para ayudarme.

A Alfredo, porque estando lejos, siempre se hizo un rato para corregir manuscritos, mandar papers y comprar reactivos.

A los chicos de la Facu por compartir alegrías y desventuras desde hace tantos años. Especialmente a Naty G, Naty Fer, Isa y Cinthia porque al compartir instituto compartimos prácticamente todo el doctorado.

A la Dra. Elisa Bal por prestar gentilmente la línea celular LM3 que fue utilizada como control en este trabajo de tesis.

A toda la gente del IByME, que no puedo mencionar de a uno porque son muchos, gracias por estar siempre dispuestos a dar una mano.

A todos, GRACIAS!

EFFECTOS GENÓMICOS Y NO GENÓMICOS DE PROGESTÁGENOS EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS EN ESTADIOS DIFERENTES DE HORMONO-DEPENDENCIA

RESUMEN

Los estrógenos y la progesterona se unen a sus respectivos receptores para ejercer su acción. Los receptores para hormonas esteroideas fueron históricamente considerados nucleares, sin embargo existen evidencias en la actualidad de un rol no-genómico de los mismos, ejercido a través de su localización en membrana. Si bien ya se ha descrito la presencia de receptores clásicos en membrana para estrógenos y glucocorticoides, aún no se han encontrado para la progesterona.

El estudio del mecanismo de acción de las hormonas esteroideas sexuales así como también de sus receptores específicos, receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), es sumamente importante en el campo de la oncología mamaria ya que en la clínica, la expresión de estos receptores es un parámetro esencial para determinar el tratamiento a seguir.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado el modelo experimental de obtención de adenocarcinomas mamarios murinos de origen ductal inducidos por administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona (MPA) en ratones hembra BALB/c. Se establecieron líneas tumorales hormono-dependientes (HD) y hormono-independientes (HI) que expresan altos niveles de RE y RP. En estudios previos describimos dos sitios de unión a progesterona, el sitio clásico de alta capacidad, y otro nivel de mayor afinidad y baja capacidad.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de los RP en la membrana celular de tumores HD y HI, y su participación en efectos genómicos y no-genómicos.

Observamos la localización en membrana de ambas isoformas del RP y demostramos que, tanto agonistas como el antagonista RU-486, regulan por igual la distribución de los RP en la membrana y en el núcleo celular a tiempos cortos. Además, demostramos la expresión de los receptores nóveles para progesterona, recientemente descritos, que también tienen localización en la membrana: mPR α , mPR β y mPR γ . Se ha demostrado que la activación de los mismos induce una disminución de AMPc.

Estudiamos dos vías paradigmáticas de señalización, como la activación de ERK 1/2 y la regulación de AMPc, que resultaron ser activadas tanto por MPA como por RU-486. Teniendo en cuenta que los receptores nóveles no se activan con estos ligandos, se sugiere la participación del RP clásico localizado en la membrana celular. Además detectamos que la progesterona, el agonista natural del RP, es capaz de desencadenar los mismos efectos que el MPA.

Por último, analizamos el efecto biológico desencadenado por el antagonista y observamos que el tratamiento de un cultivo primario con RU-486 a concentraciones menores al Kd del receptor generó un efecto proliferativo, mientras que a concentraciones iguales o mayores que el Kd clásico, su efecto fue inhibitorio.

Resumiendo, los efectos finales de la activación de RP localizado en la membrana celular difieren según la concentración de la hormona utilizada. En el caso del MPA, su efecto biológico es siempre proliferativo, sin importar la concentración utilizada. Cuando el tratamiento se realiza con RU-486, el resultado de la activación de estas vías depende de la concentración de hormona utilizada. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren el uso de dosis de antiprogestágenos en el tratamiento del cáncer que garanticen la obtención de efectos genómicos.

Palabras clave: carcinoma de mama, receptor de progesterona, membrana plasmática, progestágenos, antiprogestágenos, acetato de medroxiprogesterona, RU-486, progesterona, vías de señalización.

GENOMIC AND NON-GENOMIC EFFECTS OF PROGESTINS IN A MURINE MAMMARY CARCINOMA AT DIFFERENT STAGES OF HORMONE-DEPENDENCY

ABSTRACT

Estrogen and progesterone bind to their respective receptors to initiate their action. The steroid receptors were historically considered as nuclear, however, nowadays, many evidences suggest they may play a non-genomic role through their membrane localization.

The understanding of the mechanisms related to hormone action has become a very important issue in the breast cancer field since the level of estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) determine the therapy selection.

In our laboratory, we have developed an experimental model of murine ductal mammary adenocarcinomas induced by the administration of medroxyprogesterone acetate (MPA), in BALB/c mice. We have established hormone-dependent (HD), and hormone-independent (HI) lines, both expressing high levels of ER and PR. In previous studies, we have described two binding sites to progesterone, the classical one, with a high capacity, and a novel site with higher affinity and lower capacity.

The aim of this work was to study the presence of PR at the cell membrane of HD and HI tumors, and to study their role mediating genomic and non-genomic effects.

We have detected both PR isoforms located at the cell membrane. We also demonstrated a similar distribution of membrane and nuclear PR after priming with MPA or with the antagonist RU-486. We have also detected the presence of the novel progesterone receptors mPR α , mPR β and mPR γ . The activation of these receptors has been reported to be associated with a decrease in cAMP levels.

We have studied two paradigmatic signaling pathways, ERK 1/2 activation and cAMP regulation, that were similarly activated by MPA and RU-486, suggesting that the classical PR located at the cell membrane might be responsible for this effect. Progesterone was as efficient as MPA inducing ERK activation.

These data, showing similar rapid effects mediated by agonist and antagonist prompted us to investigate the role of low concentrations of antagonist in cell proliferation. As expected, concentrations of RU-486 lower than those able to bind the classical PR to elicit the genomic effects, were able to stimulate cell proliferation, while higher concentrations were inhibitory.

To sum up, our results suggest the presence of classical PR at the cell membrane of murine mammary carcinomas. The activation of these receptors with agonists or antagonists regulates non genomic pathways and PR distribution. In the case of MPA and progesterone, their biological effect is always proliferative, no matter the concentration used to treat the cells. RU-486, on the other hand, at low concentrations, not high enough to activate the classical binding site, will elicit only the proliferative signals, at higher concentrations, in spite of activating MAPK it will induce an inhibition of cell proliferation. These results suggest that in the clinic, concentrations high enough to activate the classic nuclear PR should be use to inhibit tumor growth.

Keywords: mammary carcinoma, progesterone receptor, plasmatic membrane, progestins, antiprogestins, medroxyprogesterone acetate, RU-486, progesterone, signaling pathways.

ABREVIATURAS

11 β HSD2	Enzima 11 β -hidroxisteroide dehidrogenasa tipo 2
AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANG-II	Angiotensina II
BSA	Seroalbúmina bovina
cav-1	Caveolina-1
CDK-2	Proteína quinasa 2 dependiente de ciclinas
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (<i>cAMP response element binding protein</i>)
DBD	Dominio de unión a ADN
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno
E	Estrógenos
E ₂	17- β -estradiol
EC ₅₀	50% de la concentración efectiva máxima
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
FGF	Factores de crecimiento fibroblásticos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gc	Glucocorticoides
GEM	Ratones modificados genéticamente
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GPR30	Receptor huérfano acoplado a proteína G
HD	Hormono-dependiente
HI	Hormono-independiente
HI-R	Hormono-independiente respondedores
Hpr6.6	Receptor progesterona hemo 6.6
HRE	Elemento respondedor de hormonas
HRT	Terapias hormonales de reemplazo
HSP	Proteínas de golpe de calor

IP	Ioduro de propidio
JNK	Quinasa NH2 terminal de c-Jun
JNK/SAPK	Proteína quinasa activada por estrés o quinasa Jun-aminoterminal (<i>Stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase</i>)
Kd	Constante de disociación
LBD	Dominio de unión al ligando
LDH	Enzima lactato deshidrogenada
MAPK p44/42 o ERK 1/2	Proteínas quinasas activadas por mitógenos p44/42
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MISS	Señalización iniciada por esteroides en membrana
MKP-1	MAPK fosfatasa 1
MMTV	Virus de tumor mamario murino
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
mRP α , mRP β y mRP γ	RP de membrana alfa, beta y gama
NISS	Señalización iniciada por esteroides en núcleo
NMU	N-nitrosometilurea
NO	Óxido nítrico
PD/HD	Progestágeno dependientes/hormono-dependientes
Pg	Progesterona
PGRMC1	Componente 1 del RP de membrana
PGRMC2	Componente 2 del RP de membrana
PI/HI	Progestágeno independientes/hormono-independientes
PI3	Fosfatidilinositol-3
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKB/Akt	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RA	Receptor de andrógenos
RE	Receptor de estrógenos
RE α	Receptor de estrógenos alfa
RE β	Receptor de estrógenos beta
RG	Receptor de glucocorticoides

RIA	Radioinmunoensayo
RM	Receptor de mineralocorticoides
RP	Receptores de progesterona
RP-A	Receptor de progesterona A
RP-B	Receptor de progesterona B
RP-C	Receptor de progesterona C
RTK	Receptores tirosin-quinasa
RU-486	RU 38.486 o Mifepristona
SERD	Disruptor selectivo del RE (<i>selective estrogen receptor disrupter</i>)
SERM	Modulador selectivo de receptores estrogénicos
SFB	Suero fetal bovino
SHBG	Globulina de unión a hormonas sexuales
Shc	Proteínas que contienen el dominio SH2 (<i>SH2-containing domain</i>)
SN	Sobrenadante
SR	Receptores de hormonas esteroides
Src	Tirosin-quinasa Src
SREs	Elementos de respuesta a esteroides
UV	Radiación ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WB	Western Blot
WHI	Estudio aleatorio de la Iniciativa para la Salud de la Mujer: The Women's Health Initiative Randomized Trial)
ZK-211	ZK-230211
ZK-299	ZK 98 299 u Onapristona

PARTE I

INTRODUCCION

OBJETIVOS

I. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el segundo cáncer más diagnosticado en todo el mundo. Entre las mujeres, abarca el 28% de todos los tipos de cáncer diagnosticados (Knolwes M.A.; Selby P. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer).

La Asociación Americana del Cáncer lleva adelante registros estadísticos para los Estados Unidos. En la tabla 1.1, donde se detalla el porcentaje estimado de muertes por cáncer en el año 2007 para este país para hombres y mujeres discriminando el tipo cáncer, se observa que el cáncer de mama en mujeres representa la segunda causa de muerte por cáncer.

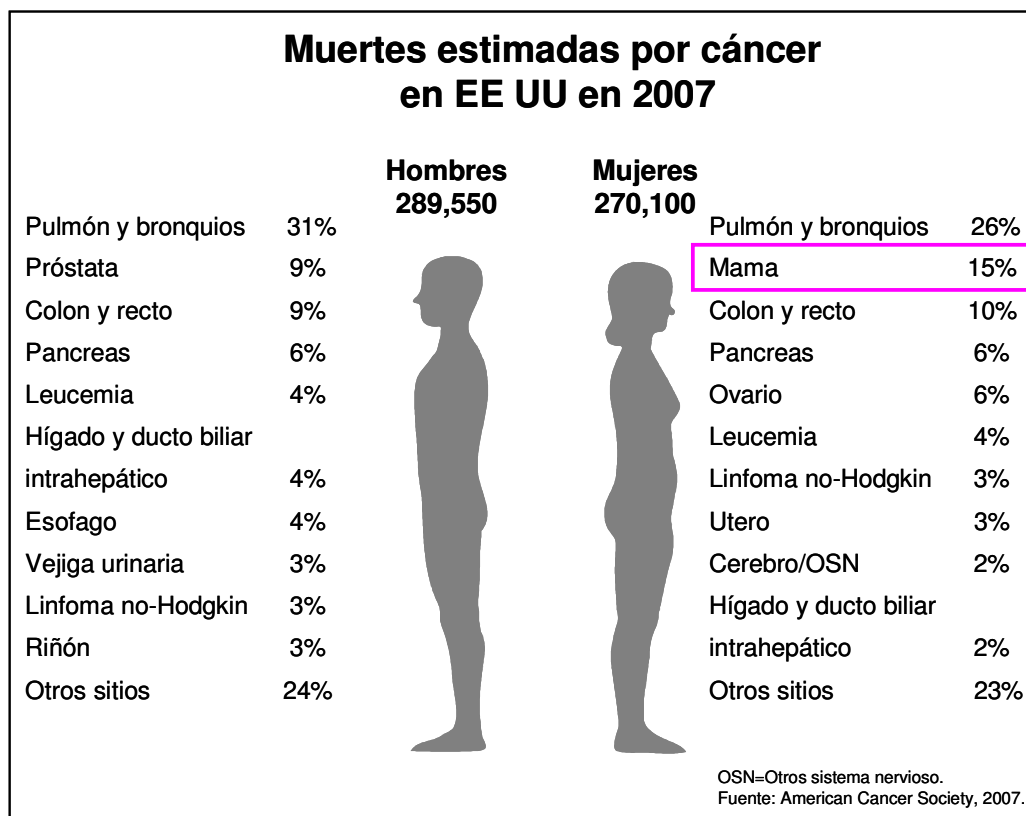


Tabla 1.1: Muertes estimadas por cáncer en USA en el año 2007 para hombres y mujeres.

A continuación se presenta una tabla que detalla la incidencia y mortalidad por cáncer de mama en los países de América Latina, obtenida del Vol IV de “Incidencia del Cáncer en cinco Continentes” (*Cancer Incidence in Five Continents*). En dicha tabla observamos que nuestro país es el 2do país de América del Sur, luego de

Uruguay, con la tasa estandarizada por edad (TEE) de incidencia y mortalidad más alta por cáncer de mama. Esta tasa es una medida de la tasa que tendría una población si tuviese una estructura estandarizada de edades. Se realiza cuando se comparan poblaciones de diferentes edades, dado que la edad tiene mucha influencia en la incidencia y mortalidad en el cáncer de mama.










País/Región	Incidencia			Mortalidad		
	Casos	Tasa Cruda	TEE	Muertes	Tasa Cruda	TEE
América del Sur	75907	42.3	46.0	24681	13.8	15.1
 Argentina	17017	88.1	73.9	5362	27.8	21.8
 Bolivia	765	17.5	24.7	357	8.2	11.6
 Brazil	37528	42.5	46.0	11283	12.8	14.1
 Chile	3668	46.7	43.9	1126	14.3	13.1
 Colombia	5526	25.1	30.3	2253	10.2	12.5
 Ecuador	1221	18.7	23.5	498	7.6	9.7
 Guyana	96	24.4	29.5	37	9.4	11.9
 Paraguay	687	24.0	34.4	265	9.3	13.9
 Peru	3845	28.8	35.1	1497	11.2	14.0
 Suriname	55	26.0	30.0	23	10.9	12.9
 Uruguay	1931	110.9	83.1	637	36.6	24.1
 Venezuela	3514	28.2	34.3	1327	10.7	13.4

Tabla 1.2: Incidencia del cáncer de mama en América Latina. Datos crudos y estandarizados por edad por 100.000. Fuente: Globocan 2002, Vol IV de *Cancer Incidence in Five Continents*, UICC. Tasa cruda: calculada dividiendo el número de nuevos cánceres durante un período de tiempo por el correspondiente número de personas de la población en riesgo. TEE: tasa estandarizada por edad.

La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad (Bernstein, 2002) y existen varios factores de riesgo relacionados a hormonas que se asocian a una mayor incidencia del cáncer de mama humano. Los factores más destacados son:

- a. Predisposición genética (mutaciones de los genes BRCA)
- b. Menarca temprana.
- c. Menopausia tardía.
- d. Primer embarazo tardío.
- e. Ausencia de amamantamiento postparto o períodos de amamantamiento cortos.
- f. Nuliparidad y/o fallas en la ovulación.
- g. Obesidad en mujeres post-menopáusicas.
- h. Dietas ricas en grasas y proteínas.
- i. Tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos y progestágenos.

Los genes BRCA, BRCA1 y BRCA2 son genes supresores tumorales, y se encuentran asociados a una susceptibilidad hereditaria para el desarrollo de tumores de mama y ovario. Las mujeres que poseen mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 presentan hasta un 85% de probabilidad de ser diagnosticadas con cáncer de mama a la edad de 70 años (Aupperlee et al., 2005a). Se ha postulado que la mutación de BRCA1 (en heterocigocidad) lleva a un aumento del riesgo relativo de cáncer de 15 a 200 veces dependiendo de la edad (Singletary, 2003). Este conjunto de tumores que representa menos del 5% de todos los cánceres de mama no va a ser considerado en este trabajo. Independientemente de los genes BRCA, se sabe que existe una predisposición familiar para el cáncer de mama, pero no han sido identificados los genes que podrían conferirla.

Con respecto a la edad de menarca y menopausia, se observó que cuanto más temprana la edad de menarca, más alto el riesgo de cáncer de mama. El efecto protector de una menarca tardía así como también de una menopausia temprana demuestran que la exposición durante los ciclos menstruales normales a 17- β -estradiol (E_2) y/o progesterona (Pg) aumentan el riesgo de contraer cáncer de mama, probablemente debido a que las hormonas ováricas estimularían directa o

indirectamente la proliferación celular de las células mamarias (Aupperlee et al., 2005a).

La glándula mamaria posee desde el nacimiento una enorme cantidad de células pluripotenciales. Las lactancias completas inducen sucesivos ciclos de diferenciación y con ellos, una disminución de la población de células pluripotenciales, que son las posibles células blanco de carcinógenos. El efecto protector de la lactancia está ausente en las nulíparas, y parcialmente en las mujeres con embarazos tardíos, en las cuales el supuesto carcinógeno ha tenido más tiempo para actuar. Los tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos se relacionan también con el aumento de incidencia de la enfermedad. Todos estos factores inducen un aumento de la proliferación celular e inducirían también un aumento relativo de células madre no diferenciadas (Russo and Russo, 1995). La obesidad durante la post-menopausia y el consumo de dietas ricas en grasas y proteínas aumentan el riesgo de contraer la enfermedad. Esto estaría asociado a los altos niveles de estrógenos circulantes formados a partir de la aromatización de la androstenediona en el tejido adiposo (Frank et al., 1979; Cotran et al., 1999).

En el cáncer de mama se postulan distintos momentos evolutivos o etapas biológicas. A estas etapas, cuya expresión fundamental es un incremento progresivo de la agresividad clínica, se asocian patrones histológicos y biológicos específicos: lesiones preneoplásicas y lesiones invasoras hormono-dependientes y hormono-independientes. Los mecanismos que disparan la progresión a través de las distintas etapas y que culminan con la adquisición de un crecimiento autónomo se desconocen, pero su estudio es de fundamental importancia. El tratamiento a realizarse dependerá del estadio en que se encuentre el tumor en el momento del diagnóstico.

Cáncer de mama y Hormonas

Durante varios años se consideró que los efectos proliferativos de los estrógenos y diferenciadores de la progesterona sobre el útero podían extrapolarse a la glándula mamaria. Sin embargo, numerosas evidencias apuntan a que la Pg además

de participar en la diferenciación lóbulo alveolar de la glándula mamaria, participa en la proliferación de células ductales y aumenta el número de ramificaciones de los conductos mamarios. En los últimos años, surgieron evidencias epidemiológicas que indican que los progestágenos podrían jugar un papel protagónico en el desarrollo del cáncer de mama.

Fueron principalmente dos estudios, “The Women’s Health Initiative Randomized Trial” (WHI) y “The Million Women Study” los que pusieron en jaque los postulados que se venían manejando. En el año 2002, y luego de cinco años de estudio, el WHI suspendió un ensayo clínico que incluía a 16608 mujeres postmenopáusicas. En este ensayo se quisieron comparar los efectos de una terapia combinada de estrógenos con el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) *versus* una terapia placebo. La razón de la suspensión fue el aumento en la incidencia de cáncer de mama en un período menor de 5 años. Se observó un aumento substancial y significativo en el porcentaje de mujeres con mamografías anormales y los tumores se detectaron en un estadio más avanzado que en las mujeres tratadas con el placebo (Chlebowski et al., 2003). Este es el primer ensayo controlado y aleatorio que confirma que la terapia de reemplazo con estrógenos y MPA aumenta el riesgo de incidencia de cáncer de mama invasor (Nelson et al., 2002). Actualmente se considera que la terapia hormonal activa la expansión de las células tumorales de mama previamente iniciadas, particularmente las que son positivas para el receptor de estrógenos (RE+; Dietel et al., 2005). La terapia combinada parece ser más efectiva en la promoción tumoral. Se ha observado que durante ciertas fases del ciclo menstrual, la proliferación de la mama es mayor cuando los niveles tanto de estrógenos como de progesterona se encuentran altos (Key and Pike, 1988) y que la densidad de la mama (medida mediante mamografía) aumenta más rápidamente en mujeres que reciben terapia combinada en comparación con las que reciben sólo estrógeno (Pike, 2005). Si bien reportes recientes indican que se redujo de manera significativa y substancial la incidencia poblacional de cáncer de mama en EEUU, particularmente las formas sensibles a hormonas, entre el año 2003 y el 2004 (Howe et al., 2006); actualmente no hay datos que indiquen que la suspensión masiva de la terapia hormonal podría haber impactado a nivel poblacional en la incidencia de cáncer de mama (Clarke and Glaser, 2007).

Los autores del “The Million Women Study” estudiaron entre 1996 y 2001, a 1.084.110 mujeres de Gran Bretaña entre 50-64 años de edad obteniendo información acerca del uso de la terapia de reemplazo hormonal (HRT) y otros detalles personales, llevándose adelante un seguimiento de la incidencia de cáncer y mortalidad. Los resultados de este trabajo confirmaron que el uso actual y reciente de la HRT aumenta el riesgo de cáncer de mama. Éste aumenta además con el tiempo de uso de la terapia, y es mayor en aquellas personas que fueron tratadas con HRT combinada de estrógenos y progestágenos (Beral, 2003), figura 1.1.

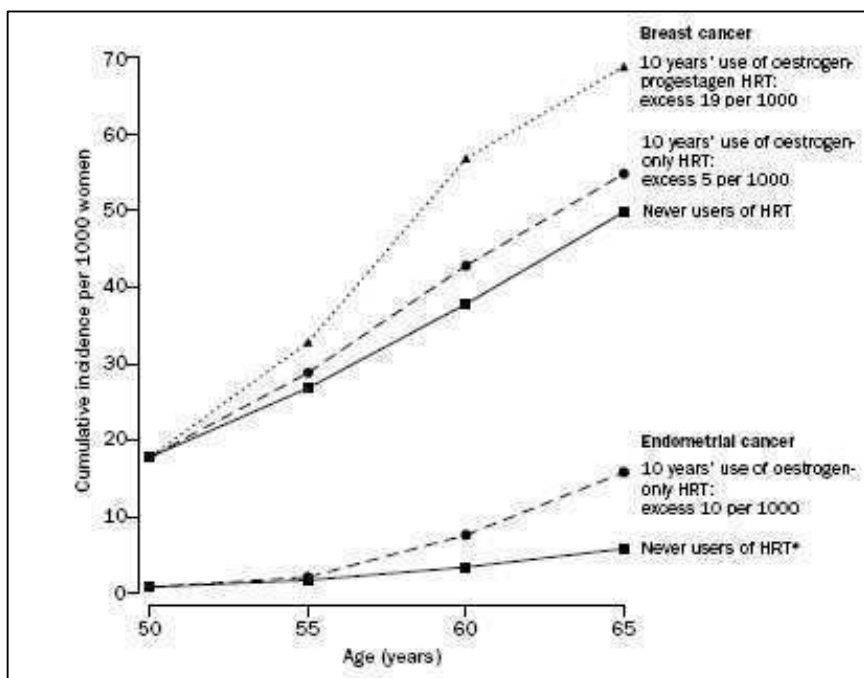


Figura 1.1. Incidencia acumulativa estimada de cáncer de mama y endometrio cada 1000 mujeres en países desarrollados que nunca utilizaron terapia de reemplazo hormonal (HRT) y en aquellas que sí la usaron durante 10 años comenzando a la edad de 50 años. * 10 años de uso de terapia de estrógeno-progestágeno (acetato de medroxiprogesterona, norethisterona, norgestrel /levonorgestrel) resultó en un pequeño cambio en la incidencia acumulativa de cáncer de endometrio (Beral, 2003)

Marcadores predictivos en cáncer de mama

Un marcador predictivo se puede definir como un factor capaz de predecir la sensibilidad o resistencia a un tratamiento específico. Estos marcadores son

importantes en la oncología ya que cada tipo específico de cáncer responde de manera diferente a la terapia. Sin embargo, mientras que sólo una pequeña proporción de pacientes responde a un tratamiento particular, la mayoría es propensa a sufrir efectos adversos (Duffy, 2005a).

La terapia hormonal se ha utilizado desde hace 50 años como tratamiento para el cáncer de mama. Inicialmente se usaban la ovariectomía para pacientes premenopáusicas y las concentraciones farmacológicas de estrógenos (Haddow et al., 1944). Más recientemente estas terapias han sido reemplazadas por el uso de antiestrógenos (como el fulvestrant), moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERMs) como el tamoxifeno, inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozole y letrozole) y agonistas hormonales liberadores de hormona luteinizante (Leuprolida, Goserelina). Si embargo, en la actualidad se encuentra nuevamente en estudio la terapia con altas concentraciones de estrógenos, avalada por los conocimientos actuales sobre la biología del tratamiento con estas hormonas (Jordan, 2008).

Entre los marcadores que se conocen actualmente, el más ampliamente utilizado es el estudio de la presencia de receptores de estrógeno alfa (RE α) y receptores de progesterona (RP); marcadores que, además, se asocian con un beneficio de la terapia endocrina adyuvante (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). Las investigaciones realizadas en los años '70 demostraron que los RE se encontraban presentes en el 50-70% de los cánceres de mama invasivos. En base a un análisis de 400 pacientes el grupo del Dr. McGuire demostró que 50-60% de las mujeres con tumores RE positivos respondían a la terapia endocrina (McGuire, 1975). Posteriormente se demostró que el 70-80% de los tumores que expresaban ambos, RE y RP, luego de ser tratados con terapia hormonal presentaban un período libre de enfermedad mayor (McGuire, 1980). En esa época no se había descrito el RE β cuya función aún hoy en cáncer de mama no es clara (Koehler et al., 2005)

Otro marcador utilizado en la actualidad es HER-2/*neu*, miembro de la subclase 1 de los receptores de la superfamilia de receptores de tirosina quinasa pero que, a diferencia de HER-1 (también denominado receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGF-R), HER-3 y HER-4, no se conoce aún su ligando. HER-2 puede

heterodimerizar con otros receptores de la familia iniciando una vía intracelular por medio de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3 (PI3) o fosfolipasa C (PLC). En líneas celulares de cáncer de mama y modelos tumorales la sobreexpresión del gen HER-2 ha sido asociada con aumentos de la mitosis, transformación maligna, aumento de la motilidad celular, invasión y metástasis (Olayioye et al., 2000). Entre el 20% y el 30 % de los tumores de mama presentan sobreexpresado HER-2, evento que se correlaciona con un pronóstico pobre y disminución de la supervivencia (Demonty et al., 2007). Se desarrollaron varios anticuerpos contra HER-2, uno de ellos 4D5, fue humanizado para la administración a pacientes, llamado en la actualidad trastuzumab (HerceptinTM, Genentech Inc). Este anticuerpo demostró gran afinidad para la unión con la proteína HER-2 generando una inhibición en el crecimiento de células de cáncer de mama que sobre-expresan HER-2; asociada a la inhibición de la progresión del ciclo celular, inhibición de la angiogénesis, e inducción de la respuesta inmune (Albanell and Baselga, 2001). Sin embargo, debido a la potencial toxicidad cardíaca que presenta este compuesto, solo se realizan ensayos con este marcador para seleccionar a los pacientes con enfermedad avanzada para tratamiento con trastuzumab (Joensuu et al., 2006). Otro compuesto desarrollado es el Lapatinib (GW572016), una pequeña molécula inhibidora del dominio tirosina quinasa de HER-1 y HER-2, que se encuentra actualmente en estudio (Moulder et al., 2008).

Marcadores como p53, proteínas involucradas en la apoptosis, transportadores dependientes de ATP y timidilato sintasa, se encuentran en la actualidad bajo investigación para obtener evaluaciones predictivas confiables (Duffy, 2005b).

En los últimos años, con la aparición de microarreglos de ADN (*DNA micro arrays*) se comenzó a desarrollar lo que en la actualidad se conoce como *Mammaprint*, un microarreglo de ADN que determina la expresión de 70 genes involucrados en el cáncer de mama. El ensayo inicial fue realizado con tumores primarios de 117 pacientes jóvenes con cáncer de mama que fueron diagnosticados y tratados en el Instituto de Cáncer de Holanda entre 1983 y 1996 ('t Veer et al., 2002b). El objetivo del estudio fue identificar genes cuya expresión predijese fuertemente un pronóstico pobre, es decir, un intervalo de tiempo corto hasta la aparición de metástasis distantes en aquellas pacientes que presentasen nódulos linfáticos libre de células tumorales al momento del diagnóstico. Los genes

involucrados en un pronóstico pobre son aquellos que regulan el ciclo celular, la invasión, metástasis y angiogénesis. El estudio demostró que el perfil de expresión génica posee valor pronóstico y coincide con otros criterios consenso utilizados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de EEUU (t Veer et al., 2002a). Por lo tanto, el *MammaPrint* es una herramienta poderosa para predecir la respuesta clínica de los pacientes jóvenes y de esta manera, determinar la terapia que deben recibir evitando sobremedicarlos.

II. Receptores hormonales

Receptores de Estrógenos

Los estrógenos ejercen su acción por medio de su unión a los RE, miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción, entre los que se encuentran también los RP, los receptores de andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM).

El RE existe como dos isoformas distintas, cada una localizada en genes separados y en distintos cromosomas (Kuiper et al., 1997). El primero en describirse fue el RE α de rata con un peso molecular de 67 kDa (Koike et al., 1987), pero los efectos de los estrógenos sobre tejidos y células en ratones *knockout* del RE α (alfa ERKO) indicaban que debía existir otro receptor capaz de unírseles. Posteriormente, se clonó el RE β de próstata de rata con un peso molecular de 54 kDa (Kuiper et al., 1996). Se han descrito numerosas variantes de cada tipo de receptor que son productos del corte y procesamiento alternativo de cada uno de los ARNm (citado (LeClercq, 2002). En la Figura 1.2 se muestra una representación de ambos receptores.

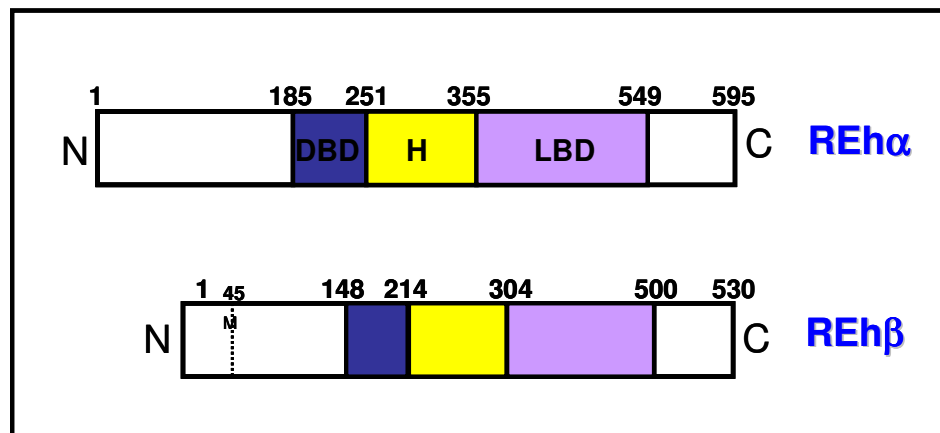


Figura 1.2: Receptores de estrógenos humanos. Se transcriben a partir de dos genes diferentes. El RE β es más corto en su extremo N-terminal que el RE α . DBD: dominio de unión al ADN; H: región bisagra y de la secuencia de localización nuclear; LBD: dominio de unión al ligando. Los números denotan la posición de los aminoácidos para cada isoforma

Los RE comparten un 96% de homología en el DBD y un 59% en el LBD (Figura 1.2). Los dos tipos de RE se expresan ampliamente en varios tejidos. En el humano, el RE β se expresa en tejido nervioso, sistema cardiovascular, sistema inmune, tracto uro-genital, tracto digestivo, riñones y pulmones (Gustafsson, 1999). Los RE α se expresan mayormente en glándula mamaria y útero al igual que los RE β , aunque estos últimos en menor proporción (RE α /RE β : 9/1; (Saji et al., 2000).

La distribución diferencial de ambos receptores correlaciona con respuestas biológicas diferentes. En la glándula mamaria de roedores vírgenes, hay una alta expresión de RE α (Montero et al., 2007) que disminuye ante el tratamiento con MPA o progesterona (Aupperlee et al., 2005b); mientras que durante la fase más proliferativa (inicio de la preñez) hay baja expresión de RE α y alta de RE β (Palmieri et al., 2002). La alta expresión de RE β se mantiene constante y es la forma predominante en la mama normal y en tumores benignos. La situación opuesta RE α >>RE β , parece característica del cáncer de mama aunque este concepto todavía no está bien establecido debido a la escasa información que existe concerniente a RE β (Saji et al., 2000).

Receptores de Progesterona

Los receptores de progesterona (RP) son también miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción. Han sido implicados en una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo el desarrollo de la glándula mamaria, la regulación de la progresión del ciclo celular, el procesamiento de proteínas, el metabolismo y la inducción de otros eventos de señalización (Li and O'Malley, 2003).

Existen dos isoformas del RP llamadas A (RP-A) y B (PR-B) que derivan de promotores alternativos de un gen localizado en el cromosoma 11 q22-q23 humano (Rousseau-Merck et al., 1987). Originalmente clonado en células de cáncer de mama humano, el receptor B contiene 933 aminoácidos y un peso molecular (PM) de 116 KDa, mientras que el receptor A carece de los 164 aminoácidos iniciales teniendo un PM de 94 KDa. Estos receptores se caracterizan por tener una región A/B amino-terminal, una región de unión al ADN formada por dos dedos de zinc (DBD), una región bisagra (región H) participante en la dimerización de la proteína,

y un dominio carboxi-terminal de unión a la hormona (HBR, región E) (Kastner et al., 1990b) (Fig 1.3). En roedores, el PM de RP-B y RP-A es 115 y 83 kDa, respectivamente (Schneider et al., 1991).

Ambas isoformas se expresan en cantidades aproximadamente equimolares en aves y humanos mientras que la isoforma A es la predominante en el ratón (Schneider et al., 1991). En aves, ambas proteínas son sintetizadas por traducción alternativa de un único ARNm (Conneely et al., 1989); en humanos y ratón se generan a partir de dos ARNm distintos que se sintetizan por transcripción alternativa a partir de dos promotores (Kastner et al., 1990a; Shyamala et al., 2000). Al examinar el ADNc del RP humano se encontró otro sitio de iniciación de la traducción río abajo del sitio de iniciación de la traducción de la isoforma A. Esta isoforma sólo abarca el segundo dedo de zinc del DBD, las secuencias de localización nucleares, la secuencia de dimerización y el LBD carboxilo-terminal. Esta tercer isoforma de 56 kDa se denominó RP-C y no se le ha dado una importancia significativa en los últimos años (Wei et al., 1997).

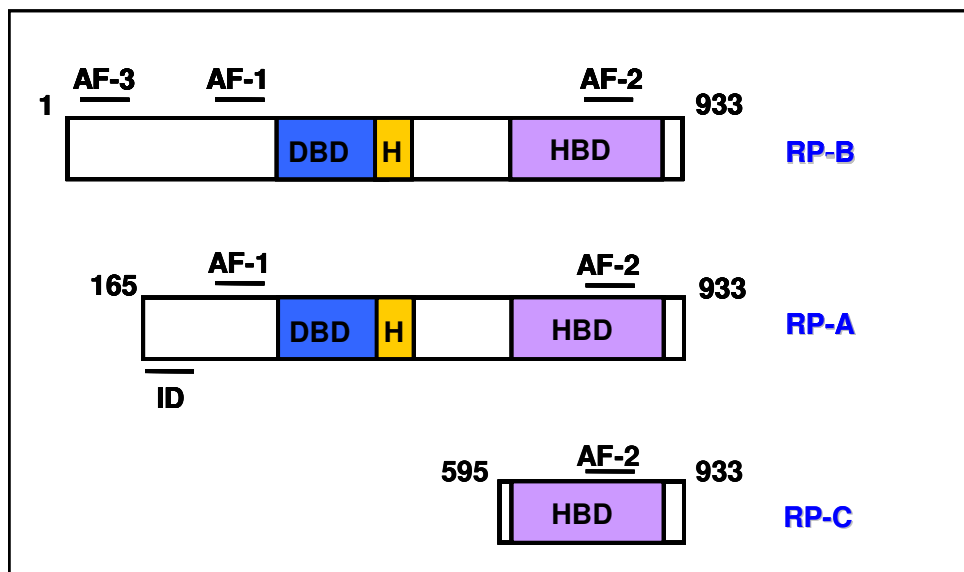


Figura 1.3: Estructura de las variantes de RP. Organización de los dominios de las isoformas RP-A, RP-B y RP-C humano. *h*, región bisagra; *HDB*, dominio de unión la hormona; *ID*, dominio inhibitorio. Los números denotan la posición de los aminoácidos para cada isoforma. AF-1, -2, y -3 son los dominios de activación transcripcional (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007).

Los RP, como la mayoría de los receptores esteroides, son fosfoproteínas. Los RP humanos se fosforilan en, por lo menos, siete residuos de serina que se encuentran en el extremo amino-terminal (Clemm et al., 2000). Tres de los sitios (Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹⁶²) se encuentran en el extremo amino-terminal exclusivo de la isoforma B, mientras que los otros se localizan en la región compartida por la isoforma B y la isoforma A del RP (Ser¹⁹⁰, Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁵ y Ser⁴⁰⁰). Los sitios de fosforilación se identificaron en células T47D de cáncer de mama humano (citado en (Clemm et al., 2000)). El tratamiento de las células con un agonista de la progesterona estimula la fosforilación de los RP por lo menos por dos mecanismos. Cuatro de los sitios se encuentran basalmente fosforilados (Ser⁸¹, Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰ y Ser⁴⁰⁰) y con el tratamiento la fosforilación aumenta aproximadamente 2 veces. Los otros sitios se fosforilan en respuesta a la hormona (Ser¹⁰², Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁵) y luego de 1 a 2 horas de tratamiento la fosforilación es máxima. Se postula que los dos grupos de sitios de fosforilación son blanco de distintas vías de señalización debido a la diferente cinética de respuesta hormonal y podrían servir para distintos roles funcionales y/o estructurales. El rol funcional de la fosforilación de los RP aún no se conoce. Estos resultados sobre los RP humanos junto con los otros receptores esteroides sugieren que la fosforilación amplificaría o atenuaría la actividad transcripcional (Clemm et al., 2000). Por ejemplo, la fosforilación de la Ser294 mediaría aparentemente un aumento de la traslocación núcleo-citoplasmática del receptor (Qiu et al., 2003). En la figura 1.4 se detallan los sitios de fosforilación de RP.

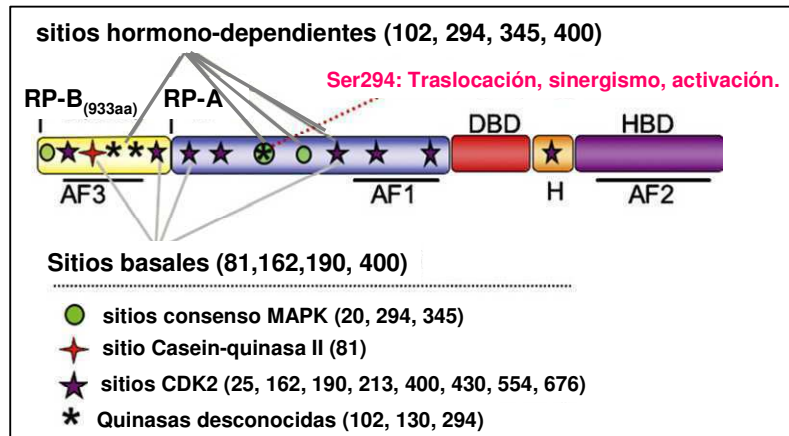


Figura 1.4: Fosforilación de los RP humanos. En la figura se muestran trece residuos de serina y uno de treonina representando la fosforilación basal (constitutiva) y la inducida por hormonas, que podrían contribuir a la capacidad de los RP como reguladores de MAPK, casein-quinasa II y proteína quinasa 2 dependiente de ciclinas (CDK-2); tomado de (Lange, 2008).

La unión de la progesterona a su receptor produce la liberación de los complejos de proteínas de golpe de calor (HSP) como hsp 90 (proteína de 90 kDa) y hsp 70 (proteína de 70 kDa) a las que se encontraba unida, y un aumento de su fosforilación (Wen et al., 1994).

Una vez liberado el complejo de HSP se produce la dimerización del receptor en homo o heterodímeros y la unión del mismo a una secuencia consenso en el ADN. Esta secuencia se denomina elemento respondedor a hormonas (HRE) en este caso respondedor a Pg (PRE), y es una secuencia invertida separada por tres nucleótidos: AGAACAnnnTGTTCT. Los RG, RA y RM comparten esta secuencia, mientras que los RE se unen a la secuencia AGGTCAnnnTGACCT. El homo u hetero-dímero interactúa luego con factores de transcripción basales, otras proteínas de unión al ADN y coactivadores de manera que aumenta o disminuye la transcripción del gen en cuestión.

En general, RP-B es un activador transcripcional más fuerte que RP-A, mientras que RP-A puede funcionar como un represor ligando-dependiente de otros receptores de hormonas esteroides, incluyendo RP-B y RE (Vegeto et al., 1993).

El RP es además capaz de interactuar con factores de transcripción en sitios consenso de promotores que carecen de PRE. Un ejemplo de esta situación es la interacción entre RP y Sp1 en sitios consenso para Sp1. En esta interacción se

encuentra además implicada la proteína de unión a CREB (CBP/p300) y el resultado de la misma es el aumento de la transcripción del inhibidor de quinasas ciclina-dependiente p21 (Owen et al., 1998). La interacción entre RP y Sp1 se encuentra regulada por la fosforilación de la Ser345 de RP, producida por una vía rápida de señalización inducida por el mismo RP (Faivre et al., 2008).

La figura 1.5 representa un breve resumen de la activación de RP.

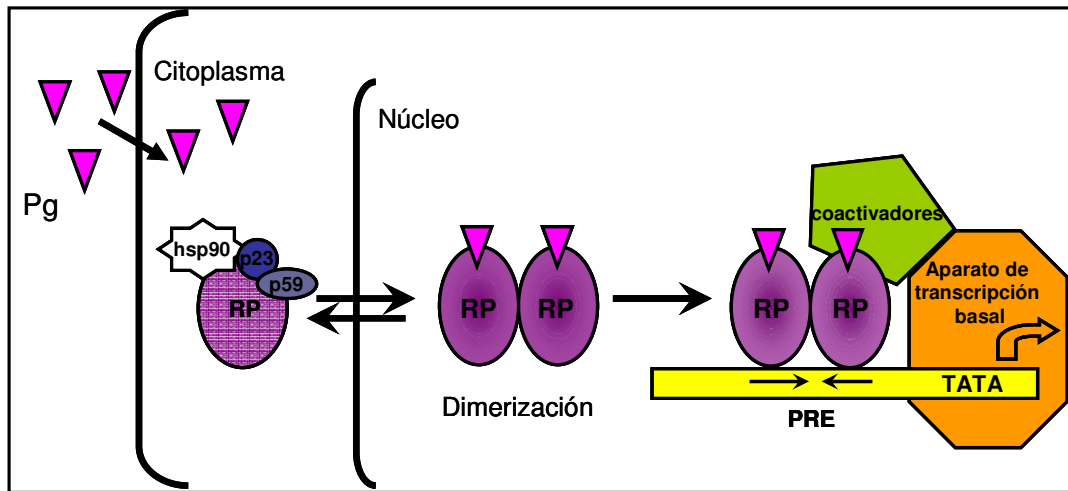


Figura 1.5: Activación de RP por unión a la Pg. La unión de la Pg al complejo inactivo del receptor induce un cambio conformacional que lleva a la disociación de hsp90, p23 y p59, dimerización, unión al ADN y reclutamiento de coactivadores que faciliten la comunicación con el aparato basal de transcripción. PRE, elemento respondedor a progesterona. Modificado de (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007).

III. Mecanismos no genómicos. Localización extra nuclear de receptores esteroides.

Tradicionalmente se consideró que los receptores hormonales se encontraban en el citoplasma y al unirse a su ligando, atravesaban la membrana plasmática, dimerizaban y se traslocaban al núcleo donde actuaban como factores de transcripción. Luego se los consideró nucleares estuviesen unidos o no a la hormona. En la actualidad, existen cada vez más reportes acerca de la presencia de receptores esteroides localizados en sitios no tradicionales.

Se ha reportado que todos los receptores esteroides inducen efectos que parecen no necesitar de la actividad transcripcional de los receptores clásicos, como la activación de la adenilato ciclasa, de la tirosin-quinasa Src (Src), de las MAPKs, y la PI3 kinasa (PI3K); la producción de segundos mensajeros, y el incremento de las concentraciones de calcio intracelular (Baulieu, 1978; Benten et al., 1997; Pietras and Szego, 1977). Dado que estos efectos ocurren en unos pocos minutos, demasiado rápido como para ser mediados por la síntesis de ARN o nuevas proteínas, han sido denominados efectos no genómicos (Falkenstein et al., 2000a).

Como criterio general de clasificación de estos efectos se ha sugerido que deben ocurrir en pocos minutos, no deben verse afectados por inhibidores de la síntesis de ARN o proteínas, y deben ocurrir a concentraciones fisiológicas de esteroides, dado que las altas concentraciones pueden generar efectos no-específicos en la perturbación de la membrana celular (Falkenstein et al., 2000a).

Sin embargo, como algunas de las quinasas y vías de señalización pueden finalmente activar otros factores de transcripción nucleares, en el año 2002 el *Working Group at FASEB Summer Conference on Rapid Steroid Signalling* ha sugerido denominar a estos efectos como señalización iniciada por esteroides en membrana o MISS, contrario a los iniciados en el núcleo o NISS (Nemere et al., 2003). Sin embargo en este trabajo hemos decidido mantener la nomenclatura de no genómico porque es la que se encuentra mayoritariamente en los trabajos publicados a la fecha.

A continuación se detallan algunos de los MISS generados por esteroides sexuales y la posible localización de estos receptores (Figura 1.7). Los esteroides

sexuales activan a los receptores de hormonas esteroideas (SR) induciendo cambios conformacionales, traslocación al núcleo, dimerización, y unión a elementos de respuesta a esteroideas (SREs) en promotores o *enhancers* de genes blanco. De manera alternativa, los receptores localizados en el citoplasma o en la membrana pueden asociarse de forma momentánea con otras moléculas de señalización incluyendo receptores acoplados a proteínas G (GPCR), la tirosina quinasa citosólica Src (c-Src), proteínas que contienen el dominio SH2 (*SH2-containing domain*, Shc), proteínas adaptadores (adapters) o *membrane targeting proteins* produciendo la activación de cascadas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), o fosfotidilinositol 3-quinasa (PI3K)/proteín-quinasa B (PKB/Akt). Los receptores nóveles de membrana, indicados en la figura como mSR, no relacionados con los nucleares, han sido reportados como mediadores de respuestas rápidas por medio de la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), y la activación de MAPK.

Una consecuencia biológica de la activación de cascadas de señalización generada por los esteroideas sexuales es finalmente influir sobre la transcripción génica mediante tres posibles mecanismos: (1) un circuito regulatorio de retroalimentación positiva, donde la actividad transcripcional nuclear de SR o de los coactivadores sea aumentada por fosforilación; (2) las vías de señalización que convergen y activan a genes blanco requiriendo de otros factores de transcripción (TF) cooperen con los SR ya sea mediante *teathering* o mediante la unión de promotores SER y (3) la activación de otros factores de transcripción independientes de la unión directa de SR con el ADN (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007). Estos mecanismos se encuentran resumidos en la figura 1.6.

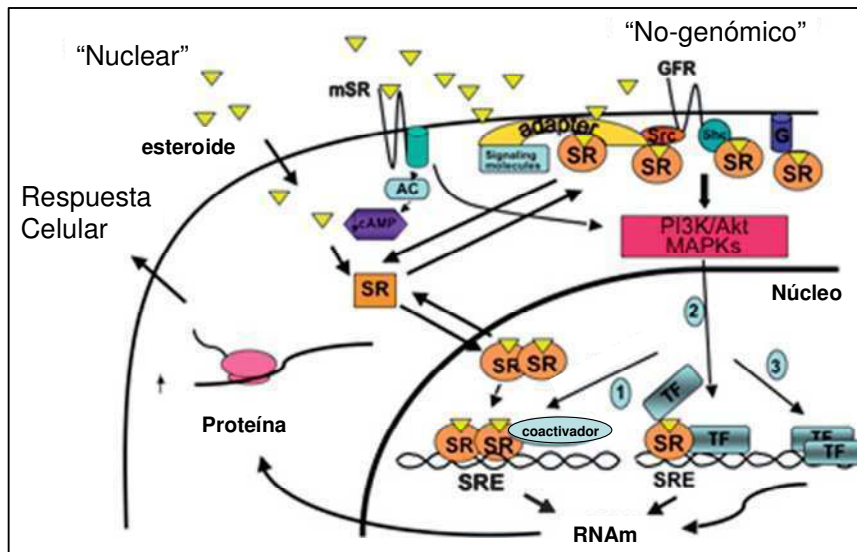


Figura 1.6: Vías de señalización clásicas y no genómicas activadas por hormonas esteroides. (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007)

Señalización iniciada por receptores de glucocorticoides

Más allá de los efectos genómicos conocidos generados por la unión de los glucocorticoides (Gc) a sus receptores (RG), se ha observado que los Gc son capaces de regular diferentes vías de señalización. En el anfibio *Taricha granulosa* se han detectado efectos rápidos a nivel fisiológico y comportamental inducidos por Gc (Rose and Moore, 1999); en células Ishikawa de adenocarcinoma endometrial humano se ha observado un aumento en la polimerización de actina luego de tratar las células durante quince minutos con dexametasona $0.1\mu\text{M}$ (Koukouritaki et al., 1997).

Otro de los efectos observados es la inhibición de la vía de señalización de MAPK p44/42 (ERK 1/2), producida por la inducción de la MAPK fosfatasa 1 (MKP-1) en mastocitos y osteoblastos humanos. La inhibición parece ser específica del tipo celular ya que no se produce en células de músculo liso de vías aéreas humanas, ni en macrófagos murinos (Kassel et al., 2001; Engelbrecht et al., 2003; Fernandes et al., 1999; Swantek et al., 1997a). Así mismo, los Gc son también capaces de inhibir la actividad de la quinasa NH2 terminal de c-Jun (*c-Jun NH2 terminal Kinase*, o

stress activated protein kinase, JNK/SAPK) en varios tipos celulares (Lasa et al., 2001; Swantek et al., 1997b).

El grupo del Dr. Liao y col. ha observado que la dexametasona en tratamientos de 10 minutos activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en células endoteliales humanas. La activación temprana de eNOS inducida por Gc, así como la producción de óxido nítrico son abolidas por el tratamiento con el antiprogéstágeno RU-486 1 μ M, pero son resistentes al tratamiento con actinomicina D, indicando una acción RG-dependiente (Hafezi-Moghadam et al., 2002).

Actualmente se conocen 2 receptores alternativos de Gc. Uno de ellos fue identificado en linfomas como una forma modificada del RG clásico, postulando que podría funcionar como un RG unido a membrana (mGR) (Gametchu, 1987). Si bien presenta diferente localización, peso molecular y especificidad en la unión de Gc (Powell et al., 1999), es reconocido por anticuerpos desarrollados contra el receptor clásico de Gc, presenta una capacidad similar para unir HSP o ADN, y también presenta patrones de fosforilación similares (Loscalzo, 1995). El otro receptor es una glicoproteína ácida de 63 kDa (Evans et al., 2000) identificada en membranas plasmáticas neuronales del anfibio *Taricha granulosa*, caracterizado como un receptor funcional de glucocorticoides. Posee características farmacológicas completamente diferentes a las del receptor clásico; y no presenta una unión de alta afinidad por las hormonas que clásicamente se unen al RG, como aldosterona y dexametasona, sino por corticosterona (Orchinik et al., 1991). Los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* sugieren que este receptor cumpliría un rol crucial en mediar algunos de los efectos no genómicos neurofisiológicos y comportamentales generados por los glucocorticoides (Falkenstein et al., 2000b).

Señalización iniciada por receptores de mineralocorticoides

El receptor de mineralocorticoides (RM) presenta la misma alta afinidad por la aldosterona, la corticosterona y el cortisol, con niveles circulantes de glucocorticoides fisiológicos aproximadamente 1000 veces más altos que la aldosterona, y niveles en plasma libres 100 veces mayores. Esto lleva a preguntarse ¿cómo puede la aldosterona activar selectivamente el RM? En los tejidos blanco de

aldosterona como el riñón y las células musculares del sistema vascular, la coexpresión de la enzima 11 β -hidroxisteroide dehidrogenasa tipo 2 (11 β HSD2), que convierte el cortisol intracelular a cortisona (o en la rata corticosterona a 11-dehidrocorticosterona), protege a los RM de la ocupación con glucocorticoides (Mihailidou, 2006).

En la descripción clásica, la aldosterona se une al RM citosólico, trasloca al núcleo y actúa como factor de transcripción. Sin embargo, es capaz también de interactuar con sistemas de señalización peptídicos (Krug et al., 2002). Los efectos no genómicos de la aldosterona incluyen la activación de vías de segundos mensajeros incluyendo los cambios en la concentración intracelular de calcio e inositol fosfato (IP₃), la estimulación de la actividad de la proteína quinasa C (PKC), ERK 1/2, c-Jun NH₂ 1/2 (JNK) y AMPc en varios tejidos. El equipo del Dr. Silbernagl y col. demostraron en estudios recientes que la aldosterona a concentraciones nanomolares induce una fosforilación rápida y dosis dependiente de ERK 1/2 (en 5 min) y JNK en una variedad de células humanas transfectadas. La activación de ERK 1/2 fue inhibida por el antagonista espironolactona, apoyando la idea de que ciertos efectos no-genómicos son mediados por los receptores intracelulares clásicos (Grossmann et al., 2005).

Un importante “sistema” de señalización cuando de aldosterona se trata, es el que involucra al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y a su receptor (EGF-RM; (Krug et al., 2002; Gekle et al., 2002). Los estudios farmacológicos *in vivo* mostraron que los mineralocorticoides aumentan la contracción arterial inducida por EGF (Florian et al., 2001) y que el antagonista de RM, espironolactona, reduce la expresión del ARNm de EGF, luego de una isquemia cerebral (Dorrance et al., 2001).

Por otra parte, el Dr. Luft y col (Mazak et al., 2004) mostraron que tanto la angiotensina II (ANG-II) como la aldosterona inducen la activación de ERK1/2 en células de músculo liso vascular y que la misma depende de EGF-R.

La aldosterona ha demostrado ser capaz de estimular la expresión de EGF-R en diferentes tipos de cultivo celular, riñones, corazón, y en los niveles de su ARNm en aorta (Dorrance et al., 2001; Florian et al., 2001; Krug et al., 2003; Northcott et al., 2001; Nakano et al., 2005). En estudios realizados en aorta de rata y en células HEK se observó que la aldosterona modula la expresión de EGF-R mediante una

interacción entre el RM unido al ligando y las regiones 316-163 y 163-1pb del promotor de EGF-R. Este resultado es RM específico ya que la dexametasona/RG no induce un efecto estimulador en este sistema (Grossmann et al., 2007).

Los estudios realizados por el Dr. Theisen y col. proponen que las acciones rápidas no-genómicas de los mineralocorticoides son mediadas por un receptor de alta afinidad localizado en la membrana plasmática, diferente del RM intracelular, dado que no son bloqueados por espironolactona ni mimetizados por cortisol (Wehling et al., 1991).

La aldosterona es también capaz de producir efectos agudos, como el observado en el flujo intracelular de calcio en células de músculo liso vascular (Alzamora et al., 2000) y cardiomiocitos (Mihailidou et al., 2000; Mihailidou et al., 2004). Este efecto es mediado por el RM clásico, sin embargo no se descarta la existencia de otro tipo de receptor, ya que en células de piel de ratones RM-/- se reportaron cambios en el influjo de calcio producidos por aldosterona (Haseroth et al., 1999).

Aunque se han identificado receptores de membrana para otras hormonas esteroides (Zhu et al., 2003b; Thomas et al., 2005), los intentos de aislar y caracterizar un receptor de membrana para aldosterona han sido fallidos.

Señalización iniciada por receptores de andrógenos

Uno de los primeros trabajos acerca de la acción rápida de la testosterona realizado por el grupo del Dr. Yamada y col. en 1979, demostró un aumento en los disparos de las neuronas hipotálamicas a minutos de la aplicación de testosterona en ratas macho adultas (Yamada, 1979). Los trabajos realizados por el grupo del Dr. Morris y col. demostraron también que en adenohipófisis de ratas macho adultas la testosterona inicia una rápida liberación de prolactina a los 5 minutos (Christian et al., 2000). La testosterona dispara respuestas del tipo no-genómicas en varios tejidos. A continuación se presenta un breve resumen de las mismas.

En células de Sertoli de rata la aplicación de testosterona en concentraciones fisiológicas medidas en el fluido de los túbulos seminíferos (175-365 nM) (Comhaire and Vermeulen, 1976; Turner et al., 1984) produce un aumento rápido y prolongado en el Ca^{2+} intracelular (Gorczyńska and Handelsman, 1995; Lyng et al., 2000). El tratamiento con testosterona conjugada a albúmina sérica bovina (BSA) mimetiza la

acción de la testosterona libre indicando una acción de esta hormona del tipo de las iniciadas en membrana. Recientemente, se obtuvieron evidencias que indican que los efectos no clásicos de la testosterona regulan numerosos factores de transcripción, incluyendo a CREB (*cAMP response element binding protein*) mediante vías de señalización de MAPK independientes a la unión del RA al ADN (Fix et al., 2004). La activación de vías de señalización de MAPK se da mediante receptores nucleares clásicos localizados en la membrana plasmática asociados con la tirosina-quinasa Src y activándola luego de la estimulación hormonal, que lleva a la activación de MAPK a través de EGF-R (Cheng et al., 2007). El RA posee en su secuencia una región rica en prolina que le permite asociarse al dominio SH3 de la proteína Src. En células humanas de próstata y líneas celulares derivadas de cáncer de mama, el tratamiento con andrógenos o estrógenos induce una asociación entre Src, RA y RE, llevando a la activación y estimulación de la síntesis de ADN (Migliaccio et al., 2000b).

La señalización no clásica por testosterona ha sido ampliamente estudiada en células de cáncer de próstata humana (LNCaP). El tratamiento de éstas con testosterona o testosterona-BSA durante 10 min produce un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular durante 1 min (Lyng et al., 2000; Steinsapir et al., 1991), reorganización del citoesqueleto de actina y secreción de PSA (Kampa et al., 2002). Otros estudios muestran que el tratamiento de estas células con andrógenos produce un efecto antiapoptótico por medio de una rápida formación de un complejo de señalización citosólico que contiene al RA, RE y a Src. Este es el complejo que luego activa ERK 1/2 y la vía de CREB (Migliaccio et al., 2000a).

En ovocitos de ratón, donde se detectaron RA, la adición de testosterona produce un arresto de la meiosis disparada *in vitro* y la activación de MAPK, activadoras del ciclo celular, independiente de la transcripción. Los efectos iniciados no fueron bloqueados por el antagonista finasteride (White et al., 2005; Gill et al., 2004).

En cuanto al sistema inmune, en macrófagos de tejido no se detectó el RA, sin embargo la testosterona produce una movilización intracelular de calcio a través de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) y señalización por proteína lipasa C (PLC) (Liu et al., 2005; Benten et al., 1997). Esto indica que no puede considerarse a la vía genómica como generadora del efecto mencionado.

En cardiomiocitos neonatales y adultos aislados, la testosterona (10-100 nM) incrementa los niveles de calcio intracelular de manera persistente. Este aumento es inhibido por toxina de Pertuis, U73122 (inhibidor de PLC) y un inhibidor del receptor de inositol trifosfato, sugiriendo la participación de una vía de señalización iniciada por un GPCR (Michels et al., 2006).

Por último, en células de músculo esquelético la testosterona tiene los mismos efectos sobre el calcio intracelular que en los cardiomiocitos. En este caso se demostró que la hormona actúa mediante la vía de MEK y Ras para inducir la fosforilación de ERK 1/2 independiente del RA intracelular (Estrada et al., 2003).

Actualmente hay descritos tres posibles receptores para andrógenos a través los cuales podrían ocurrir múltiples efectos no clásicos (Heinlein and Chang, 2002; Kampa and Castanas, 2006). Una manera de desencadenar estos efectos sería que la testosterona unida a la globulina que une hormonas sexuales, SHBG (sex hormona binding globulin), sea capaz de actuar vía el receptor de SHBG en la línea celular LNCaP (Nakhla et al., 1990; Nakhla et al., 1999). Hasta la fecha ese receptor no ha sido clonado pero se considera que sería un GPCR o algún receptor ligado funcionalmente a este tipo de receptores.

Otra forma sería que la testosterona pueda unirse a un RA clásico asociado a la membrana o bien a un RA no clásico que posea esa misma localización. Aunque varios grupos han reportado una unión específica de testosterona en membrana plasmática en diferentes tipos celulares (Christian et al., 2000; Kampa et al., 2002; Benten et al., 1999b; Hall et al., 2006), no se ha podido purificar aún una proteína de membrana específica mediante la cuál la testosterona ejerza su efecto. Sin embargo utilizando técnicas de fraccionamiento e inmunohistoquímica se pudo observar la asociación del RA clásico a membrana en células T (Benten et al., 1999a), ovocitos de *Xenopus* (Lutz et al., 2001) y células de Sertoli (Cheng et al., 2007).

El RA no posee una estructura transmembrana ni es hidrofóbico, lo que indicaría que estaría interactuando con proteínas que lo acerquen a la membrana o lo anclen a ella. Tanto los RE α y β , como RP y RA poseen un motivo de nueve aminoácidos que conforman una secuencia de palmitoilación, es decir, de agregado de ácido palmítico a residuos de cisteína con formación de enlaces tioéster. Esta

modificación les permitiría la unión a proteínas como caveolina-1 (Lu et al., 2001) desencadenando así los efectos observados.

Señalización iniciada por receptores de estrógenos

Los primeros efectos rápidos inducidos por los estrógenos (E) fueron reportados por la Dra. Szego y el Dr. Davis en 1967. Los autores observaron que la administración de 17- β -estradiol (E₂) en ratas ovariectomizadas inducía un aumento en los niveles de AMPc en el útero (Szego and Davis, 1967). Más tarde, el Dr. Pietras y la Dra. Szego describieron sitios específicos de unión a estrógenos en la membrana celular (Pietras and Szego, 1977).

En la actualidad se han descrito múltiples acciones extra nucleares generadas por E. Estos efectos han sido observados en varios tejidos y líneas celulares. A continuación se presenta un breve resumen de los efectos no clásicos inducidos por los E y los posibles receptores implicados en los mismos.

En células de cáncer de mama, la señalización por RE lleva a la desregulación de la fosfatasa 1 de MAPK, produciendo una activación de ERK 1/2 (Razandi et al., 2004). Esta señalización ha sido involucrada también en la modulación de la migración tanto de células de cáncer de mama MCF-7 (Acconcia et al., 2006) como de monocitos (Yada-Hashimoto et al., 2006).

En hueso, la supervivencia y diferenciación de los osteoblastos depende de la activación por E de varios sistemas de quinasas, incluyendo Src, ERK y PI3K (Kousteni et al., 2002; Kousteni et al., 2007).

A nivel de sistema nervioso central los E limitan el daño neuronal y la muerte, posiblemente por una señalización mediante PI3K, PKC, ERK o glicógeno sintasa quinasa 3-beta (Wilson et al., 2002; Jung et al., 2003; Goodenough et al., 2005; Yu et al., 2004a). Los modelos utilizados incluyen injuria cerebral por accidente cerebrovascular (Wilson et al., 2002; Yu et al., 2004b), por administración de glutamato (Goodenough et al., 2005) o por un compuesto químico utilizado en el modelo de mal de Parkinson de roedores llamado MPTP (D'Astous et al., 2006).

La señalización rápida por E en el sistema cardiovascular modula la migración y proliferación de células endoteliales y vasculatura del músculo liso (Simoncini et al., 2006; Geraldès et al., 2003). Ambas isoformas del RE han sido implicadas en la

señalización rápida que lleva a la producción de óxido nítrico (NO) *in vivo*, resultando en una rápida dilatación arterial (Guo et al., 2005).

En cuanto a los receptores capaces de producir estos efectos, desde un principio se sugirió que los receptores capaces de unir E₂ localizados en membrana debían compartir epítopes con los receptores clásicos, ya que eran detectados por técnicas de identificación inmunológicas (Pappas et al., 1995; Norfleet et al., 1999). La expresión de ambas isoformas de RE clásico en células nulas para estos receptores resultó en una localización tanto nuclear como de membrana (Razandi et al., 1999). Finalmente los RE aislados de membrana de células de cáncer de mama resultaron idénticos a los nucleares, estudiados por espectrometría de masa; y se observó que aproximadamente entre un 5-10% de los RE α endógenos se encontraban presentes en la membrana (Pedram et al., 2006a).

La mayoría de los trabajos relacionados con RE en membrana identifican una proteína de 66 KDa como la forma predominante sino exclusiva del receptor en este compartimento (Chambliss et al., 2002; Stabile et al., 2002). Sin embargo, tanto en MCF-7 como en células endoteliales inmortalizadas se ha observado abundantemente una forma del RE α de 46 KDa que no posee el extremo amino-terminal, de la cuál no se conoce aún su importancia (Marquez et al., 2006; Russell et al., 2000). En células vasculares endoteliales o de aorta de roedores, la forma predominante es la de 66 KDa y se encuentra localizada tanto en zonas de caveolas como libres de caveolas, estimulando una señalización rápida por activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la producción de óxido nítrico (Wyckoff et al., 2001). Las caveolas son dominios ordenados de lípidos especializados que contienen numerosas moléculas de señalización incluyendo proteínas quinasas, MAPK ERK1 y ERK2, receptores acoplados a proteínas G, EGF-R, IGF-1, Src, Ras y receptores huérfanos (Razandi et al., 2003b; Sukocheva et al., 2006; Song et al., 2004).

Se ha aislado además otro receptor de membrana de 36 KDa tanto en líneas celulares de cáncer de mama RE positivas como en muestras de tumores humanos generados a partir de una variante de corte y empalme alternativo de RE α (Wang et al., 2006).

En lo que respecta al RE β , éste ha sido mucho menos caracterizado, pero se conocen receptores endógenos localizados en membrana con un peso molecular cercano a los 60 KDa (Pedram et al., 2005). Existe también un RE β funcional de 54 KDa en la membrana de células endoteliales (Chambliss et al., 2002).

La abundancia de las dos isoformas de RE en la membrana celular difiere entre los tipos celulares. Mientras que en células endoteliales y cardiomiocitos están presentes ambos receptores, las células de cáncer de mama expresan mucho más RE α en membrana que RE β (Marquez et al., 2006). Los RE α y RE β se localizan en caveolas en la membrana plasmática de varios tipos celulares (Kim et al., 1999; Razandi et al., 2002; Chambliss et al., 2005; Marquez et al., 2006).

En lo que respecta a la estructura del RE α , la serina 522 del dominio E es un residuo esencial para la traslocación del receptor a membrana, ya que le permite al receptor interactuar con caveolina-1, proteína fundamental de las caveolas, facilitando así el transporte del receptor a membrana (Razandi et al., 2003a). Otro residuo importante para la localización del receptor en la membrana presente también en el dominio E es la cisteína 447 determinada como sitio de palmitoilación necesaria para la interacción física entre RE y caveolina-1 (Acconcia et al., 2004).

En el año 2006, el grupo del Dr. Levin y col., reportaron que del total de RE presentes en células MCF-7, aproximadamente el 85% se encontraba en el núcleo, el 5% en la membrana plasmática y el 10% en mitocondria. Llamativamente, el pequeño porcentaje de RE β (comparado con RE α) se encontraba concentrado en mitocondria. En este trabajo se observó que el rol que cumple el RE en la mitocondria es el de prevenir, mediante la unión al E₂, la liberación de citocromo-c inducida por radiación UV, participando ambos receptores en este proceso (Pedram et al., 2006b).

Existe otro receptor putativo para estrógenos denominado GPR30, receptor huérfano acoplado a proteína G (Pedram et al., 2005; Revankar et al., 2005). Esta proteína es capaz de responder a estrógenos con uniones del tipo de alta afinidad y baja capacidad, tanto en membrana plasmática como en retículo endoplasmático (Thomas et al., 2005). En células de cáncer de mama negativas para RE han sido reportados varios efectos generados por la unión de E₂ a GPR30, como la estimulación de proteínas quinasas, la señalización por calcio, y la transactivación

de EGF-R. Sin embargo no se ha podido demostrar que este receptor medie la activación de una proteína G en respuesta a E_2 , evento que sí ha sido observado para $RE\alpha$ (Razandi et al., 1999; Wyckoff et al., 2001). Algunos grupos han postulado que existe una colaboración entre GPR30 y $RE\alpha$ (Vivacqua et al., 2006; Kanda and Watanabe, 2004; Albanito et al., 2007; Vivacqua et al., 2006) y que el GPR30 no actuaría solo en células que no presentasen RE clásico.

Señalización iniciada por receptores de progesterona

Los primeros efectos no clásicos de la Pg fueron reportados en el año 1941 cuando Selye y col. observaron que la administración de esta hormona a altas dosis en ratas poseía capacidad anestésica (Selye, 1941).

Al igual que los E, en los últimos años se han descrito diferentes efectos de la Pg más allá de los conocidos como genómicos. Sin embargo, su estudio ha avanzado más lentamente que el de los E. El siguiente es un resumen que denota la variedad de tejidos sobre los cuales esta hormona ejerce su efecto y las vías en la cuales se encuentra involucrada.

Uno de los modelos más antiguos de señalización no genómica inducida por esteroides es la maduración de ovocitos de *Xenopus* por Pg. El agregado *in vitro* de Pg a ovocitos de *Xenopus* promueve la progresión meiótica de los mismos. A lo largo de los años '60 se reunió suficiente información como para demostrar que este fenómeno es independiente de la transcripción (Bayaa et al., 2000; Tian et al., 2000).

En cáncer de mama, el RP-B puede mediar la activación de Src inducida por Pg y la señalización río abajo de MAPK. Este tipo de efectos podrían estar asociados a la resistencia a la terapia endócrina que desarrollan algunos tumores de mama que mantienen la expresión de sus receptores hormonales (Schiff et al., 2005).

El grupo del Dr. Auricchio y col. observó un *crosstalk* no ortodoxo de receptores hormonales en células T47D. En este caso, la Pg estimula la vía de señalización c-Src/p21^{ras}/MAPK cuando la hormona se une al RP-B, que se encuentra preasociado con el $RE\alpha$. La ocupación del receptor con Pg induce la asociación del $RE\alpha$ a c-Src, una proteína de la familia de tirosin-quinazas, y activa la vía (Migliaccio et al., 1998). Una asociación similar fue reportada para células estromales de útero de

rata, donde la activación de vías no-genómicas por Pg se da mediante un *crossstalk* entre RP y REβ, que lleva a la proliferación de estas células (Vallejo et al., 2005).

Otra manera en la cual se produce la activación de estas vías es mediante una unión directa entre un dominio rico en prolinas de la región amino-terminal de RP-B y el dominio SH3 de c-Src (Boonyaratanakornkit et al., 2001). Esta interacción sería la que mediaría la activación de la vía de Src/ras/MAPK y no con RE como previamente había descrito el equipo del Dr. Migliaccio y col (Boonyaratanakornkit et al., 2001). La figura 1.7 es un esquema extraído de este trabajo que muestra el mecanismo de activación de Src (A) y el modelo de función dual de RP (B).

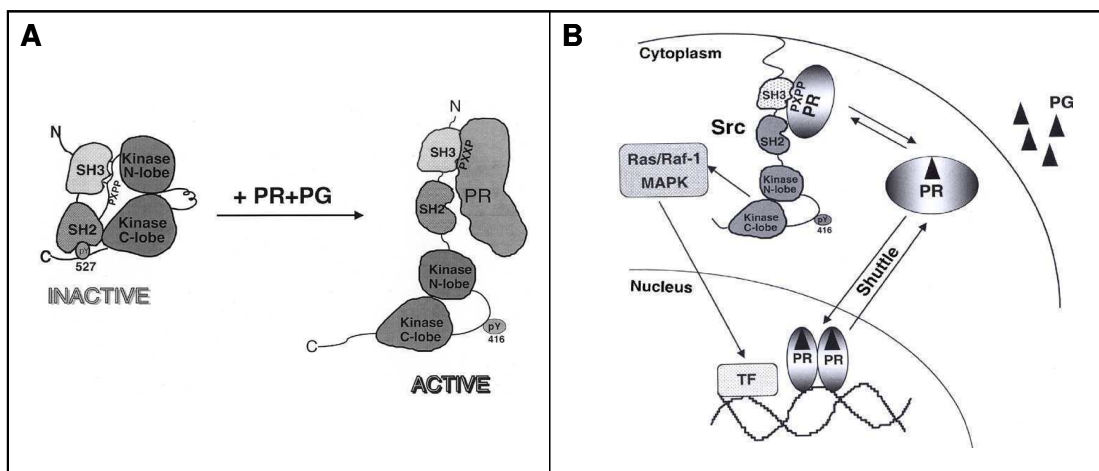


Fig. 1.7:A. Mecanismo propuesto para la activación de quinasas Src por RP. El motivo PXXP del dominio N-terminal de RP interactúa con el dominio SH3 de Src y la convierte de una forma inactiva “conformación cerrada” a una “conformación abierta” forma activa por desplazamiento de SH3. B. Modelo para RP como proteína dual ya que funciona en citoplasma como activador de Src y en el núcleo como factor de transcripción (Leonhardt et al., 2003).

La activación rápida de Src mediada por RP-B lleva a la transactivación de EGF-R, resultando en una señalización sostenida de MAPK que parecería ser crítica para promover, por ejemplo, la transcripción de ciclina D1 (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007). La situación respecto a la regulación de ciclina D1 es confusa. Dado que el promotor de ciclina D1 no posee un elemento respondedor a Pg, el aumento observado se debería a que la misma actúa aumentando los niveles de otros factores de transcripción (como la unión a sitios Sp1) que finalmente llevan a la progresión del ciclo celular y la proliferación (Favre and Lange, 2007; (Carnevale et

al., 2007). Sin embargo el trabajo publicado recientemente por el grupo del Dr. Edwards presenta una situación diferente a la antedicha. En ese trabajo se observó que la regulación de la transcripción de la ciclina D1 se realiza fuera del núcleo, inducida por la activación generada por RP de vías de señalización como Src/MAPK o PI3K/Akt (Boonyaratanakornkit et al., 2008). Ante estos resultados contradictorios, no queda claro si la regulación de ciclina D1 se produce a nivel nuclear o citoplasmático.

En una colaboración realizada en el año 2007 por los equipos del Dr. Edwards y el Dr. Sutherland, se reportó que los progestágenos son capaces de reiniciar la progresión del ciclo celular de células MCF-7 arrestadas con un antiestrógeno, pero que este efecto no se debe a una interacción con el dominio SH3 de Src ya que se mantiene en presencia de Src mutado, sino que se produce mediante la actividad transcripcional de RP-B (McGowan et al., 2007).

Aunque RP-A y RP-B poseen idénticos dominios SH3 de interacción y ambas isoformas son capaces de unir y activar eficientemente a las quinasas Src en un ensayo de células libres (Lim et al., 1999; Boonyaratanakornkit et al., 2007c), RP-A no fue capaz de mediar la activación mediada por progestágenos de Src y las MAPK río abajo (Boonyaratanakornkit et al., 2007b). El análisis de la localización intracelular de RP-A y RP-B en diferentes tipos celulares y condiciones mediante la utilización de proteínas fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP), reveló que RP-B se distribuye entre el citoplasma y el núcleo, mientras que RP-A es predominantemente nuclear (Lim et al., 1999; Boonyaratanakornkit et al., 2007a). Todos estos resultados han sido obtenidos utilizando construcciones de RP humanas. Recientemente ha sido reportado que el RP de ratón carece de los sitios ricos en prolina necesarios para la activación de Src (Hammes and Levin, 2007b); lo que denota la necesidad de una cuidadosa extrapolación entre los datos previos en células humanas y células de ratón.

La figura 1.8 muestra una integración de los procesos mencionados.

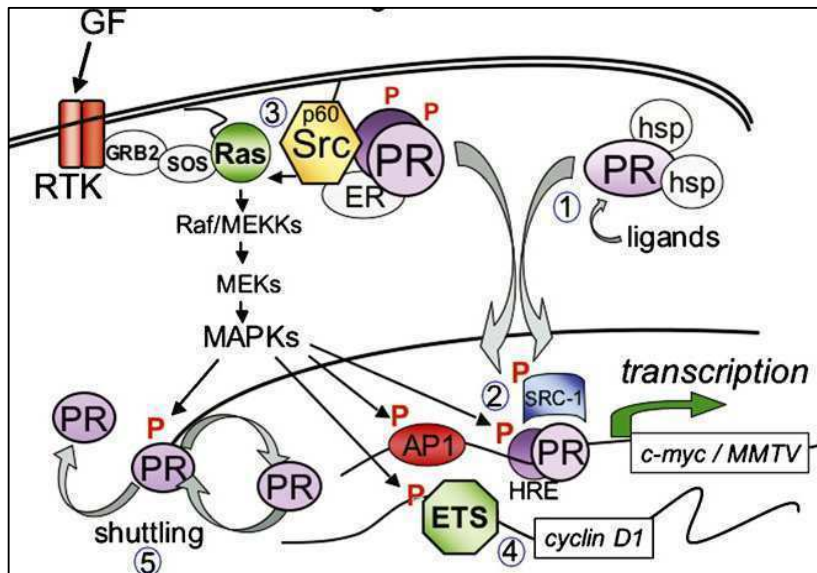


Figura 1.8: Modelo integrado para la acción de RP (en la figura PR); tomado de (Lange, 2007).

En células de la granulosa, que no expresan RP, la Pg inhibe la apoptosis de manera esteroide-específica y dosis dependiente. Este fenómeno se da por la unión de la Pg a un receptor novel, de 60 kDa, localizado en la membrana plasmática. Este receptor posee una baja afinidad y alta capacidad para unir Pg, pero es incapaz de unir progestágenos sintéticos como el MPA o antiprogestágenos como mifepristona u onapristona (Peluso et al., 2001). Se han reportado también proteínas de 54 y 57 kDa que unen Pg en la superficie de espermatozoides utilizando un anticuerpo diseñado contra el RP clásico (Luconi et al., 1998).

A partir de la fracción microsomal de hígado de rata se purificó por primera vez una proteína de membrana denominada PGRMC1, componente 1 del receptor de membrana de Pg (Meyer et al., 1996) a la que luego otros grupos denominaron 25-Dx, por el peso molecular observado de esa proteína regulada positivamente por dioxina en hígado de rata (Selmin et al., 1996). Esta proteína se encuentra muy conservada en vertebrados, posee un dominio transmembrana N-terminal y un dominio citoplasmático putativo de unión al ligando con citocromo b5. Posteriormente se clonó un homólogo a PGRMC1 humano al que denominaron Hpr6.6 (heme progesterone receptor 6.6) localizado en el cromosoma X, y otro denominado Dg6, o PGRMC2 (Gerdes et al., 1998). La confusión de nomenclatura hizo que, a la fecha, varios autores usen diferentes nombres para la misma proteína haciendo difícil el registro de estos estudios. Tanto PGRMC1 como PGRMC2 se encuentran

expresadas en espermatozoide humano y podrían estar involucradas en la reacción acrosomal desencadenada por Pg (Losel et al., 2005). PGRMC1 es una proteína interesante en el estudio de injuria de la médula espinal en ratas, dado que está ubicada en las membranas de las neuronas del cuerno dorsal y central de la médula espinal y su expresión se encuentra incrementada en esta patología (Labombarda et al., 2003).

En el año 2003, en el Laboratorio del Dr. Price se describió en células endoteliales de aorta humana un receptor de Pg de membrana. Utilizando anticuerpos contra el RP clásico observaron marcación de membrana en células de aorta, y por medio de *western blot* obtuvieron bandas inmunoreactivas de 100 y 60 KDa. Aproximadamente el 8% de las células endoteliales de aorta expresaban este receptor en su membrana y la mayor parte de las células que lo expresan se encontraban en fase G2/M del ciclo celular (Welter et al., 2003). El mismo grupo de trabajo clonó luego y expresó un RP truncado de 38 KDa cuya homología con el RP clásico reside en la región bisagra y la de unión a la hormona, al que denominaron PR-M, y del cual no se conoce función aún (Saner et al., 2003a). Este mismo receptor fue detectado luego en células T47D-Y, que no expresan RP nuclear, mediante ensayos de inmunofluorescencia. Los autores de este trabajo especulan que los PR-M en células que no poseen receptores nucleares podrían estar participando en la movilización de calcio, como se ha observado en espermatozoides (Price et al., 2005).

Más allá del RP clásico y formas alternativas del mismo, en el Laboratorio del Dr. Thomas, se clonó un receptor de Pg en ovocitos de trucha marina (*spotted seatrout*) que no tiene ninguna similitud estructural con el RP clásico, y que denominaron mPR. Este receptor es del tipo de siete pasos transmembrana acoplado a una proteína G (Tang Y T et al, 2005). El ADNc del mismo codifica para una proteína de 40 KDa, y sería aquel involucrado en la maduración meiótica producida por Pg en ovocitos de pez (Zhu et al., 2003b). Más adelante observaron que se encontraba conservado en otras especies como *Xenopus*, ratón, cerdo y humano; y que hay 3 grupos de genes que codifican para estas proteínas a los que denominaron mRP α , mRP β y mRP γ . La distribución de estas proteínas presenta diferencias, ya que mRP α se encontró principalmente en tejidos reproductivos como placenta, testículo, ovario y útero, también en vejiga, riñón, y médula

adrenal. La forma β se distribuye particularmente en tejidos nerviosos como el cerebro y médula espinal. El subtipo γ está presente en riñón, riñón fetal, colon, carcinoma pulmonar, médula adrenal y pulmón; también fue detectada en células HeLa 53 (Zhu et al., 2003a). En la figura 1.9 se presenta un diseño de la estructura de estos receptores.

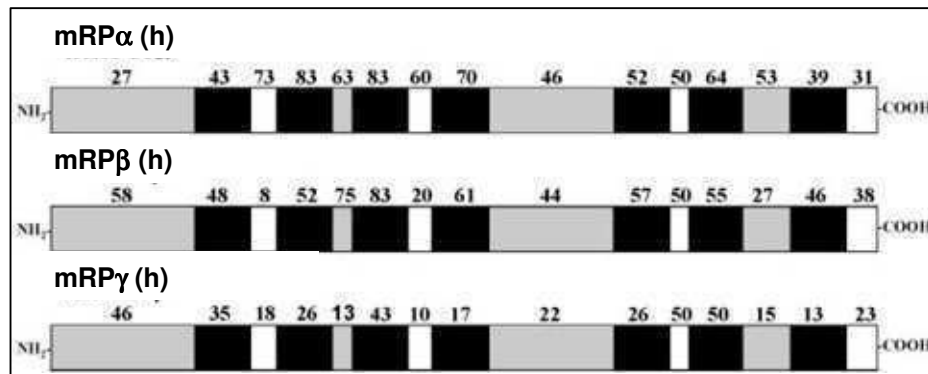


Figura 1.9: Comparación de la secuencia de aminoácidos entre el mRP de trucha y los 3 mRP humanos. Los números arriba indican el porcentaje de identidad de secuencia de los aminoácidos en cada dominio entre el mRP de pez y humanos. En gris los dominios extracelulares, en negro los transmembrana y en blanco los citoplasmáticos, tomado de (Zhu et al., 2003a).

En cuanto a las características de unión al ligando de estos receptores, por medio de ensayos de saturación y de *Scatchard* se determinó que el mRP α transfectado en células MDA-MB-231 que no poseen el RP clásico, presenta un único sitio de unión de alta afinidad (K_d 7.58 ± 0.93 nM), saturable y específico para 17,20 β ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20 β -S), progestágeno característico de peces, al igual que para la Pg. Tiene muy baja afinidad por la testosterona y aún más baja para E_2 y cortisol. Es interesante recalcar que no es capaz de unir RU-486 ni el progestágeno sintético R5020 (Dressing and Thomas, 2007). Las características de la forma β resultaron similares a las de la forma α . Al expresar mRP α en células MDA-MB-231, el tratamiento con Pg induce una disminución de la actividad de la adenilato ciclasa (medido como disminución de los niveles de AMPc) dosis dependiente, acoplándose a una proteína G inhibitoria (Thomas et al., 2007), y produce un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 (Hanna et al., 2006). En la figura 1.10 se representa las vías de transducción de señal activadas por estos receptores.

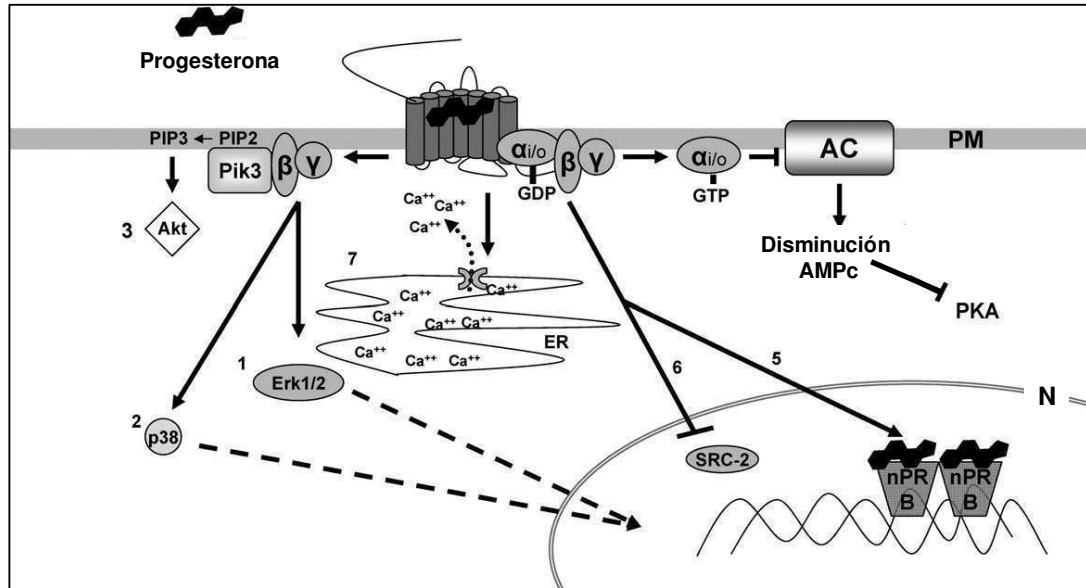


Figura 1.10: Modelo actual para la vía de activación de señales activada por los mRP. nPR: RP nuclear. Tomado de (Dressing and Thomas, 2007).

En cuanto a la ubicación del receptor, por medio de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos desarrollados contra el extremo amino-terminal, los autores observaron que éste sería el extremo extracelular al estar el receptor localizado en la membrana plasmática. (Thomas et al., 2007). Sin embargo, otros autores observaron que los homólogos humanos de los mRPs se localizan en retículo endoplasmático y más aún, que no son capaces de iniciar una señalización mediante AMPc en respuesta a Pg; sino que producen movilización de calcio (Krietsch et al., 2006).

El rol que estarían cumpliendo estos receptores nóveles para Pg está siendo actualmente analizado. Se ha observado que en miometrio humano se expresan tanto la forma α como la β y que se encuentran diferencialmente moduladas durante el parto. La disminución de los niveles de AMPc generada por la Pg mediante estos receptores lleva a un aumento en la fosforilación de la cadena liviana de miosina, facilitando la contracción miometrial. Además la activación de los mRPs llevaría a la transactivación de RP-B, produciéndose un *cross-talk* entre ambas moléculas. La presencia de estos receptores en miometrio podría mediar la disminución de Pg, llevando al útero a un estado de contracción (Karteris et al., 2006). En cuanto a sus funciones en tejidos malignos se observó que, si bien la mama normal expresa estos receptores, la expresión del $\text{mRP}\alpha$ se encuentra

elevada en biopsias de tumores de mama, sugiriendo también la importancia que podrían tener de participar en un *cross-talk* con RP al igual que en útero (Dressing and Thomas, 2007).

En síntesis, los datos existentes sobre estos receptores son todavía muy recientes y poco a poco se irá conociendo su participación en las respuestas biológicas, esperando que en los años venideros se aclaren las diferencias actualmente observadas.

IV. Tratamiento del cáncer de mama

El manejo del cáncer de mama se lleva a cabo combinando varias disciplinas médicas como diagnóstico por imágenes, patología, cirugía, radiación oncológica y medicina oncológica.

Como profilaxis, actualmente se recomienda el control de la densidad de la mama mediante mamografías comenzando a la edad de 40 años en aquellas mujeres con bajo riesgo de desarrollar un cáncer de mama, y más tempranamente en los casos de mujeres con historia familiar de cáncer.

Una vez que se ha diagnosticado el cáncer, el tratamiento depende del estadio de la enfermedad, y de factores patológicos como la expresión de receptores hormonales y el grado tumoral (Moulder S y Hortobagyi GN, 2008).

La primera decisión es la cirugía, es decir la remoción del tumor primario y la evaluación del nódulo axilar ipsilateral. En la actualidad, la utilización de la biopsia del ganglio centinela, es decir del primer ganglio linfático al que es probable que el cáncer se disemine desde el tumor primario, evita una disección completa de los nódulos axilares, disminuyendo la morbilidad de la operación. Para reducir el riesgo de recurrencia de la enfermedad los pacientes pueden recibir terapia de rayos, quimioterapia u hormonoterapia.

Para aquellos pacientes que presentan cáncer de mama avanzado y metástasis, la terapia se considera solamente paliativa, realizándose principalmente tratamientos con agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina, docetaxel o paclitaxel. En los casos en que haya desarrollado metástasis ósea, se utilizan también los bisfosfonatos. Estos compuestos inhiben la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos, responsable en casi el 50% de los casos de fracturas (Coleman RE, Ann Oncol 16, 687-695, 2005).

Otra posibilidad es la administración de una terapia adyuvante, endócrina o biológica, que puede ser administrada como neoadyuvante (antes de la cirugía) o adyuvante (post-cirugía). Se ha demostrado que la terapia adyuvante puede reducir el riesgo de recurrencia entre un 30-50% (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005).

La terapia biológica es aquella que se dirige al control de señales intracelulares transmitidas por los receptores tirosin-quinasa (RTK) que influyen en el crecimiento, supervivencia, y diferenciación de las células del cáncer de mama. En este caso se utilizan los compuestos desarrollados contra HER-2, mencionados anteriormente. En la actualidad se encuentran en estudio además compuestos dirigidos contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como el Bevacizumab, un anticuerpo recombinante humanizado contra VEGF (Moulder S y Hortobagyi GN, 2008).

La terapia endócrina en el cáncer de mama humano se basa en inducir la alteración del entorno hormonal, en particular la disminución en los niveles de estrógenos, antagonizando así la acción estimuladora del crecimiento de los mismos. Esto permite reducir el crecimiento del tumor mamario en muchas especies (Vorherr and Messer, 1978). En un 70-80% de los pacientes con cáncer de mama, los tumores expresan RE (RE+) y RP (RP+) y la respuesta al tratamiento hormonal antiestrogénico es favorable. La expresión de ambos receptores es altamente indicativa de un RE funcional y, en consecuencia, de una respuesta favorable al tratamiento. De todas maneras, en la gran mayoría de los cánceres de mama el tratamiento hormonal cesa de ser efectivo luego de un cierto tiempo; la enfermedad recurre y se disemina (Tonetti and Jordan, 1997).

Las terapias endócrinas actuales en cáncer de mama están dirigidas o a bloquear el RE o a inhibir la fuente del ligando, o sea de E₂. El tratamiento más utilizado es el de moduladores selectivos del RE (SERMs), cuya característica principal es su capacidad de actuar de manera diferencial dependiendo del tejido en el cual se encuentren.

El SERM que se utiliza actualmente es el Tamoxifeno (Nolvadex®). Sin embargo, dado que este compuesto presenta actividad agonista en el útero, se está intentando reemplazarlo por otros SERMs, como por ejemplo el Raloxifeno. Recientemente se han reportado los resultados del estudio RUTH (*Raloxifene Use for The Heart Trial*) en los cuales se informa una reducción del riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres tratadas con Raloxifeno, mientras que no reduce el riesgo de cáncer de mama no-invasivo RE negativo (Grady et al., 2008). Además de los SERMs se encuentran en estudio otros compuestos como el Fulvestrant (Faslodex™, ICI 182780), considerado como un antiestrógeno puro o regulador

negativo selectivo de RE (SERD). El Fulvestrant se une al RE e induce un cambio conformacional previniendo la dimerización del receptor y llevando a una rápida degradación del complejo fulvestrant-RE (Dauvois et al., 1993). El problema que presenta este compuesto es que, al ser antagonista puro, priva a la paciente de los efectos beneficiosos de los estrógenos. Lo mismo sucede en las terapias con inhibidores de aromatasa, que inhiben la producción periférica de E₂ en pacientes postmenopáusicos (Brueggemeier et al., 2005).

Si pensamos que los estrógenos inducen la síntesis de RP (Nardulli et al., 1988), que el gen BRCA mutado está asociado a aumento de RP (King et al., 2004), y por otra parte los RP también median repuestas proliferativas en la glándula mamaria (Fendrick et al., 1998); parecería razonable que agentes que bloqueen al receptor serían adecuados para el tratamiento del cáncer de mama. En ese sentido nuestro laboratorio está abocado a estudiar si un subgrupo de pacientes con alta expresión de la isoforma A de RP podría beneficiarse de una terapia con antiprogestágenos.

Antiprogestágenos

La Mifepristona o RU-486 fue el primer antagonista de Pg desarrollado que exhibió actividad antiprogestágeno en humanos; desde entonces han surgido varios compuestos análogos relacionados cuya acción va desde antagonistas puros (*pure antagonists*, PA) hasta antagonistas-agonistas mixtos, conocidos en el presente como moduladores del RP (PRM). El RU-486 entra en esta segunda categoría ya que según los estudios realizados por los Drs. Dean Edwards y Kate Horwitz, las isoformas de RP responden de manera diferencial al RU-486: éste puede funcionar como un agonista parcial bajo ciertas circunstancias celulares cuando activa a RP-B, no así cuando se une a RP-A (Meyer et al., 1990; Tung et al., 1993). Además se ha observado que en presencia de activadores de PKA como el AMPc, RU-486 puede comportarse como agonista (Beck et al., 1993). Otros antagonistas que presentan un comportamiento similar al RU-486 son el ZK 137 316, con el cual se realizan estudios en útero de primates; y ZK 112 993 del cuál hay reportes sólo hasta el año 1998 trabajando en útero de rata.

Las principales características estructurales de RU-486 que se correlacionan con su actividad antagonista son un grupo fenil-aminodimetilo en la posición 11-β del

esqueleto esteroide (R1); y la cadena lateral del carbono 11 (R2), visibles en la figura 1.11. Aunque el RU-486 se une con alta afinidad a RP, afinidad aún más alta que la de la propia Pg (la constante de disociación para el RP humano y de roedores es de aproximadamente 2×10^{-9} M; (Horwitz, 1992) y compite efectivamente por la unión; no hace los mismos contactos con el LBD que el agonista. Como evidencia de esto, se observó que truncar los últimos 42 aminoácidos del extremo C-terminal de RP anula la unión del agonista pero mantiene la del antagonista (Vegeto et al., 1992) y la sustitución de un solo aminoácido en la posición 722 en el LBD de RP humano hace que éste mantenga la alta afinidad por Pg perdiendo su capacidad de unión a RU-486 (Benhamou et al., 1992).

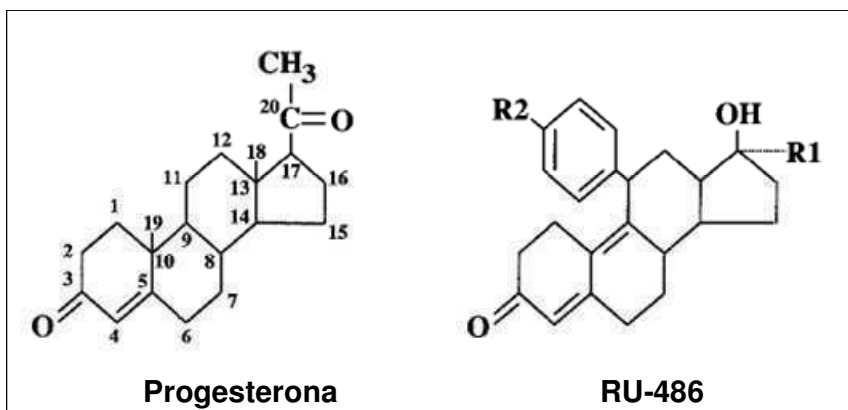


Figura 1.11: Estructura química de la Pg y del RU-486. Las posiciones de los carbonos en el anillo esteroide están numeradas en la estructura de la progesterona. La estructura del RU-486 muestra sustituciones en las posiciones 11 β y 17 β características de la estructura de los antiprogestágenos esteroides. Figura tomada de (Leonhardt and Edwards, 2002a).

En cuanto a la dimerización y la unión al ADN, el RU-486 produce una fuerte dimerización de RP y una asociación estrecha con el ADN, mayor que la inducida por el agonista (DeMarzo et al., 1992; Skafar, 1991). Basándose en estudios de huellas digitales de ADN (*DNA footprinting*), se observó que el RP hace contacto con elemento respondedor a hormonas del virus del tumor mamario murino (MMTV, *Mouse mammary tumor virus*) en presencia del agonista y de RU-486 (Kuhnel et al., 1989). La principal diferencia observada es que la unión de RU-486 induce una conformación distinta en el extremo C-terminal de RP a la que induce el agonista (Onate et al., 1995). Esta conformación impide el reclutamiento de coactivadores

(Tanenbaum et al., 1998), habilitando el reclutamiento de corepresores, particularmente de NCoR (Jackson et al., 1997), figura 1.12.

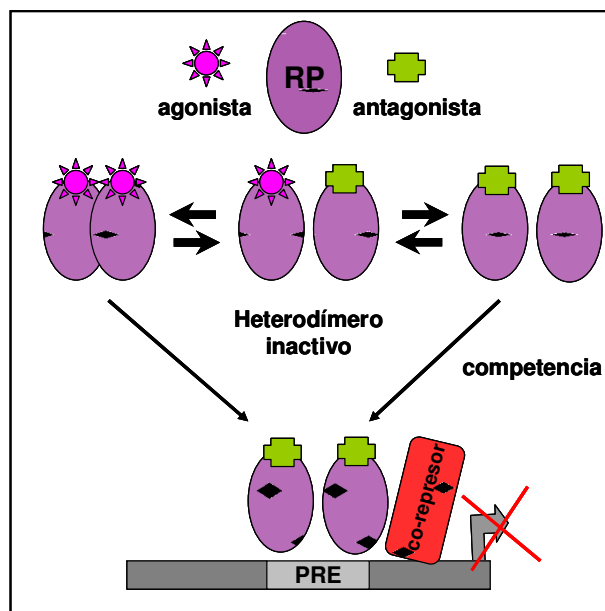


Fig. 1.12. Mecanismo de antagonismo “activo” de RP. Los antagonistas de Pg compiten con los agonistas para unir RP y promueven la dimerización y unión a PREs del ADN blanco. Sin embargo el RU-486 induce una conformación de RP que es transcripcionalmente inactiva llevando al reclutamiento de corepresores en lugar de coactivadores. Modificado de (Leonhardt and Edwards, 2002c).

Otro antagonista utilizado anteriormente fue la Onapristona o ZK 98 299 (ZK-299). Este antagonista actúa de la misma forma que RU-486, produciendo dimerización de los receptores y unión a PREs, pero forma una asociación más débil que la inducida por RU-486 (Leonhardt and Edwards, 2002b). Ambos compuestos tienen afinidad por el RG, pero la afinidad que presenta ZK-299 es menor que la de RU-486. Sin embargo el uso del ZK-299 fue discontinuado debido a los efectos colaterales que se presentaron. En un estudio sobre la utilización de ZK-299 como primera línea de tratamiento, se observó alta toxicidad hepática, lo que llevó a Schering AG a suspender el desarrollo de este compuesto (Robertson et al., 1999).

Con ambos antiprogéstágenos se han llevado a cabo ensayos clínicos, que se presentan resumidos en la tabla 1.3. Los efectos positivos de los tratamientos se observaron principalmente en pacientes con tumores RP+.

Autores	Antiprogéstágenos	Dosis (mg/día)	Número de pacientes	Respuesta completa	Respuesta parcial	Sin cambios	Progresión
Romieux et al (1987)	RU-486 (tercera línea)	200	22	0	3	9	10
Klijn et al (1989)	RU-486 (segunda línea)	200-400	11	0	1	6	4
Jonat et al (1994)	ZK-299 (segunda línea)	100	90	1	8	38	43
Perrault et al (1996)	RU-486 (primera línea)	200	28	0	3	11	14
Robertson et al (1999)	ZK-299 (primera línea)	100	18	0	10	2	7

Tabla 1.3. Efectos antitumorales del tratamiento con antiprogéstágenos en pacientes post-menopáusicas con cáncer de mama metastático (Klijn et al., 2000)

Continuamente se desarrollan compuestos intentando disminuir la actividad Gc que presenta RU-486 (Bamberger and Chrousos, 1995), uno de ellos es ZK 230 211 (ZK-211), que posee una marcada reducción de la actividad Gc comparado con RU-486. Este antiprogéstágeno hace que el complejo RP-antagonista se una al ADN, pero no induce activación de la transcripción y a diferencia del RU-486 no tiene actividad agonista en presencia de AMPc (Chwalisz et al., 2000). Debido a su reciente aparición, recién se están reclutando pacientes para los ensayos clínicos.

Actualmente el único antiprogéstágeno utilizado terapéuticamente es el RU-486 pero solamente como abortivo. Más allá de las fases clínicas, se encuentran en estudio y desarrollo los metabolitos del RU-486, CDB-2914 y CDB-4124 (Attardi et al., 2004).

V. Modelos experimentales

Para el estudio del cáncer de mama humano contamos con modelos experimentales. Un factor de gran importancia en la elección del modelo es tener claro hasta qué punto refleja la enfermedad humana y sirve para el propósito de la investigación (Clarke, 1996).

Uno de los modelos experimentales más utilizados son las líneas celulares obtenidas a partir de biopsias o líquido pleural de pacientes con cáncer de mama. Éstas han sido usadas para estudiar cómo la proliferación, la apoptosis y la migración se ven alteradas durante la progresión del cáncer de mama. Se utilizan frecuentemente dado que son fáciles de propagar, relativamente sencillas para manipular genéticamente, y, bajo condiciones experimentales bien definidas, los resultados son reproducibles y cuantificables (Vargo-Gogola and Rosen, 2007b). Los estudios se han realizado cultivando las células en monocapa, en agar, en matrigel, en forma de mamoesferas y también *in vivo* realizando xenotransplantes en ratones inmunosuprimidos.

Dentro de las líneas celulares que expresan receptores hormonales se han desarrollado varias líneas diferentes. Las más utilizadas han sido la MCF-7, la T47D y la ZR-75-1. Recientemente en el laboratorio de la Dra. Lüthy se han desarrollado otras tres líneas nuevas que serán muy útiles para aumentar la diversidad para el estudio del cáncer de mama (Vazquez et al., 2004). El trabajo con líneas celulares que expresan receptores hormonales permite estudiar las vías de señalización reguladas por estrógeno y progesterona, hormonas esenciales en el desarrollo de la mama.

Es un tema a considerar cuánto se asemejan las líneas celulares al cáncer de mama humano. Ninguna línea celular aislada es realmente representativa, sin embargo, un estudio que involucra a 51 líneas muestra que la mayoría posee las anomalías genómicas que se detectan en los tumores primarios (Neve et al., 2006). Pero existen otras diferencias como por ejemplo, la falta de representación de todos los subtipos de carcinomas ductales, probablemente debido a que varias líneas celulares se obtuvieron a partir de tumores de estadios avanzados y representan las variantes más malignas que pueden ser adaptadas al cultivo celular.

Para el estudio de la biología del cáncer de mama han sido también muy utilizados los modelos animales. Estos contribuyen a un mayor entendimiento de la enfermedad y los factores endocrinológicos que influyen tanto sobre el desarrollo de la glándula mamaria normal como sobre la susceptibilidad al cáncer de mama. Existen numerosos efectores fisiológicos (endocrinológicos, inmunológicos y de comportamiento) que podrían influir sobre el crecimiento y progresión de la enfermedad. Así mismo, estos modelos también son críticos para el ensayo de nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer de mama humano y para tratar de conocer los mecanismos asociados a la iniciación, promoción y progresión de la enfermedad.

Los modelos de rata más utilizados son los que involucran la participación de carcinógenos químicos como la nitrosometilurea (NMU) o el dimetilbenzantraceno (DMBA). Estos modelos han sido muy utilizados para comprender el rol promotor de los estrógenos en la carcinogénesis mamaria. Sin embargo, la carencia de estrategias de ingeniería genética para ratas, particularmente la transferencia nuclear para desarrollar animales *knockout*, ha hecho que la utilización de la rata como modelo animal haya disminuído (Vargo-Gogola and Rosen, 2007a).

Los modelos en ratón son una excelente oportunidad para comprender la biología del cáncer de mama. Sin embargo, aunque existen similitudes entre el cáncer de mama de ratón y el humano, se presentan también diferencias importantes. Particularmente, una de estas diferencias es que la mayoría de los cánceres de ratón, si bien metastatizan en pulmón, no lo hacen a los nódulos linfáticos ni en los huesos, sitio más frecuente de metástasis en humanos (Bumaschny et al., 2004). En forma similar, la mayor parte de los modelos murinos, ya sea espontáneos o transgénicos son de crecimiento HI. En los últimos años estos últimos se han utilizado principalmente para conocer la importancia de determinados genes en la biología del cáncer mamario (Cardiff et al., 2000).

En la década del '40 cuando se descubrió el factor leche, luego identificado como MMTV (Barnum et al., 1944) las cepas de ratones portadoras de virus también fueron muy utilizadas y luego dejadas de lado al no encontrarse un virus similar en el humano. Posteriormente con el advenimiento de los ratones genéticamente modificados los estudios en el ratón adquirieron nuevamente un rol protagónico.

Pero siempre se debe tener en cuenta que según los promotores que se utilicen para expresar los oncogenes deseados, se pueden ver afectados los niveles de expresión, el momento del desarrollo y los tipos celulares en el cuál se expresen, alterando el fenotipo tumoral (Vargo-Gogola and Rosen, 2007c).

Entre los modelos más caracterizados se encuentra el denominado MXT. Es un tumor murino que expresa RE y que fue originado en ratones híbridos tratados con uretano (Watson et al., 1979).

En el Instituto Angel Roffo, se desarrollaron principalmente 3 modelos de cáncer de mama de ratón. Comenzando con el modelo del Dr. Colombo con las variantes M3 y MM3, surgidas a partir de un carcinoma mamario espontáneo con metástasis pulmonares (Bal et al., 1983) se seleccionó la variante metastásica MM3 por trasplantes consecutivos de la metástasis pulmonar. Este modelo, hormono-independiente, fue muy utilizado para estudios de metástasis. Luego, el tumor M38, que se desarrolló espontáneamente de una hembra de la cepa BALB/c preñada. Además de generar metástasis pulmonares luego de trasplantes subcutáneos seriados, es capaz de formar tumores secundarios en nódulos linfáticos en el 90% de los ratones transplantados (Bumaschny et al., 2004). Por último recientemente han caracterizado al tumor MO5 que surgió de una hembra virgen BALB/c y que no crece en ratones macho o en hembra ovariectomizadas. Este tumor expresa RE y RP y muestra una dependencia hormonal al E₂.

La mayoría de los tumores espontáneos de ratón no expresa receptores hormonales o los deja de expresar en los sucesivos trasplantes. Igualmente sucede con los modelos de ratones genéticamente modificados. Es importante destacar que los mismos se han desarrollado principalmente en ratones C57BL/ o FVB. La cepa C57BL/6 ha sido considerada resistente a la carcinogénesis mamaria, y es probable que si estos modelos hubieran realizado en un *background* BALB/c la incidencia de carcinomas mamarios así como la biología del tumor hubiera sido diferente (Montero Girard et al., 2006)

Es interesante mencionar el modelo recientemente desarrollado por los Drs. Briskin e Iggo. Fue generado a partir de una transfección de células mamarias epiteliales humanas con un lentivirus conteniendo el gen de RE α , el oncogen MYC, y BML1, un oncogen conocido por cooperar con el gen MYC en la generación de

linfomas de ratón. Estas condiciones produjeron la expansión *in vitro* de las células de una manera estrógeno-dependiente. El xenotransplante de las células de este modelo en glándula mamaria de ratones severamente inmunodeprimidos (NOD/SCID), resultó en la formación de tumores RE α positivos y la posterior metástasis a múltiples órganos. La expansión *in vivo* resultó también dependiente de estrógenos, creando de esta manera un modelo con potencial para el estudio de cáncer estrógeno-dependiente (Duss et al., 2007).

Modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios por progestágenos

En nuestro laboratorio, cuando se trabajaba en la Academia Nacional de Medicina, se desarrolló el modelo experimental de obtención de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/c, con una incidencia actuarial de 76% y una latencia media de 52 semanas (Lanari et al., 1986a; Lanari et al., 1986b). Estos tumores son en su mayoría de origen ductal con capacidad de generar metástasis en pulmón y nódulos linfáticos (Lanari et al., 1989).

Los tumores se mantienen por pasajes singenéticos en ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c. Los tumores ductales crecen sólo en los ratones tratados con MPA durante los dos a tres primeros meses de seguimiento. Al alcanzar un tamaño aproximado de 10-15 mm de diámetro, se transplanta a otros dos ratones tratados o no con MPA, y así sucesivamente para controlar la hormono-dependencia. La Figura 1.13 representa esquemáticamente la obtención de las líneas tumorales HD y HI a partir de tumores ductales inducidos por MPA.

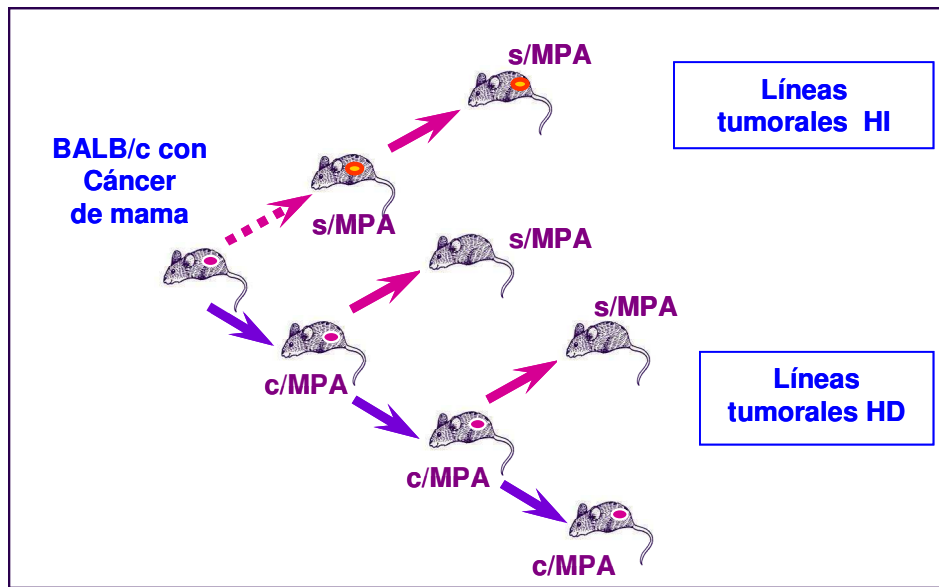


Figura 1.13: Obtención de líneas tumorales HD y HI. Se transplató el tumor primario a dos ratones tratados con MPA (20 mg depot, subcutáneo (sc), contralateral al transplante tumoral) y a dos ratones sin tratar. Por presión selectiva se seleccionaron ratones que desarrollaron el tumor en ausencia del MPA, a los que se los denominó HI.

En menor proporción, el MPA induce también carcinomas del tipo lobulillar que expresan bajos niveles de RE y RP y mayores de EGF-R evaluados por técnicas de unión al ligando. Histológicamente, se asemejan a los tumores mamarios que surgen espontáneamente en hembras multíparas BALB/c. Tanto los tumores del tipo ductal como lobulillar son precedidos por lesiones preneoplásicas similares a las del cáncer de mama humano (Molinolo et al., 1987).

En los primeros experimentos, luego de un período de latencia de 4 a 12 meses se establecieron diversas líneas tumorales. Algunas de ellas se definieron como hormono-dependientes (HD) y se caracterizan por tener una mayor tasa de crecimiento, un menor período de latencia en animales tratados con MPA o Pg y por no crecer en animales ovariectomizados sin tratar (Figura 1.14 A)

Eventualmente surgieron variantes tumorales hormono-independientes (HI) que crecían tanto en presencia como en ausencia de la hormona (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989; Kordon et al., 1990). Estas variantes conservan altos niveles de RE y RP. Los tumores HI crecen en forma similar en animales tratados con MPA, no tratados, ovariectomizados y con operación simulada (Figura 1.14 B). En la figura se muestra un pasaje tardío de un tumor HI. Su velocidad de crecimiento es en general

mayor que la de los tumores HD y aumenta también con el número de pasajes *in vivo*.

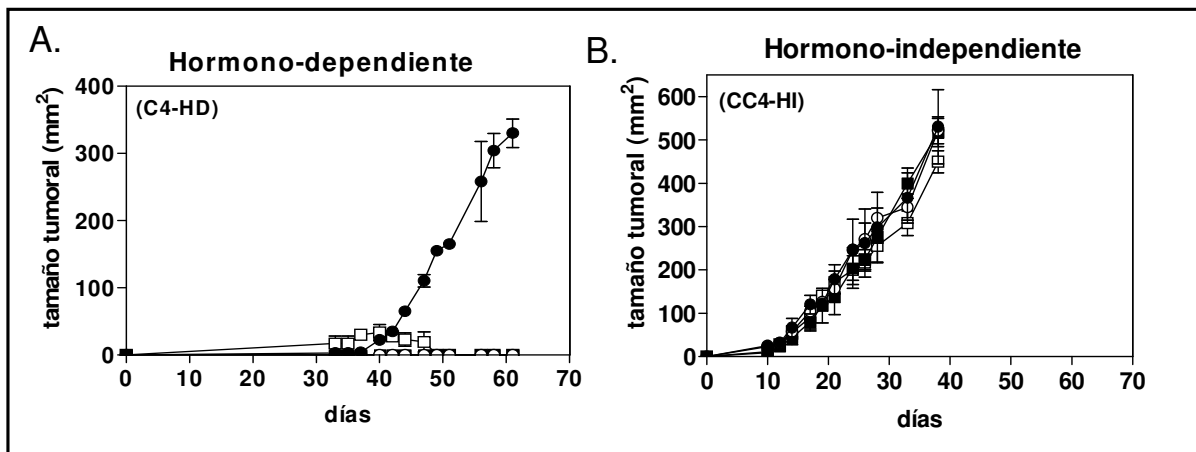


Figura 1.14: Crecimiento de adenocarcinomas mamarios murinos *in vivo*. Los tumores se transplantaron con trocar en el flanco inguinal derecho de animales ovariectomizados (■), con operación simulada (□), inoculados sc en el flanco inguinal izquierdo con un depósito de MPA (20 mg/ratón) (●) y controles (○). El tamaño se midió cada 2 días con un calibre (largo x ancho). En el gráfico se indica tamaño tumoral medio \pm DS. Se muestra una curva representativa de cada tipo de tumor; tomado de (Helguero et al., 2003b).

Recientemente, los tumores HI se han subdividido en respondedores (HI-R) o no respondedores. Esta subdivisión se basó en la capacidad de inhibir su crecimiento tumoral en respuesta a antiprogéstágenos (RU-486 y ZK-299) y E_2 (Figura 1.15; (Helguero et al., 2003b).

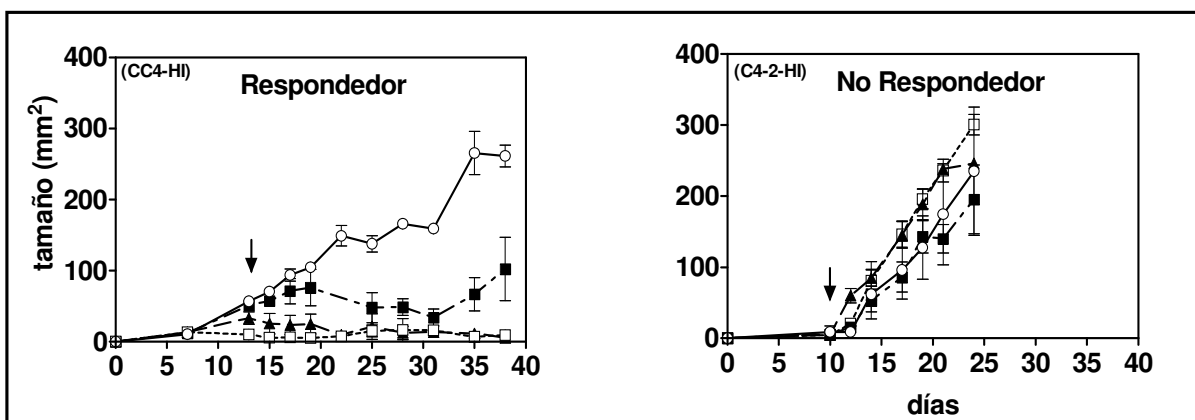


Figura 1.15: Respuesta *in vivo* al tratamiento con antiprogéstágenos y E_2 . Se muestran ejemplos representativos de un tumor respondedor (izquierda) y otro no respondedor (derecha). El

tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 25-100 mm². Se utilizaron 3-4 animales por grupo. Los tratamientos consistieron en implante dorsal de un pellet de estradiol (5mg; □), o inoculaciones sc diarias de onapristona (10 mg / kg; ■), mifepristona (6.5 mg / kg; ▲) y control (○). El tamaño tumoral se midió cada 3-4 días (largo x ancho). La flecha indica el inicio de los tratamientos. Tomado de (Helguero et al., 2003b).

Los estudios realizados *in vitro* demostraron que los tumores HD y HI se comportan de manera similar. Las células de los tumores HI pueden mantener la capacidad de ser estimuladas por MPA, aunque en menor grado que las HD. A su vez, los antiprogestágenos y el E₂ inhiben la proliferación celular.

En este modelo de carcinogénesis hormonal, el RP juega un papel esencial en el crecimiento tumoral. Los tumores de crecimiento HI pero que responden al tratamiento endocrino, tienen el mismo patrón de expresión de isoformas de RP que los tumores HD, excepto que en los primeros el MPA regula principalmente la isoforma B de RP. Por otra parte, los tumores HI no respondedores expresan una menor cantidad de RP evaluado por ensayo de unión al ligando (Helguero et al., 2003b), siendo RP-A el que se encuentra expresado en menor cantidad (Wargon et al., 2008c). La importancia de este receptor en el crecimiento tumoral fue determinada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* con nucleótidos antisentido para RP (asRP). Esta estrategia redujo los niveles de expresión de RP, causando una inhibición en la proliferación celular. A su vez, la utilización de esta estrategia antisentido *in vivo* inhibió el crecimiento tumoral (Lamb et al., 2005).

El grupo de la Dra Elizalde demostró que los progestágenos producen un aumento en los niveles de expresión de caveolina-1 (Salatino et al., 2006) y que, mediante la capacidad de RP de activar tanto la vía de ERK como de la vía de AKT, aumenta la proliferación celular, la activación de metaloproteinasas y el desarrollo de un fenotipo metastático (Carnevale et al., 2007).

En este modelo la regresión tumoral inducida por RU-486 es acompañada de citostasis y apoptosis, llevando a una disminución del epitelio y un aumento del estroma tumoral (Vanzulli et al., 2002) o a la diferenciación celular (Wargon et al., 2008b). El tratamiento con asRP produjo resultados similares a los observados con RU-486 (Lamb et al., 2005), planteando de esta manera la posibilidad de utilizar a este receptor como blanco terapéutico en aquellos tumores que presenten RP incapaces de unir ligando.

Las células de este modelo pueden utilizar tanto progestágenos como factores de crecimiento para proliferar. Sin embargo, siempre necesitan tener un RP funcional, ya que el bloqueo de RP induce la regresión tumoral. Los factores de crecimiento que podrían estar estimulando el crecimiento tumoral son los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs). El estroma de los tumores de este modelo presenta una mayor expresión de FGF-2 y los receptores para este factor (FGF2-R) se encuentran más expresados en el parénquima tumoral, principalmente FGF2-R y FGF3-R. Los resultados de cocultivos entre estroma HD o HI con células epiteliales HD o HI indican que el estroma HI ejerce un efecto proliferativo mayor que el HD (Giulianelli et al., 2008).

El estudio citogenético de los tumores de este modelo demostró que el tratamiento prolongado con MPA induce carcinomas mamarios con números cromosómicos diploides. Los tumores HD presentan un número de cromosomas diploide, mientras que las variantes HI presentan un número de cromosomas en el rango triploide a tetraploide. Todos los tumores presentan alteraciones numéricas y estructurales de sus cromosomas; siendo los cromosomas 4 y 7 los más involucrados en traslocaciones, los 3, 4 y 6 en ganancia, y los cromosomas 16 y X en pérdida. La adquisición de la hormono-independencia no es causada por el aumento de cromosomas, este aumento es posterior y ocurre como consecuencia del avance de los pasajes *in vivo* (Fabris et al., 2005a). Además de las alteraciones numéricas detectadas, los tumores C4-HD presentan una mutación en el gen *TRp53* (*transformation related protein 53*). Esta mutación en el codón 152 representa un cambio de serina a arginina en la proteína p53, sin embargo no están asociadas a la inestabilidad cromosómica (Fabris et al., 2005b).

A partir de los tumores de este modelo se han desarrollado siete líneas diferentes que expresan ER y PR (Lanari y col, 2001; Efeyan y col, 2004). En este trabajo se utilizaron dos de esas líneas MC4-L2 y MC4-L5, cuyas características se describen en materiales y métodos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia de receptores de progesterona (RP) clásicos en la membrana celular de un carcinoma mamario murino hormono-dependiente (C4-HD), en su variante independiente (C4-HI), y en las líneas celulares derivadas de C4-HD; y evaluar su posible participación mediando efectos no genómicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluar mediante microscopía confocal la presencia de RP clásicos en la membrana celular de células en cultivo utilizando diferentes anticuerpos específicos.
- II. Investigar por *Western blot* la presencia de ambas isoformas de RP en fracciones subcelulares de membrana purificadas de tumores o de células en cultivo.
- III. Explorar por PCR la expresión de los receptores de progesterona de membrana nódulos acoplados a proteína G recientemente descritos (mPR α , mPR β y mPR γ) en líneas celulares tumorales y en células en cultivo.
- IV. Analizar la regulación de la activación de MAPK (vía paradigmática de RTK) y la inducción de AMPc (vía paradigmática de receptores acoplados a proteína G) por el tratamiento de células de cultivo primario con bajas concentraciones de Pg, MPA y/o del antagonista RU-486.
- V. Estudiar el efecto de bajas concentraciones de RU-486 sobre la proliferación celular de C4-HD y C4-HI.

PARTE II



MATERIALES Y METODOS

I. ANIMALES, TUMORES Y LINEAS CELULARES

Animales

Se utilizaron ratones hembra vírgenes de 2 meses de edad provenientes del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales fueron criados en grupos de 4 por jaula con temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$) controlada, bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad con agua y comida *ad libitum*, siguiendo las recomendaciones del Manual del Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996). Los planteles de la cepa BALB/c provienen originalmente del Bioterio de la Universidad de La Plata.

Pasajes tumorales

El trasplante tumoral se realiza de rutina utilizando un trocar con el que se coloca un trozo de tumor de 2-3 mm³ en forma subcutánea (sc) en el flanco inguinal derecho del animal. En el caso de los tumores hormono-dependientes (**HD**) se inyecta también 0.1 ml de MPA *depot* sc (40 mg: Medrosterona, Gador, Argentina) en el flanco inguinal izquierdo. Como control de hormono-dependencia se transplanta el tumor a un ratón sin tratar con la hormona. A partir del tumor HD surgen eventualmente variantes capaces de crecer en ausencia de hormona a las que denominamos hormono-independientes (**HI**). En forma periódica se congelan trozos de tumor de aproximadamente 2-3 mm² en N₂ líquido para poder volver a un pasaje más temprano del tumor y no perder las variantes HD, que con los sucesivos pasajes tienden a la hormono-independencia

Tumores

En este trabajo utilizamos carcinomas mamarios inducidos por la administración prolongada de MPA a ratones hembra de la cepa BALB/c y mantenidos por trasplantes singenéticos (Lanari et al., 1986a; Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989). En este trabajo se utilizaron los tumores, C4-HD, CC4-HD y C4-HI.

C4-HD y CC4-HD: El tumor C4-HD fue así llamado porque provenía del grupo C y la caja 4 del experimento donde se reportó inicialmente que el MPA originaba carcinomas mamarios en ratones de la cepa BALB/c , o sea en un principio se llamó C4 (Lanari et al., 1986a). Se transplantó a ratones tratados con MPA, creció muy lentamente y luego se mantuvo por pasajes seriados como se explicó anteriormente. Luego de varios pasajes *in vivo* este tumor comenzó a crecer en los animales no tratados con MPA, se lo llamó C4-HI y se descongeló un pasaje primitivo al que se llamó C4-HD. Cuando se comenzaron los cultivos primarios de C4-HD, en el año 1990 se reinocularon las células adheridas al plástico para comprobar que se trataba de células representativas del comportamiento HD y para distinguir este tumor del anterior se lo llamó CC4-HD (la primer C viene de cultivo). Una vez cada dos años aproximadamente se vuelve a descongelar un pasaje primitivo. Presentan ambos un cariotipo cuasi-diploide con 4 marcadores característicos bien estudiados (Fabris et al., 2005b), expresan altos niveles de RE y RP (Dran et al., 1995), tienen una mutación puntual en p53 (Fabris et al., 2005b) y expresan c-erbB2 (Elizalde et al., 2001). Las células epiteliales purificadas de cultivos primarios son estimuladas con Pg o MPA, e inhibidas con E₂ o con antiprogéstágenos (Dran et al., 1995). FGFs, HRG o TNF α estimulan su crecimiento (Lamb et al., 1999; Balana et al., 1999), mientras que el IGF 1 e IGF 2 sólo producen una potenciación de la estimulación inducida por MPA. TGFB 1, 2 y 3 ejercen efectos inhibitorios y EGF por otra parte no estimula el crecimiento celular.

C4-HI: Presenta un patrón de crecimiento HI e inhibe su crecimiento ante el tratamiento con antiprogéstágenos. Se mantiene por pasajes singenéticos en hembras vírgenes BALB/c en ausencia de MPA. Se originó a partir del tumor C4-HD. Los tumores C4-HI también expresan altos niveles de RE y RP, pero adquirieron un cariotipo poliploide. Curiosamente, *in vitro* tiene los mismos requerimientos para proliferar que las células C4-HD (Giulianelli et al., 2008)

Líneas Celulares

Las líneas celulares MC4-L2 y MC4-L5 derivan de los tumores C4-HD, y son mantenidas en cultivo mediante repiques sucesivos. Estas líneas se obtuvieron en el laboratorio a partir del tumor C4-HD (Lanari *et al*, 2001).

MC4-L2: es una sublínea derivada de la MC4-L1. Cuando la MC4-L1 fue tripsinizada, un grupo de células se mantuvieron adheridas y al expandirse lo hicieron con una morfología diferente a las parentales, a las que llamamos MC4-L2. Esta línea crece como monocapa y presenta una morfología ahusada de tipo fibroblástica, sin embargo, presenta marcación para citoqueratina, lo que denota su naturaleza epitelial a pesar de su morfología. Expresan RE α y RP, y son respondedoras al MPA. Curiosamente, a diferencia de las células parentales C4-HD, el E₂ las estimula. Cuando estas células son inyectadas en ratones singeneicos desarrollan tumores con un patrón de crecimiento bifásico con áreas sarcomatosas sin signos de diferenciación epitelial, compuestos de células ahusadas atípicas formando grupos irregulares que infiltran y disocian el tejido circundante. Son frecuentemente multinucleadas y los núcleos presentan distribución irregular de la cromatina. Otras áreas muestran un crecimiento con patrón carcinomatoso con grupos sólidos y zonas de células poligonales, ocasionalmente con diferenciación glandular. Se observa la aparición de metástasis en nódulos linfáticos y pulmón (Lanari *et al.*, 2001) . *In vivo* responden muy poco al tratamiento hormonal. Esta línea presenta un cariotipo poliploide conservando los marcadores del tumor C4-HD.

MC4-L5: las células de esta línea crecen también en monocapa. Muestran una morfología más epitelial y homogénea que la MC4-L2. Expresan también RP y RE α y se observa marcación para citoqueratina. Son poco estimulables por MPA y E₂ *in vitro*. Al ser inoculadas en un ratón singenético crecen como un carcinoma ductal infiltrante presentando grupos sólidos de células proliferando con ocasional diferenciación glandular. Las células neoplásicas son poligonales, con núcleos grandes y ovoides y poco citoplasma. El tumor crece y metastatiza en nódulos linfáticos regionales (Lanari *et al.*, 2001). A diferencia del tumor anterior en este caso responden mejor al tratamiento endócrino, aunque nunca en la forma que lo

hace el tumor parental C4. Esta línea celular es una de las pocas líneas con cariotipo cuasi-diploide (Fabris et al., 2003).

LM3: línea celular establecida a partir del adenocarcinoma de mama murino M3. No expresan RP ni RE. Presentan un fenotipo altamente invasivo siendo los principales lugares de metástasis riñón, hígado y pulmón. (Bal et al., 1983). En este trabajo de tesis fue utilizada como línea control.

B16-BL: línea celular derivada de melanoma de ratón C57BL/6. Posee morfología ahusada y una alta capacidad metastásica.

II. CULTIVO CELULAR

Medio de cultivo

- DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1)
(Sigma Aldrich, St Louis) sin rojo fenol. 15,6 g/l
- Bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich) 1,2 g/l
- Sulfato de gentamicina comercial 50 mg/l

Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada o deionizada.

Suero Fetal Bovino (SFB) de complementado

SFB calentado en baño térmico a 56°C durante treinta minutos.

SFB adsorbido con carbón (SFBch)

Se incubó el SFB de complementado con carbón activado (5%) (Mallinckrodt) durante 1 h a 4°C con agitación permanente. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó dos veces a 12000 rpm durante 20 minutos (min). El sobrenadante se volvió a incubar con 5% de carbón activado pero esta vez durante toda la noche y, finalmente, el suero se centrifugó 6 ó 7 veces hasta eliminar completamente el carbón y se esterilizó por filtración.

Medio de cultivo para células epiteliales C4-HD y CC4-HD

- DMEM/F12

- 5% SFB (Bioser, Buenos Aires) de complementado y adsorbido con carbón (SFBch).

Medio de cultivo para células epiteliales C4-HI

- DMEM/F12
- 10% SFB de complementado

Medio de lavado

- DMEM/F12
- 2% SFB de complementado.

PBS 10X

- Na₂HPO₄.12H₂O (fosfato dibásico de sodio, dodecahidrato Baker) 30,06g
- NaH₂PO₄.H₂O (fosfato monobásico de sodio monohidratado, Anedra) 2,56g
- NaCl (Anedra) 87,6g

Se lleva a un litro con agua deionizada o bidestilada. Para trabajar se hace una dilución 1:10 con agua bidestilada.

Solución enzimática utilizada para la digestión tumoral

- Tripsina (Sigma Aldrich) 0,25% p/v
- Colagenasa Tipo II (Gibco, Invitrogen) 0,25% p/v
- Albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich) 0,5% p/v

Disuelta en PBS 1X.

Tripsina

- Tripsina 0,25% p/v

Disuelta en PBS 1X.

Tripsina-EDTA: en PBS (sin Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺).

- Tripsina 0,25% p/v
- EDTA (Laboratorios Cicarelli) 0,2 % p/v

Disuelta en PBS 1X.

Timidina

- ³H-timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) 0.4 μCi/hoyo

Líquido de centelleo

- Optiphase HI-safe3 (Wallac).

Hormonas y antihormonas utilizadas

- MPA (Sigma Aldrich)
- RU 38 486 o mifepristona (Sigma Aldrich)
- ZK 230 211 (Bayer Schering Pharma AG)
- Pg(Sigma Aldrich)

La adición a los cultivos se realizó a partir de soluciones madre concentradas 1000 a 10000 veces en etanol. La concentración final de etanol no excedió el 0,10% v/v, y no afectó significativamente el crecimiento ni la morfología celular (Dran et al., 1995).

Cultivos primarios

Los cultivos primarios se realizaron utilizando tumores de entre 50 y 100 mm², aproximadamente a los 15-20 días del trasplante. Los tumores se extirparon en esterilidad disgregando primero en forma mecánica con tijera y luego en presencia de la solución enzimática, agitando a 37°C durante 40 min. La suspensión celular obtenida está compuesta principalmente por dos poblaciones, una de estirpe epitelial y otra de estirpe fibroblástica. Para separarlas se utiliza la técnica de Pandis y col. con algunas modificaciones (*Pandis et al., 1992*). 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 así su separación luego de varias decantaciones diferenciales. Se colocaron las células en un tubo de centrífuga junto con 15 ml de medio de lavado y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante (SN) y las células se resuspendieron en medio con 10% SFB. La suspensión se dejó sedimentar durante 20 min; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados y del SN se obtiene la fracción fibroblástica, que fue descartada. A la fracción enriquecida en células epiteliales se

le agregó 15 ml de medio con 2% SFB en el que se resuspendieron las células. Las decantaciones fueron repetidas cada 20 min descartándose el SN cada vez, hasta que no se detectasen más células fibroblásticas en él (aproximadamente 20 decantaciones). Este es el momento en que se considera que se han separado exitosamente las células epiteliales. Luego de la última decantación las células fueron resuspendidas en medio con 10% SFB y se sembraron en placas de cultivo (Figura 2.1).

Para la obtención de cultivos enriquecidos en células epiteliales, los agregados celulares se dejaron adherir durante 48 h, y luego se eliminó cuidadosamente el SN. Los cambios de medio se realizaron cada 48 h, reemplazándolo por medio fresco con 10% SFB en el caso de las células HI o con 5% SFBch más MPA 10 nM para las células HD.

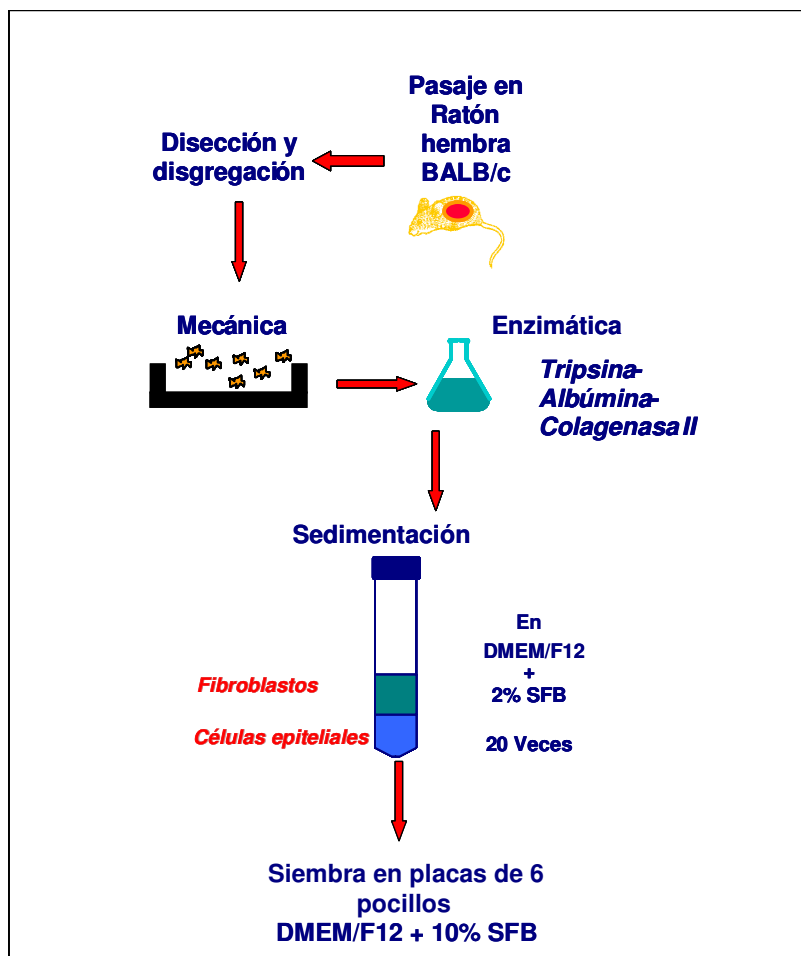


Fig 2.1: Representación esquemática del cultivo de tumores primarios.

Repique de células

Al llegar a confluencia, se enjuagaron las células con la solución de tripsina estéril y se incubaron durante 2-15 min a 37°C con la cantidad de tripsina necesaria como para cubrir el fondo del hoyo. Una vez que éstas se despegaron del fondo de la placa se las colocó en un tubo conteniendo 10 ml de medio de cultivo con medio con 10% SFB. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Luego, se descartó el SN y el precipitado se resuspendió con medio con 10% SFB. Finalmente, se sembraron las células en las placas correspondientes según el requerimiento del experimento a realizar.

Ensayos de proliferación celular

Los cultivos enriquecidos en células epiteliales se subcultivaron en microplacas de 96 hoyos y se incubaron durante 24 h para permitir la adhesión. Luego de esas 24 h, el medio se reemplazó por medio fresco conteniendo 1% SFBch. Al día siguiente, el medio fue reemplazado por medio fresco con 1% SFBch y las hormonas cuyo efecto se deseaba evaluar. Los ensayos se realizaron por octuplicado. Las células se incubaron durante 48 h con las soluciones correspondientes, reemplazándose, a las 24 h, el 50% del volumen de cada hoyo por medio de prueba fresco. Durante las últimas 18 h de incubación se aplicó un pulso de ³H-timidina en cada hoyo. Luego los cultivos se tripsinizaron y cosecharon en un cosechador de células de 96 hoyos (Inotech) y la radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo líquido beta (Tri-Carb 2800 TR, Perkin Elmer) durante 2 min.

III. ESTUDIOS DE MICROSCOPIA

Ensayo de Pg-BSA-FITC

- 10% SFB-3%BSA
- Pg-BSA-FITC (Sigma Aldrich) 20µg/ml
- BSA-FITC (Sigma Aldrich) 20µg/ml
- Ioduro de propidio (Sigma Aldrich, stock 1mg/ml) 1:2000

Las células creciendo en cámaras para inmunofluorescencia (IF) (chamber slides, NUNC) fueron arrestadas a 80% de confluencia cultivándolas en ausencia de suero por 48 h. Fueron luego bloqueadas en medio con 10% SFB- 3% BSA en PBS durante 1 h según recomendación del fabricante. Fueron tratadas durante 30 min a 4 °C con Pg-BSA-FITC o BSA-FITC como control en 3% BSA en PBS, lavadas con PBS -4°C y fijadas con formalina por 30 min. En este caso, al utilizarse células vivas, el yoduro de propidio (IP) fue utilizado para teñir las células (1 µg/ml) durante 2 min, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector). Se observaron los preparados al microscopio confocal (Nikon Laser Confocal Microscope).

Inmunofluorescencia

Anticuerpos primarios:

- ERK y pERK (Santa Cruz Biotechnology)
- RP: Ab-7/ hPRa 7 y pSer 190 (Ab-11) (Neomarkers), C-19 (Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpos secundarios:

- IgG anti-ratón fluoresceinado (realizado en caballo, Vector)
- IgG anti-conejo fluoresceinado (realizado en cabra, Vector)
- IgG ZyMax anti-conejo conjugado con CyTM3 (realizado en cabra, Zymed)
- IgG ZyMax anti-ratón conjugado con CyTM3 (realizado en oveja, Zymed)

Las IF se realizaron con células en cultivo. Las mismas fueron crecidas en cámaras para IF y el día anterior a ser utilizadas se cambió el medio de crecimiento por medio con 1% SFBch. En el caso de las células utilizadas para ensayos de ERK el cambio de medio fue a medio solo sin suero y se realizó durante 2 días. Esta diferencia se debe a que encontramos que de esta manera la respuesta de las células al estímulo era mayor. En primer lugar se trató a las células con las hormonas durante el tiempo deseado, se las lavó luego con PBS y se las fijó en formalina 10% durante 30 min a temperatura ambiente o en etanol 70% a 4°C según se indique. Esta última forma de fijación fue utilizada en el caso de la IF realizada utilizando los anticuerpos Ab-7 y Ab-11 para obtener marcación de membrana. Se lavó luego con PBS y se bloqueó con SFB en PBS al 10% durante 1 h a temperatura

ambiente. Luego, se incubó con el primer anticuerpo 1 µg/ml diluido en suero al 5% durante 24 h a 4°C. Se lavó con PBS y se incubó durante 1 h con el segundo anticuerpo en una dilución 1:100 de la solución madre. Se tiñeron los núcleos con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato) (1 µg/ml) o IP (1 µg/ml) durante 2 min, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia. Se observaron los preparados al microscopio confocal.

Ensayo de colocalización por inmunofluorescencia

Anticuerpos primarios:

- Caveolin-1 (N-20) (policlonal, Santa Cruz Biotechnology)
- Ab-7/ hPRa 7 (monoclonal, Neomarkers)

Anticuerpos secundarios:

- IgG anti-ratón fluoresceinado (realizado en caballo, Vector)
- IgG ZyMax anti-conejo conjugado con CyTM3 (realizado en cabra, Zymed)

Las células fueron fijadas en formalina durante 30 min, lavadas con PBS, y bloqueadas 1 h con SFB al 10% en PBS. Luego fueron incubadas con una dilución del anticuerpo anti-caveolina-1 durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrida la hora, se las incubó con el anticuerpo Ab-7 diluido de igual manera toda la noche. Después de 3 lavados con PBS se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente. Se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia y se observaron los preparados en el microscopio confocal.

IV. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Extractos de membrana

Solución tamponada isotónica pH 8.2

- Tris (Tris[hidroximetil]aminometano) USB Corporation 20 mM
- Molibdato de Na (Merck Química) 10 mM
- NaCl (Anedra) 140 mM
- MgCl₂-6H₂O (Sigma Aldrich) 5 mM

Colchón de sacarosa

- Sacarosa (ICN Biomedicals) 41% peso/volumen de buffer isotónico

Solución NaOH 0.1N-Tritón X-100

- NaOH (Anedra) 0,1 N
- Tritón X-100 (Anedra) 0,2% v/v

Solución TRIS-HCL 50mM

- Tris 50 mM

Llevar a pH 7.4 con HCl

Todos las soluciones tamponadas fueron realizadas utilizando agua hexadestilada.

Equipamiento utilizado:

Homogeneizador: Teckmar Tissumizer, Tekmar Company

Centrifuga: Eppendorf Microfuge, Brinkman Instruments

Ultracentrífuga: Combi Plus, Sorvall

Procedimiento para la obtención de los extractos de membrana partiendo de tumores.

Los tumores C4-HI fueron extirpados al alcanzar los 100 mm² y mantenidos en nitrógeno líquido. Para realizar este extracto se utilizó un *pool* de 15 gr de tumor que fue procesado para aislar membranas según la técnica descrita por el grupo del Dr.Sonnenschein y col. con algunas modificaciones (Powell et al., 2001). Todo el protocolo fue realizado a 4°C.

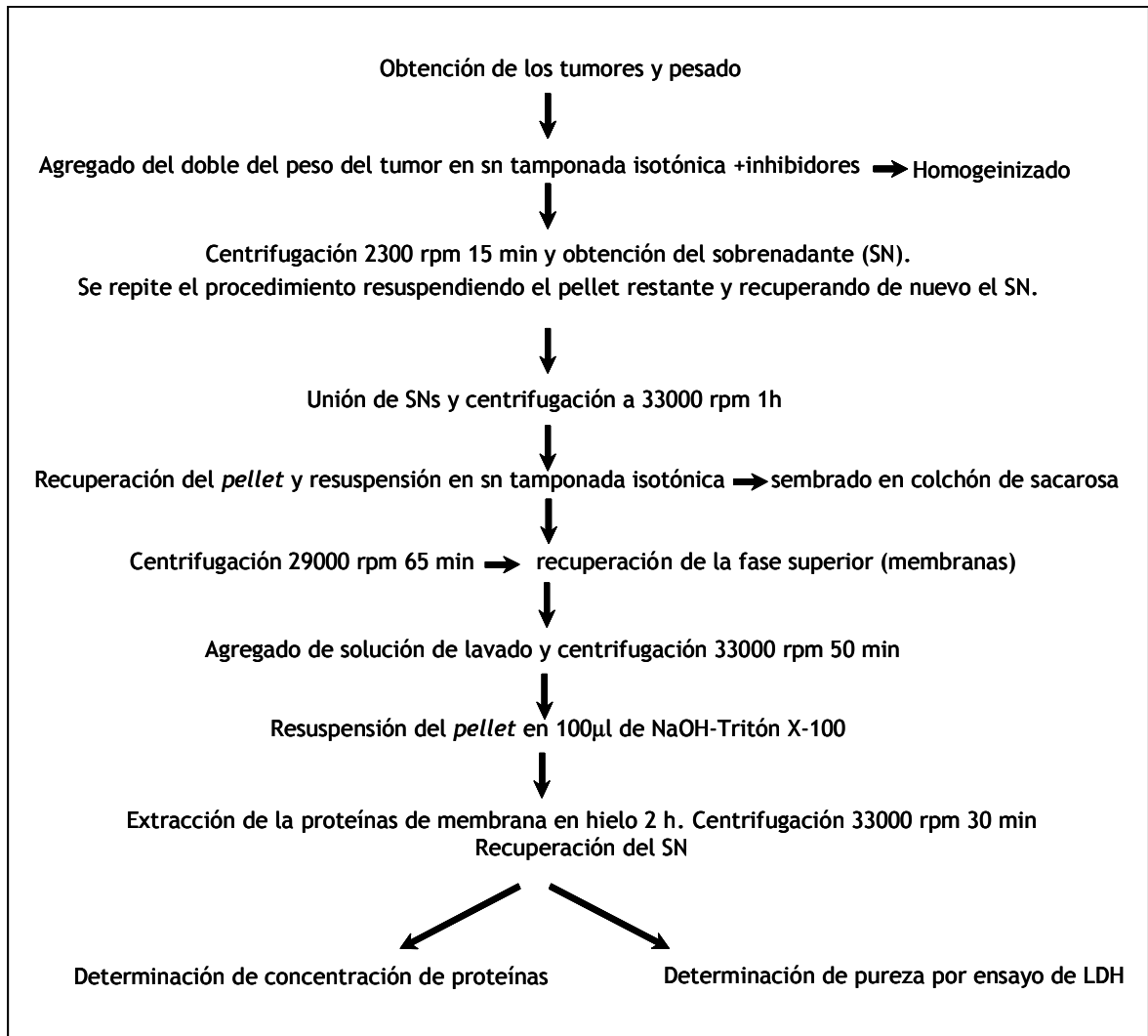


Fig 2.2: Procedimiento para la obtención de un extracto purificado de membrana a partir de tumores.

Procedimiento para la obtención de los extractos de membrana partiendo de células en cultivo.

Este procedimiento se encuentra adaptado del trabajo de la Dra. Kampa (Kampa et al., 2005). Brevemente, para realizar este extracto se utilizaron aproximadamente 20 placas de 100 mm de diámetro en un 90% de confluencia, a las que 24 h antes del ensayo se les retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio de cultivo sin suero. El protocolo fue realizado a 4°C y se encuentra esquematizado en la Fig 2.3.

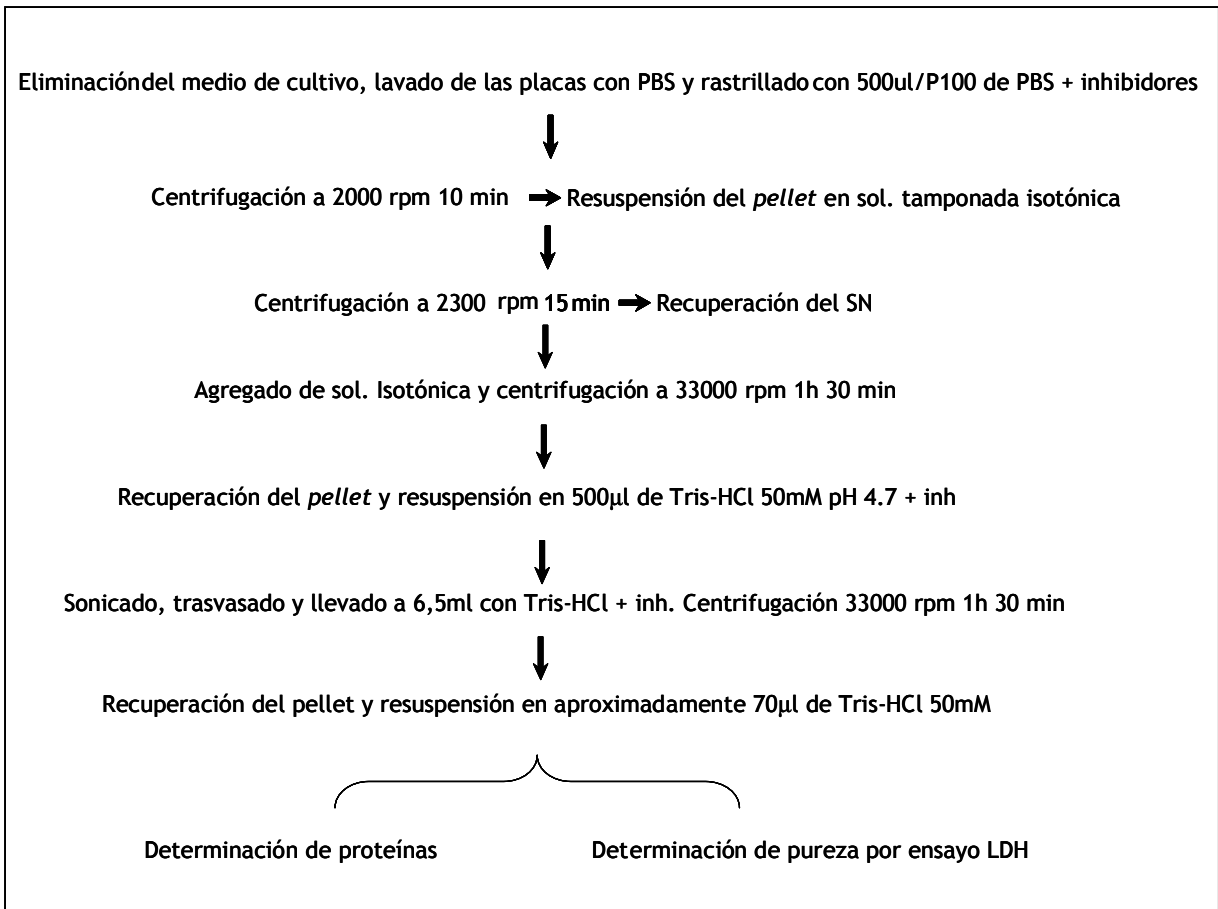


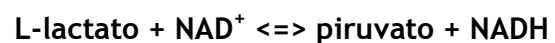
Fig 2.3: Procedimiento para la obtención de un extracto purificado de membrana a partir de células en cultivo.

Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH)

Soluciones:

- Tris-HCl pH 7.3 0,2 M
- NADH (Sigma Aldrich) 6,6 mM
- Piruvato de Sodio (Sigma Aldrich) 30 mM

La conversión de Piruvato en L-lactato se realiza mediante una oxido-reducción NADH dependiente, catalizada por el enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). La reacción catalizada es:



La LDH presenta cinco formas isoenzimáticas con diferente grado de expresión en distintos órganos y/o tejidos. Todas las formas descritas son

citósicas, por lo tanto, el estudio de su actividad nos permitió en este trabajo, determinar la presencia de contaminación con citoplasma en los extractos de membrana.

La actividad de esta enzima se analizó mediante la conversión de piruvato + NADH a L-lactato + NAD⁺. Una disminución en la absorbancia a 340 nm con el tiempo es indicación de la oxidación del NADH. El espectrofotómetro fue calibrado en 340 nm a 25°C y se agregaron a la cubeta 2.8 ml de solución Tris-HCl, 0.1 ml de NADH y 0.1 ml de piruvato de sodio. La cubeta fue colocada en el espectrofotómetro y luego de 4-5 min se alcanzó la temperatura y se estableció el blanco. Para cada determinación se agregó 0.05 ml del extracto y se midió la $\Delta A_{340}/\text{min}$.

Extractos celulares totales

- Solución tamponada comercial *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent* (Pierce)

- Solución tamponada RIPA

Tris pH 7.5	0.01 M
NaCl	0.15 M
Vanadato de Na (Fisher Scientific)	2 mM
SDS	0.1%
NP40 (Sigma Aldrich)	1%
Deoxicolato de Na (Sigma Aldrich)	1%

Todo disuelto en agua destilada, y con inhibidores de proteasas.

- Solución tamponada A:

Tris-HCl (Gibco) pH 7.4	20 mM
EDTA (Sigma)	1.5 mM
Dithiothreitol (Sigma)	0.25 mM
Na ₂ MoO ₄ (Merck)	20 mM
Glicerol (Raudo)	10%

- Inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich; se agregan inmediatamente antes de usar la solución tamponada).

PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)	0,5 mM
---------------------------------------	--------

ZPCK (Z-L-Phechloromethyl ketone)	0,025 mM
TLCK (N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride)	0,025 mM
TPCK (N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)	0,025 mM
TAME (N α -p-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride)	0,025 mM

Procedimiento

Para realizar los extractos totales a partir de células en cultivo, se lavaron las mismas con PBS, y se levantaron con un rastrillo en un volumen no mayor de 100-200 μ l/pocillo de placa de 6 (aprox. 1×10^6 células) con la solución tamponada comercial M-PER. Se agitaron las placas con la solución tamponada durante 5 min a temperatura ambiente. Dado que observamos posteriormente que se obtenía una mayor concentración de proteínas utilizando solución tamponada RIPA, comenzamos a realizar luego los extractos con esta solución. Cuando se utilizó RIPA las células se rastrillaron con las placas colocadas sobre hielo. En ambos casos se centrifugó a 12.000 rpm, 20 min, 4°C. El SN se guardó inmediatamente a -70°C. Los tumores, utilizados como control en los Western blots para extractos de membrana, se realizaron homogeneizando los tumores en solución tamponada de lisis (Solución tamponada A) en una proporción 1:4 p/v. El homogenato se realizó con un homogeneizador (Polytron) a velocidad media con tres veces por 5 seg cada una. Posteriormente, se sonicó a frecuencia media durante 10 seg (dos veces). El homogenato se centrifugó a 12.000 rpm, 30 min, 4°C. El SN se guardó rápidamente a -70°C ó en N₂ líquido para ser usado posteriormente en WB. Paralelamente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

V. WESTERN BLOT

Método de Lowry

Se realizó una curva patrón de albúmina (Sigma Aldrich) con valores en un rango desde 0-80 μ g (por duplicado).

Se diluyó la muestra 3:100 y 5:100 en agua bidestilada. De esta dilución se tomó 100 μ l y se agregaron 0.9 ml de Sc1 y se agitó

Sc1: CuSO₄ 1 %, tartrato de Na₂K 1 % en solución tamponada Na₂CO₃ 2 % / NaOH 1N.

Luego de 10 min se agregó 100 μ l de reactivo de *Folin* (Folin-Ciocalteu, Anedra) diluido a la mitad en agua bidestilada, y se agitó nuevamente. Luego de 30 min se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm (lector de ELISA) y los valores se obtuvieron realizando una extrapolación de los resultados en la curva realizada.

Western Blot

- Acrilamida 30 %

Acrilamida (Gibco, Invitrogen)	29 gr
Bisacrilamida (Gibco, Invitrogen)	1 gr
H ₂ O bidestilada	100 ml

- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris	90.85gr
H ₂ O bidestilada	400 ml

Se llevó a pH con HCl 1:2 y se completó el volumen a 500 ml con H₂O bidestilada

- Tris-HCl 1.0 M pH 6.8

Tris	60.57 gr
H ₂ O bidestilada	400 ml

Se llevó a pH con HCl 1:2 y se completó el volumen a 500 ml con H₂O bidestilada

- SDS 10 %

SDS (Gibco, Invitrogen)	10 gr
H ₂ O bidestilada	100 ml

- Persulfato de amonio 10 %

APS (Gibco, Invitrogen)	1 gr
H ₂ O bidestilada	10 ml

- PBST (PBS-Tween 0.1 %): pH 7.4

NaCl (Sigma Aldrich)	0.8%
KCl (Sigma Aldrich)	0.02%

Na ₂ HPO ₄ (Baker)	0.144%
KH ₂ PO ₄ (Baker)	0.024%
Tween 20 (Anedra)	0.1%

- Solución desnaturizante 3X

SDS (Anedra)	6%
β- mercaptoetanol (Sigma Aldrich)	15% v/v
Glicerol (Raudo)	60%
Tris 0.18 M pH 6.8	0.18 M
Azul de Bromo Fenol (BPB) (Sigma Aldrich)	0.006% p/v

Se diluyó a 1X con la muestra

- Ponceau S

Red Ponceau (Sigma Aldrich)	0.5%
Ác. acético glacial (Merck para análisis)	1%

- Solución tamponada de corrida 10X

Tris	30g
Glicina (BioRad)	144 gr
SDS (Anedra)	10 gr

Se llevó a un litro con agua bidestilada y se diluyó 1/10 en H₂O bidestilada antes de usar.

- Solución tamponada de transferencia

Solución tamponada de corrida 1X	800 ml
Metanol (Merck, para análisis)	200 ml

- Marcadores de peso molecular

Rainbow prestained molecular weight markers (Amersham).

- Membrana de nitrocelulosa:

Hybond c (0.4μm) (Amersham).

- Solución de bloqueo:

Leche descremada 5% en PBST

- Anticuerpos

Monoclonales:

RP: Ab-7 (Receptor de Progesterona Ab-7 (Clon hPRa 7) Anticuerpo de ratón monoclonal, # MS-197-P1ABy, Thermo Scientific)

RP: Ab-11 (Receptor de Progesterona Ab-11 específico Serina¹⁹⁰ (clon 1154), Anticuerpo de ratón monoclonal #MS-1331-P1ABx, Thermo Scientific)

ERK fosforilada: pERK (E-4) sc-7383 (Santa Cruz Biotechnology)

Integrina β 1 (Subunidad beta 1 de VLA (β -1) integrinas, anti ratón realizado en rata(β -1) anticuerpo monoclonal, # MAB 1997, Chemicon International)

β -tubulina (anticuerpo monoclonal anti- β tubulina, clone D66, Sigma)

Ciclina D1 (Ciclina D1/bcl-1 Ab-1, Clon DCS-6, Thermo Scientific)

Policlonales:

RP (C-19): sc-538 (Santa Cruz Biotechnology)

RE α (MC-20): sc-542 (Santa Cruz Biotechnology)

ERK 1: (K-23) sc-94 (Santa Cruz Biotechnology)

FGFR-2: Bek (C-17) sc-122 (Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpos secundarios:

ECLTM Inmunoglobulina anti-ratón, conjugada con peroxidasa de rábano realizado en oveja (Amersham Life Science).

ECLTM Inmunoglobulina anti conejo, conjugada con peroxidasa de rábano obtenido en burro (Amersham Life Science).

- Sustrato quimioluminiscente:
ECL reactivo de detección para WB (Amersham Life Science).
- Película fotográfica:
CURIX RP1 (Medical X-Ray film, Agfa).

Procedimiento

Las muestras (50-100 μg de proteínas totales/calle) se separaron en un gel de poliacrilamida (8% para separar RP y 12% para RE y ERK) usando el sistema de soluciones tamponadas discontinuas de Laemmli (Laemmli, 1970). Además se corrió un conjunto de marcadores de PM en cada gel. Las proteínas se disolvieron en solución desnaturalizante y se hirvieron durante 2-3 min. Se realizó la electroforesis durante 20-30 min a 15 mAmp/ gel hasta que la muestra pasó el gel concentrador y por 60-75 min a 20 mAmp/gel en el gel separador. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 100 V. Las membranas se bloquearon durante 1 h y al terminar el bloqueo, se lavaron varias veces en PBST y luego fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes durante toda la noche a 4°C en agitación. Para RP se utilizó el anticuerpo monoclonal Ab-7/hPRa 7 (Ab7) y el policlonal C-19, en una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1:100), en PBST. El Ab-7 es un anticuerpo comercial que detecta tanto RP-A como RP-B y se obtuvo utilizando RP purificado de carcinoma de endometrio humano como antígeno, se ha demostrado que reacciona con ambas isoformas de RP de ratón (Shyamala et al., 1990). El C-19 es un anticuerpo comercial policlonal obtenido contra el fragmento C-terminal de RP, este anticuerpo utilizado en *western blot*, detecta ambas isoformas de RP (Shyamala et al., 1990; Shyamala et al., 1990). En el caso de RE se utilizó el anticuerpo comercial policlonal MC-20, generado contra un péptido que mapea en el fragmento C-terminal de RE α de ratón; diluido 1/100 en PBST. Cuando se corrieron extractos de membrana, se utilizaron también los anticuerpos integrina β -1, β -tubulina, FGFR-2 (Bek) y ciclina D1 para realizar controles de pureza del extracto. La integrina β -1 y el FGFR-2 fueron utilizados como control de pureza ya que son proteínas principalmente de membrana, la β -tubulina como control de contaminación citoplasmática y ciclina D1 como control de contaminación nuclear. Para las ERKs se utilizaron los anticuerpos ERK-1 (capaz de detectar tanto ERK1 como ERK2 ya que guardan un 83% de homología) y pERK capaces de detectar las MAPK p44 y p42 en su estado basal o activado (fosforilado). Los anticuerpos secundarios se usaron diluidos 1/1000 en PBST. Luego de incubar con el segundo anticuerpo se realizaron dos lavados de 10 min con PBST y un lavado de 10 min con PBS. Para revelar las bandas inmunoreactivas se utilizó el sustrato ECL que al ser modificado por la peroxidasa del segundo anticuerpo da una señal

quimioluminiscente. Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica durante 5 seg a 20 min, dependiendo de la intensidad de la señal observada. Sólo se cuantificó la intensidad de las bandas en los geles donde la proporción de intensidad se mantuvo lineal, es decir que la mancha no estaba saturada. La cuantificación de las imágenes se realizó mediante el programa Image J 1.345 NIH.

VI. DETERMINACION DE AMPc INTRACELULAR

- 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) (Sigma-Aldrich) 0.2 mM
- Forskolina (Sigma Aldrich) 500 nM
- TME-AMPc (Sigma) 30000 cpm/tubo
- Acetato de Sodio 50 mM
- Anhídrido acético-trietilamina 1:2 v/v
- Seroalbúmina bovina (BSA) 2%
- Etanol 96%
- Etanol absoluto

TME-cAMP fue marcado con ^{125}I Na mediante el método de cloramina-T (actividad sp: 600 Ci/mmol) descrito por (Birnbaumer, 1980). El anticuerpo específico para AMPc fue provisto por el Dr. AF Parlow (NIDDK's National Hormone and Pituitary Program). Los métodos para determinar AMPc han sido descritos previamente por el grupo del Dr. Piganataro (Del Punta et al., 1996a). Brevemente, las células cultivadas en placas de 6 pocillos fueron ayunadas por 48 h en presencia de medio más 1% SFBch y tratadas luego con las diferentes hormonas a los tiempos deseados o con forskolina (durante 30 min) como control positivo siempre en presencia de IBMX 0.2 mM. Las placas fueron luego colocadas sobre hielo, el medio fue retirado, y las células levantadas utilizando 0.3 ml/hoyo de etanol absoluto. Los extractos obtenidos fueron sonicados con 2 pulsos de 10 seg cada uno, calentados 5 min a 95°C y centrifugados a 10.000 rpm 5 min. Una vez recuperado el sobrenadante, los tubos fueron colocados en un bloque caliente a 55°C hasta evaporar el alcohol y se les agregó luego 250 µl de agua/tubo. Alícuotas de 100 µl

de los extractos obtenidos fueron transferidas a tubos de plástico, a los que se les agregó una mezcla de anhídrido acético-trietilamina. La acetilación de las muestras aumenta la sensibilidad del método, dado que el AMPc acetilado tiene mayor afinidad por el anticuerpo. Tanto las muestras como los patrones fueron analizados por medio de radioinmunoensayo (RIA) utilizando el protocolo descrito por Steiner y col. (Steiner et al., 1969) con pequeñas modificaciones (Del Punta et al., 1996b). Pasados 5 min de acetilación, se agregó a cada tubo 100 μ l de 125 I-TME-AMPc (30.000 cpm), y 100 μ l de la dilución óptima del anticuerpo (correspondiente a un 40% de unión del nucleótido radiactivo). Las muestras fueron incubadas durante 16 h a 4°C. Finalizada la incubación, se provocó la precipitación del AMPc unido al anticuerpo mediante el agregado de 50 μ l de una solución de BSA (2%) en solución tamponada acetato (50 mM, pH 6,2) y 2 ml de etanol frío (95%), seguido de una centrifugación a 1400 x g durante 15 min. Se aspiraron los SN y la radiactividad del *pellet* se determinó utilizando un contador de centelleo sólido (Packard Auto-Gama, Packard Instrument Co.) El rango de sensibilidad del ensayo fue de 25 a 5000 fmoles de AMPc/tubo (volumen final/tubo: 300 μ l). Las variaciones de los coeficientes de inter- e intra-ensayos fueron menores al 10%.

VII. ENSAYOS DE PCR

RT-PCR

Extracción de ARN

- Tri Reagent (Molecular Research Center Inc) 1ml/p100
- Cloroformo 0.2 ml/ml inicial de trizol
- Isopropanol 500 μ l/tubo
- Etanol 75% 1ml/tubo
- Agua DEPC 33 μ l/tubo

Procedimiento

Las células fueron crecidas hasta un 80% de confluencia cuando fueron arrestadas con medio más 1% SFBch por 24 h. Luego fueron lavadas con PBS estéril,

rastrilladas en presencia del reactivo comercial *Tri Reagent*, colocadas en tubos de 1.5 ml e incubadas 5 min a 30°C. Se agregó luego a cada tubo cloroformo, se los agitó 15 seg, se los incubó a 30°C por 3 min y luego se los centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Después de la centrifugación se recuperó la fase acuosa (superior) obtenida a la que se le agregó isopropanol frío, se incubó 10 min a 30°C y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 10 min. Se recuperó el *pellet* obtenido que fue lavado con etanol 75% centrifugando a 7000 rpm durante 5 min. Se eliminó el SN, el *pellet* se dejó secar, y luego fue resuspendido en agua DEPC. Se mantuvo a 55° C durante 10 min antes de medir la concentración de ARN mediante el fluorómetro Qubit™ Fluorometer (Invitrogen).

Antes de realizar la transcripción reversa, se llevó a cabo el tratamiento con DNAsa de la muestra, para eliminar una posible contaminación del ARN con ADN.

Tratamiento con DNAsa (Promega)

- Buffer de reacción para DNAsa libre de RNAsa 10X (RQ1 RNase-free DNase) 1 µl
- DNAsa (RQ1 RNase-free DNase, 1u/µg ARN) 3 µl
- ARN 1 µl
- Agua DEPC 5 µl

El tubo de reacción se colocó durante 30 min a 37°C. Luego se agregó 1 µl de la solución comercial para detener la reacción (RQ1 DNase Stop Solution) y se lo incubó por 10 min a 65°C. Una vez terminado el tratamiento, se utilizaron 2 µl del mismo para la transcripción reversa.

La transcripción reversa fue realizada utilizando los reactivos comerciales *SuperScript™ First Strand Sintesis System* (Invitrogen Life Technologies) para RT-PCR. Para determinar la ausencia de contaminación con ADN, siempre se incluyó un tubo de reacción que contenía todos los reactivos salvo la polimerasa.

Transcripción reversa

- Cl₂Mg 25mM 4 µl
- Solución tamponada 10X 2 µl

- DNTPs 10mM 2 μ l
- Inhibidor de RNAsa 1 μ l
- SS II (RT polimerasa) 1 μ l
- Hexámeros 5ng/ μ l 1 μ l
- ARN 2 μ l
- Agua DEPC 5 μ l

Luego se realizó la PCR, en la que también se incluyó un control, que poseía todos los reactivos pero no contenía muestra.

PCR

- Taq Polimerasa (Genbiotech) 0.25 μ l
- DNTPs 10mM(Genbiotech) 1 μ l
- Buffer 10X (Genbiotech) 2 μ l
- Cl_2Mg 25nM (Genbiotech) 2 μ l
- Primers 30 μ M 0.25 μ l/cada uno
- Agua 9.25 μ l
- Muestras 5 μ l

Se diseñaron dos pares de *primers* para mRP α , mRP β y mRP γ , la secuencia de los mismos se encuentran detallados en la Tabla 1. Luego mediante ensayos preliminares se determinó qué par de *primers* permitía una mejor amplificación de la secuencia, usándose finalmente para las PCR: mRP α (b) localizado en el exon 2, mRP β (a) localizado en el exon 3, mRP γ (a) ubicado en el exon 8.

	Secuencia <i>primers</i>
mRPα a	sentido 5'-GTGATGCTGCTAGCCAATCC-3' antisentido 5'-TCAGGAGTCCTTCATCTCTGC-3'
mRPα b	sentido 5'-CTTGGCCTCCTTCACCTACC-3' antisentido 5'-GAAGCTGTAATGCCAGAACTCC-3'
mRPβ a	sentido 5'-CTTGCAGGTCAGGAGATTGG-3' antisentido 5'-GATCCGCTTGACATAGTCTGC-3'
mRPβ b	sentido 5'-AGGCACTGTCCGTGATATGG-3' antisentido 5'-GGTTCATGCAGAAGACAGTCC-3'
mRPγ a	sentido 5'-TAAGAAGCTTGCTGCCAAGG-3' antisentido 5'-GAGGCCATCACACCTTATCG-3'
mRPγ b	sentido 5'-CTACATTGGCCACAGTCACC-3' antisentido 5'-GGTCTTGTCAGAAGGATGG-3'
RP	sentido 5'-AAAGGATCCGCAGGTTCTC-3' antisentido 5'-CCAGGGAGATCGGTATAGGC-3'

Tabla 1: Secuencia de *primers* utilizados para las PCR

La reacción se realizó en un ciclador MyGenie96 Thermal Block, BIONEER con los siguientes ciclos:

Ciclo 1 (1X)	95°C	2 min
Ciclo 2 (40X)		
Paso 1 (desnaturalización)	95°C	35 seg
Paso 2 (hibridación)	60°C	45seg
Paso 3 (elongación)	72°C	1 min
Ciclo 3 (1X)	72°C	8 min
Ciclo 4 (1X)	4°C	mantener

Gel de agarosa

- Agarosa (Genbiotech) 2%
- Bromuro de Etidio (Invitrogen) 4 μ l/gel

Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante un equipo analizador de imágenes Syngene.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los experimentos de proliferación celular o de cuantificación de ERKs las diferencias entre tratamientos y el control se compararon usando ANOVA y Dunnet para comparar cada tratamiento vs. control; o bien test de Tukey para comparar todas las muestras. En los experimentos de producción de AMPc las diferencias entre medias de dos tratamientos se evaluaron con una prueba “t” de Student. Cuando eran varios tratamientos también se usó ANOVA. En ambos casos se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc.) La intensidad de las bandas se cuantificó usando el software Image J 1.345 NIH, sólo se cuantificaron exposiciones no saturadas.

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

En las figuras se muestra con asteriscos el grado de significación estadística con respecto al grupo control.

Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces salvo que se especifique lo contrario.

PARTE III



RESULTADOS

I. Respuesta al tratamiento hormonal de los tumores C4-HD y C4-HI.

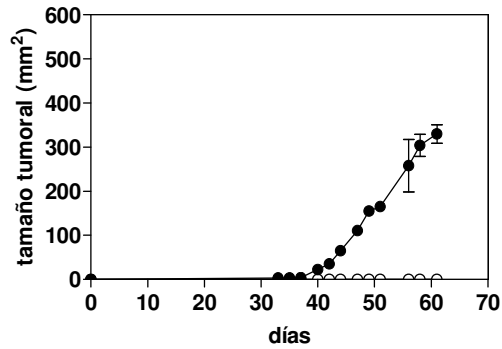
En la figura 3.1 se muestra una curva de crecimiento tumoral clásica representativa del tumor C4-HD y del tumor C4-HI transplantados en ratones BALB/c tratados o no con el progestágeno sintético MPA. Los tumores C4-HD sólo crecen en animales tratados con MPA mientras que los C4-HI crecen en forma similar en animales tratados o no tratados con la hormona y con una velocidad aún mayor que la de los tumores C4-HD tratados con MPA (Montecchia et al., 1999).

Cuando se realizan cultivos primarios de estos tumores se seleccionan por sedimentación diferencial las células epiteliales tumorales. Ambos cultivos crecen *in vitro* de manera similar. El tratamiento con MPA induce un aumento en la incorporación de timidina tritiada y el antiprogestágeno RU-486 inhibe la estimulación inducida por el MPA tanto en C4-HD como en C4-HI (figura 3.1). Estudios de recuento celular confirman los resultados obtenidos mediante técnicas de incorporación de timidina tritiada (Giulianelli et al., 2008) sugiriendo que factores del huésped están involucrados en la activación de RP en tumores de crecimiento HI.

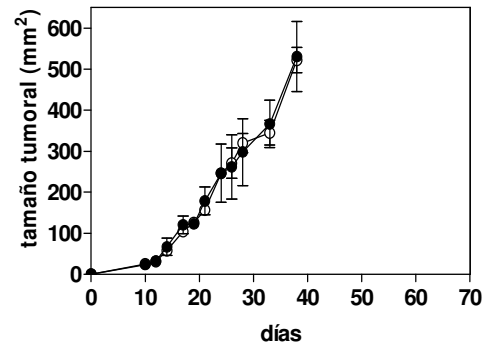
Luego de analizar la fig. 3.1 queda claro que el tumor C4-HI crece *in vivo* en forma similar con MPA y sin MPA, pero *in vitro* el MPA estimula el crecimiento igual que en el tumor C4-HD. El RU-486 en concentraciones 10nM actúa como un antagonista del efecto del MPA en ambos tumores.

In vivo

C4-HD



C4-HI



In vitro

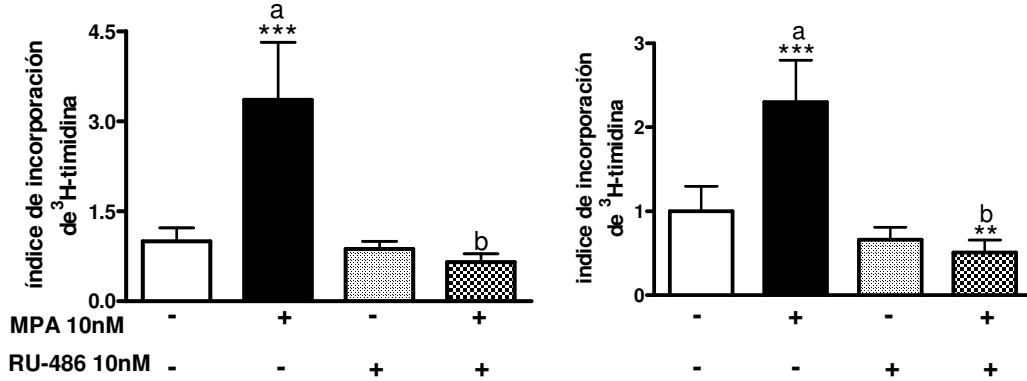


Figura 3.1: Crecimiento de adenocarcinomas mamarios murinos HD y HI *in vivo* e *in vitro*. *In vivo*: Los tumores se transplantaron con trócar en el flanco inguinal derecho de animales inoculados sc en el flanco inguinal izquierdo con un depósito de MPA (20 mg/ratón) (●) y controles (○). El tamaño se midió cada 2 días con un calibre (largo x ancho). En el gráfico se indica la media del tamaño tumoral ± DS. Se muestra una curva representativa de cada tipo de tumor. *In vitro*: Se realizaron cultivos primarios partiendo de ambos tumores. Una vez alcanzado el 80% de confluencia las células fueron repicadas y se realizó un ensayo de incorporación de timidina tritiada. El índice de incorporación de ³H-timidina fue calculado como cpm tratamientos/cpm control. ** p<0.01, *** p<0.001, a vs b p<0.001.

Ambos tumores, C4-HD y C4-HI, expresan las dos isoformas de RE y a su vez las dos isoformas de RP, siendo mayor la expresión de RP-A que de RP-B (Helguero et al., 2003b; Wargon et al., 2008a; Wargon et al., 2008d). *In vitro*, mediante inmunofluorescencia en células quiescentes, se puede observar escasa localización nuclear de RP. El tratamiento tanto con MPA como con RU-486 produce un aumento de la marcación nuclear siendo significativo ya a los 20 minutos (Figura 3.2). Es interesante destacar que ambos, el agonista y el antagonista inducen un efecto similar.

En trabajos anteriores del Laboratorio (Tesis de la Dra. Luisa Helguero), se observó que la estimulación por MPA en cultivos primarios de C4-HD, resulta en una curva de dos pendientes que presenta dos EC₅₀ diferentes, una en el rango fM y la otra en el rango nM (EC₅₀: 1.5 ± 0.7 fM y EC₅₀: 0.33 ± 0.3 nM) indicando que la acción del MPA se podría estar ejerciendo a partir de la unión de la hormona a dos sitios diferentes (Figura 3.3 A) (Helguero et al., 2003a). A su vez, usando extractos de tumores, se pudo observar mediante ensayos de unión al ligando que la unión de la hormona al receptor podía ser desplazada tanto por los agonistas R5020 o MPA como por los antagonistas RU-486 o ZK-299; y que el desplazamiento se daba también en una curva de dos pendientes, indicando dos posibles sitios de unión al ligando (fig 3.3 B). Este resultado pudo ser corroborado por medio de ensayos de *Scatchard*, en los que se encontraron dos sitios de unión a progesterona, el sitio clásico de baja afinidad y alta capacidad (Kd $9,2 \pm 4,2$ nM Q: 376 ± 64 fmoles/ mg proteína) y otro novel de alta afinidad y baja capacidad (Kd 43 ± 9 pM Q: 9 ± 3 fmoles/mg proteína, Figura 3.3 C).

Estos datos se muestran en forma ilustrativa dado que fueron presentados en la Tesis de la Dra. Helguero. Los hemos incorporado a esta presentación porque fueron éstos los resultados que nos llevaron a hipotetizar que el sitio de unión novel encontrado sería también el receptor clásico de Pg, ya que es capaz de unir sus mismos agonistas y antagonistas, pudiendo ser compatible con un receptor de localización en la membrana celular.

FIGURA 3.2

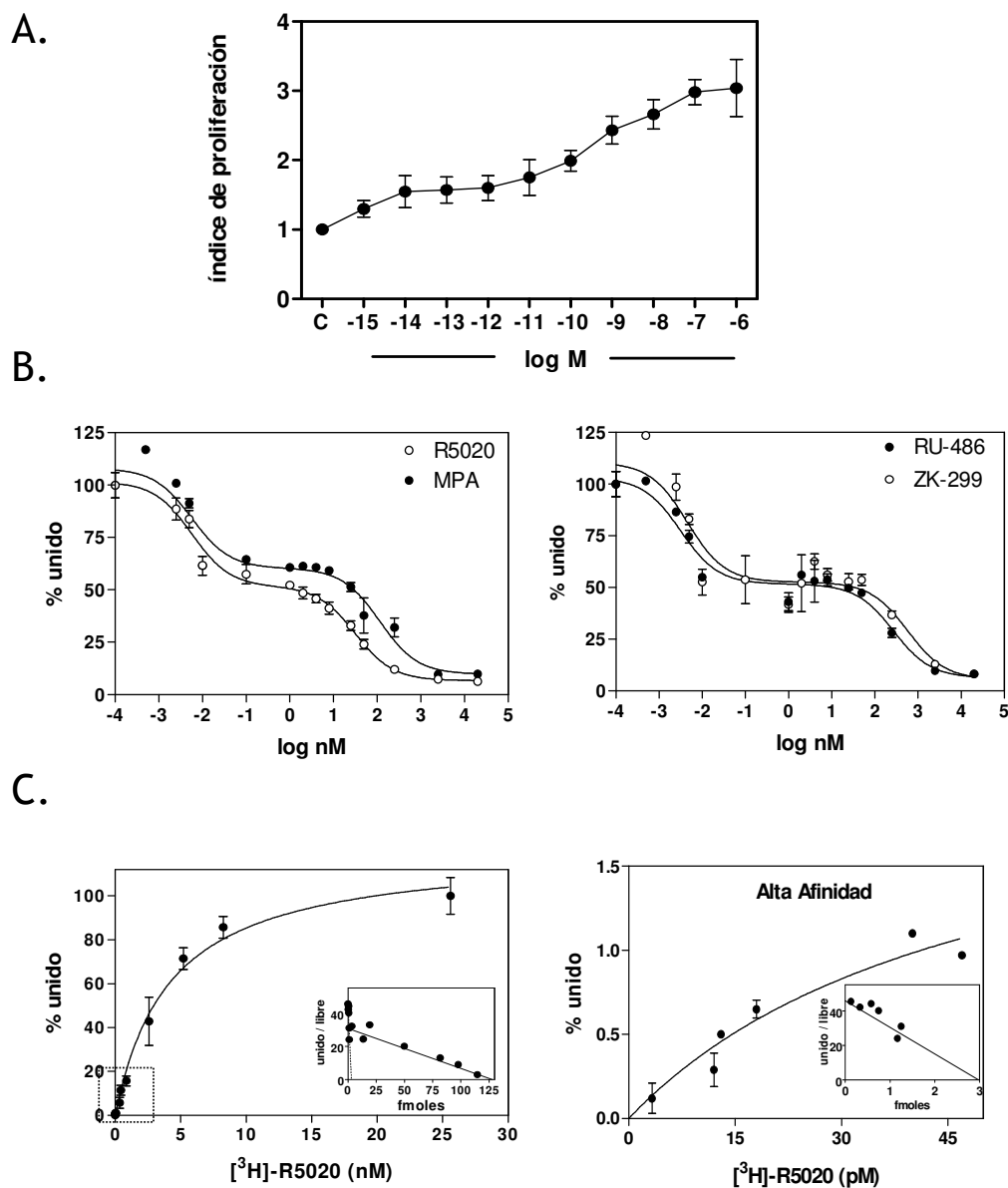


Figura 3.3: Evidencias de la existencia de dos sitios de unión a progestágenos. A. Ensayo de proliferación por incorporación de (^3H)-timidina en cultivos primarios. Los valores se refieren al control y se graficaron como índice de proliferación. Se observa una respuesta proliferativa y bifásica con $\text{EC}_{50} = 1.5 \pm 0.7 \text{ fM}$ y $0.33 \pm 0.3 \text{ nM}$. B. Curvas de desplazamiento. Los extractos celulares totales se incubaron por duplicado con 3 nM (^3H)-R5020 y se desplazó con R5020, MPA, RU-486 o ZK-299 no radiactivas. Se graficó la media \pm DS. C. Curvas de saturación y análisis de *Scatchard*. Los extractos celulares totales se incubaron con concentraciones crecientes de (^3H)-R5020 desde 5 pM hasta 30 nM . El panel izquierdo muestra la curva y análisis incluyendo todos los puntos. El recuadro punteado en la parte inferior izquierda del gráfico está ampliado en el panel de la derecha y representa sólo los puntos correspondientes a bajas concentraciones de (^3H)-R5020. Panel derecho: en esta escala se observa el sitio de mayor afinidad.

II. Presencia del receptor de progesterona clásico en la membrana celular

A. Detección del RP mediante microscopía confocal.

Una de las maneras de estudiar la presencia de un receptor en la membrana celular es la utilización de su ligando acoplado a albúmina sérica bovina (BSA). Al tratar células vivas con este complejo y al ser éste demasiado grande para atravesar la membrana plasmática, sólo es retenido en el caso de que un receptor una al ligando sobre la membrana de la célula. En este trabajo se utilizó Pg acoplada a BSA-isotiocianato de fluoresceína (FITC; Pg-BSA-FITC), lo que permite observar al microscopio confocal fluorescencia verde en caso de encontrar sitios con afinidad a Pg con localización de membrana; como control se utilizó BSA-FITC en las mismas condiciones experimentales. Las células de la línea celular MC4-L5, derivada del tumor C4-HD, fueron tratadas con estos compuestos, fijadas y estudiadas por microscopía confocal. Como se puede ver en la figura 3.4, se obtuvo un puntillado fluorescente verde en la superficie celular, que no fue observado en el control sin Pg. Estos estudios se hicieron usando las líneas celulares ya que con cultivos primarios los experimentos no eran tan limpios.

Este resultado sugiere la presencia de sitios capaces de ligar Pg en la membrana plasmática.

FIGURA 3.4

Para investigar si, estos sitios capaces de unir Pg-BSA-FITC, se trataban de RP clásicos; se hicieron estudios de inmunofluorescencia. Luego de crecer las células, se las arrestó, y se las trató con FGF-2 durante 2 h, tratamiento que demostró ser muy efectivo para la activación del RP (Giulianelli et al., 2008). Luego se las fijó con etanol y se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo comercial desarrollado contra RP, Ab-7. Como se puede ver en la figura 3.5, el tratamiento induce una marcación tanto nuclear como de membrana para RP.

La localización del RP en membrana plasmática puede ser también estudiada mediante la colocación del receptor con una proteína de membrana. Para ello realizamos una inmunofluorescencia doble para RP y caveolina-1. Si bien la fijación con etanol utilizada en los experimentos anteriores fue apropiada para la detección del RP con el Ab-7, no obtuvimos buena marcación de caveolina-1 en estas condiciones experimentales, por lo tanto se usaron células fijadas en formalina. Para realizar este ensayo utilizamos el anticuerpo Ab-7 seguido de un anticuerpo secundario acoplado a FITC para RP, y el anticuerpo contra caveolina-1 seguido de un anticuerpo secundario acoplado a Cy3. En la figura 3.6A, se muestra el resultado obtenido: en verde RP, en rojo caveolina-1. Los puntos amarillos indicados por las flechas muestran una discreta colocación de ambas proteínas en la membrana plasmática. Debajo se muestra en negativo las marcaciones por separado: a la izquierda sólo caveolina-1 y a la derecha sólo RP. Es evidente que con la fijación en formalina se aprecia menos la marca de membrana para RP en comparación a la fijación con etanol observada en la figura 3.5. Utilizando las mismas condiciones experimentales y el mismo anticuerpo para RP, se puede ver que en células de la línea MC4-L5 hay una marcación ocasional de membrana además de la obtenida en el núcleo, y que si las células son permeabilizadas con Tritón X-100 durante el protocolo, se observa más marcación citoplasmática y nuclear (figura 3.6B).

FIGURA 3.5

FIGURA 3.6

Para profundizar en el estudio de la localización del receptor en la membrana, utilizamos el anticuerpo Ab-11, desarrollado por el grupo del Dr. Edwards, contra la serina 190 fosforilada de RP (Clemm et al., 2000). Esta serina se encuentra basalmente fosforilada pero su fosforilación es además inducible por unión al ligando (Clemm et al., 2000). Con este anticuerpo también hemos observado que se obtiene una mejor marcación en células fijadas en etanol que en células fijadas en formalina.

Las células del tumor C4-HI fueron entonces tratadas durante 20 minutos con MPA o con RU-486, ambos en concentraciones de 10nM. Luego, las células fueron fijadas e incubadas con este anticuerpo, y los núcleos fueron teñidos con IP. Como control se utilizaron las células LM3, gentilmente cedidas por la Dra. E. Bal, que no expresan RE ni RP (Bal et al., 1983). En la figura 3.7 podemos observar que el tratamiento de las células con MPA o con RU-486 indujo una marcación tanto nuclear como de membrana. Las células LM3 por su parte, no presentan marcación alguna.

Nuevamente es importante destacar el efecto similar del agonista y del antagonista induciendo la fosforilación del RP de localización nuclear y de membrana.

Los tratamientos fueron también realizados con cultivos primarios del tumor C4-HD. Se repitieron los tiempos de incubación y se pudo observar que los efectos inducidos por el MPA y el RU-486 sobre la fosforilación de la Ser190 del receptor son los mismos que los obtenidos para las células C4-HI (no mostrado).

Un dato curioso es que la utilización del anticuerpo Ab-11 en células del cultivo primario C4-HI produce una marcación muy específica de las células en mitosis. Esto sucedió tanto para los cultivos primarios como para la línea LM3, u otras líneas como por ejemplo la B16-BL de melanoma de ratón (figura 3.8). No poseemos información acerca de cuál pueda ser la razón por la cual ocurra, pero sí resulta específico de este anticuerpo y no depende de la línea celular; sugiriendo que el anticuerpo Ab-11 podría resultar un buen marcador de mitosis.

FIGURA 3.7

FIGURA 3.8

Teniendo en cuenta que este anticuerpo Ab11 no ha sido utilizado en tejidos murinos, quisimos validar el anticuerpo realizando estudios *in vivo* donde sabemos por trabajos previos que el RU-486 induce la regresión del tumor en tiempos muy rápidos. Para ello, animales portadores de tumor fueron tratados por 3, 6, 12 y 24h con RU-486. Como se observa en la figura 3.9, analizando la fosforilación de RP en la Serina 190, tanto por *western blot* (fig 3.9A) como por inmunohistoquímica (fig 3.9B), el RU-486 induce un aumento en la fosforilación de RP *in vivo* a las 6h de tratamiento, la cual disminuye completamente a las 24h. Estos datos sugieren que el RU-486 induce la activación rápida del RP aunque luego el destino del tumor sea la inhibición de la proliferación.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que el RP clásico podría estar localizado en membrana. Además tanto el agonista del RP, MPA, como el antagonista, RU-486, son capaces de inducir la fosforilación de la fosfo-Ser190 de RP detectándola tanto en núcleo como en membrana. Este efecto se observa independientemente que después las células estimulen o inhiban su proliferación.

FIGURA 3.9

B. Detección del RP en extractos de membrana mediante Western Blot

Para confirmar la presencia de RP en la membrana mediante fraccionamiento subcelular, elegimos de todas las técnicas analizadas, la desarrollada por el grupo del Dr. Sonnenschein y col (Powell et al., 2001) que nos pareció la más rigurosa de las evaluadas. Esta técnica fue utilizada para demostrar la presencia de RE α en la membrana de células MCF-7, por lo cual se hicieron las adaptaciones necesarias, ya descritas en materiales y métodos, para utilizarla en tumores.

Para lograr tener un mínimo de 2-5mg de proteínas en el extracto a evaluar tuvimos que partir de 15gr de tumor. O sea al finalizar la purificación obtuvimos 70 μ l que representaban en los distintos experimentos de 2-5mg de proteína. A modo de ejemplo, teniendo en cuenta que cuando se parte de tejidos se posee aproximadamente 150mg proteína/g tejido, utilizando 15gr de tumor tenemos 2250mg de proteína. Esto se procesa en 65ml de solución tamponada, es decir que inicialmente partimos de una concentración de 34,6mg proteínas /ml. Dado que luego del proceso de purificación obtenemos aproximadamente 65-70 μ l de extracto solamente de membranas, que poseen 2,3mg de proteínas, podemos decir que estamos trabajando con un extracto de proteínas de membrana purificado 1000 veces.

Estos extractos fueron analizados por medio de *Western Blot* utilizando dos anticuerpos diferentes, C-19; policlonal, diseñado contra el extremo carboxi-terminal del receptor, y Ab-7, monoclonal, diseñado contra el extremo amino-terminal. Los extractos obtenidos fueron corridos en geles de poliacrilamida junto con extractos totales de tumor como control positivo.

En la figura 3.10A se muestra el resultado obtenido con ambos anticuerpos. En la calle correspondiente al extracto de membrana se observan tres bandas inmunoreactivas: una que corresponde a RP-A de 83 KDa, otra correspondiente a RP-B de 115 KDa, y una tercer banda, que se obtuvo utilizando ambos anticuerpos, de 105 KDa. Este resultado sugiere la presencia del RP clásico en membrana. Cabe destacar que el mismo extracto fue corrido y revelado con uno u otro anticuerpo. Además de los anticuerpos mencionados, utilizamos también el anticuerpo Ab11 que reconoce específicamente la ser190 fosforilada del RP. Como se observa en la fig 3.10B, pudimos detectar también las bandas correspondientes a ambas isoformas

del RP. En este caso se utilizaron extractos diferentes a los utilizados en la Fig. 3.10A y, como control negativo, no se incubó con el anticuerpo primario sino que se utilizó el segundo anticuerpo solamente, sin observarse bandas en estas condiciones experimentales.

Dado que la localización de RE α en membrana fue descrita anteriormente por varios autores (Razandi et al., 1999; Chambliss et al., 2000) decidimos investigar también la presencia de este receptor en la fracción de membrana obtenida. La figura 3.10C muestra que RE α (66 KDa) se encuentra presente en el extracto de membrana.

Con el fin de realizar controles de purificación del extracto de membrana utilizamos 2 proteínas ampliamente expresadas en membrana como integrina β -1 y el receptor de FGF-2 que, por trabajos de otros miembros de nuestro laboratorio, sabemos que se pueden encontrar en extractos totales de nuestros tumores y en la membrana celular por técnicas de inmunofluorescencia. Como puede observarse en la figura 3.10C, en las condiciones experimentales utilizadas, la banda obtenida en la fracción de membrana es fuerte, mientras que la señal es muy débil cuando se trata de la fracción total. Este hecho nos indica que este extracto se encuentra enriquecido en membranas celulares. El RP puede tener localización citoplasmática además de la nuclear, por lo tanto una contaminación de estos extractos con citoplasma o bien con núcleos podría generar falsos resultados. Técnicamente por el tipo de metodología utilizada, es más probable una contaminación con proteínas citosólicas que con proteínas nucleares. Igualmente, para asegurarnos que las bandas de RP observadas no se deben a una contaminación de citosol o núcleos, los extractos fueron sometidos a varios controles de pureza.

El control de contaminación citoplasmática se realizó mediante dos técnicas diferentes: por medio de WB utilizando un anticuerpo contra β -tubulina, y mediante un ensayo de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La β -tubulina es una proteína citoplasmática y, como se puede ver en la figura 3.10D, al correr junto con el extracto de membrana uno nuclear y otro citoplasmático, la banda inmunoreactiva correspondiente a β -tubulina sólo fue detectada en la fracción citoplasmática. La LDH es una enzima capaz de interconvertir Piruvato en L-lactato,

mediante una oxido-reducción NADH dependiente presente en el citoplasma celular. Como se puede observar en la figura 3.10E, no se detectó actividad enzimática en el *pellet* de la extracción, siendo ésta la fracción que fue utilizada para los *western blots*. Sin embargo, sí se detectó actividad de esta enzima en el sobrenadante, que fue descartado.

La ausencia de contaminación nuclear se analizó mediante *western blot* revelando con un anticuerpo contra la proteína ciclina D-1. Esta es una proteína esencial en la regulación del ciclo celular y se localiza principalmente en el núcleo. Como se observa en la Fig 3.10D, no se observó una banda inmunoreactiva en la fracción de membrana a la altura del PM de la ciclina D1.

El mismo estudio fue también realizado con extractos de membrana obtenidos a partir de cultivos primarios de los tumores C4-HI y de las líneas celulares MC4-L2 y MC4-L5. Para poder realizar los extractos partiendo de células en cultivo, tuvimos que modificar la metodología de extracción, según se explica en materiales y métodos. En la figura 3.11A se puede ver que, trabajando con los mismos anticuerpos, también se detectaron ambas isoformas de RP, al igual que la banda inmunoreactiva de 105 KDa y, como puede observarse en la Fig. 3.11B, no se observa contaminación citosólica evaluada por la técnica de LDH.

Resumiendo, los estudios de microscopía confocal sugerían la presencia de RP clásicos en la membrana celular capaces de ligar Pg unida a BSA. Estos resultados de *Western blot* corroboran los anteriores y además confirman que son ambas las isoformas de RP detectables en la membrana celular. Si bien hay algunas bandas comunes que se detectan con los distintos anticuerpos sugiriendo también la presencia de formas con otros PM, no fue el objetivo de este trabajo su caracterización.

FIGURA 3.10

FIGURA 3.11

III. Presencia de los receptores n6veles de progesterona (mRP) en la membrana celular

Mientras nos encontr6bamos estudiando la presencia del RP cl6sico en la membrana celular, el grupo del Dr. Thomas clon6 y caracteriz6 en la membrana de la trucha de mar tres receptores del tipo de siete pasos transmembrana a los que denominaron mRP α , mRP β y mRP γ (Zhu et al., 2003b). Posteriormente se vio que estos receptores se encontraban tambi6n en mam6feros como cerdo, rat6n y humano. Los receptores transmembrana no comparten ninguna caracter6stica estructural con el receptor cl6sico de Pg, son capaces de unir Pg, no hay informaci6n acerca del MPA, y no presentan afinidad por el antiprogest6geno RU-486 (Zhu et al., 2003a; Thomas et al., 2007).

Cuando iniciamos el estudio de estos receptores, no se conoc6a la presencia de los mismos en mama. Posteriormente se publicaron trabajos que demostraban que se encuentran presentes en las l6neas celulares de c6ncer de mama MCF-7 y SK-BR-3 (Dressing and Thomas, 2007). Al no existir un anticuerpo comercial contra los mismos, llevamos adelante el estudio analizando la expresi6n del ARNm. Si bien hemos estudiado la expresi6n del ARNm mediante PCR en Tiempo Real y RT-PCR, en mi tesis s6lo incluir6 los resultados obtenidos por RT-PCR ya que los primeros fueron llevados a cabo durante una pasant6a en el laboratorio del Dr. SG Gutkind y no estamos focalizados en la realizaci6n de estudios cuantitativos comparativos por el momento. Dise6amos con la ayuda del Dr. Amornphimoltham 2 pares de primers para cada receptor, extrajimos ARN de cultivos celulares y realizamos las correspondientes reacciones.

Para realizar los estudios RT-PCR, hicimos extracciones de ARN a partir de la l6nea celular MC4-L2 y de cultivos primarios de tumores C4-HD y C4-HI. Adem6s seleccionamos los pares de *primers* que nos permit6an una mejor amplificaci6n del ADNc. Como podemos observar en las figuras 3.12 y 3.13, las c6lulas de los cultivos primarios y de la l6nea celular expresan los tres receptores n6veles de RP, adem6s del RP cl6sico. Las bandas visibles en la parte inferior de los geles corresponden a los *primers*. La β -actina se utiliz6 como control interno y se observa a t6tulo

ilustrativo graficada la relativización de la intensidad de las bandas respecto a la β -actina. Mientras la línea celular expresa altos niveles de mPR α , los cultivos primarios presentan mayormente las formas β y γ . Al igual que en los casos anteriormente mencionados, desconocemos aún el rol que estarían cumpliendo.

Los estudios utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real en muestras de dos líneas celulares, MC4-L2 y MC4-L5 también revelaron la expresión de los tres receptores transmembrana. En este caso se utilizó como control positivo ARN de testículo de ratón, órgano en el que se encontraba descrita la presencia de esos receptores (Zhu et al., 2003a) y se incluyó también la línea celular 293T, de riñón embrionario humano, que demostró no expresar estos receptores, pudiéndose utilizar como control negativo.

Estos resultados demuestran que en los carcinomas mamarios de este modelo experimental se expresan al menos dos tipos de RP en la membrana. Uno de ellos sería el receptor clásico, que estaría presentando una localización novel, y el otro sería el del tipo de siete pasos transmembrana recientemente descrito, cuya función no se conoce.

FIGURA 3.12

FIGURA 3.13

IV. Efectos no-genómicos inducidos por MPA y RU-486

Teniendo en cuenta que estos carcinomas mamarios presentarían distintos tipos de proteínas capaces de ligar Pg en su membrana, y además que se ha descrito que los receptores nódulos, mRP, no tienen afinidad por RU-486 (Dressing and Thomas, 2007) ni por MPA (comunicación personal Dr. Thomas) quisimos explorar los efectos rápidos, no genómicos, inducidos por MPA y por RU-486 en estas células en cultivo.

Elegimos dos vías paradigmáticas de señalización intracelular como la activación de MAPK y la regulación de los niveles de AMPc. La vía de MAPK es regulada por estrógenos (Zhang et al., 2002), andrógenos (Kousteni et al., 2001) y progestágenos (Balana et al., 1999; Qiu et al., 2003; Balana et al., 1999; Balana et al., 1999), mientras que la señalización por AMPc se asocia a receptores acoplados a proteínas G (Lameh et al., 1990). Más aún, se ha descrito que los mPR en presencia de Pg inducen una disminución del AMPc (Zhu et al., 2003a).

A. Efectos de MPA y RU-486 sobre la vía de ERK1-2 (MAPK p44 y p42)

Utilizando células de cultivos primarios CC4-HD estudiamos la posible regulación de la vía de ERK inducida por MPA mediante inmunofluorescencia y western blot.

Para realizar la técnica de inmunofluorescencia, luego de 48 h de ayuno, tratamos a las células sembradas en cámaras para inmunofluorescencia durante 1 a 10 min con MPA 0.01nM y MPA 10nM. Luego del tratamiento, las células fueron fijadas y se realizó la técnica con un anticuerpo para ERK totales (ERK1, capaz de detectar tanto ERK1 como ERK2 ya que guardan un 83% de homología) como para fosfo-ERK (fosfo-ERK). Los resultados obtenidos para ERK totales no mostraron variación alguna (no se muestran). En la figura 3.14 se observa que ambas concentraciones de MPA indujeron un aumento en la fosforilación de ERK.

Dado que a nivel nuclear el RU-486 es un antagonista de RP, decidimos estudiar su efecto a tiempos cortos de tratamiento, esperando obtener resultados inversos a los obtenidos con MPA. Sin embargo, como se observa en la figura 3.15, el tratamiento con el antagonista a una concentración 10nM también indujo un aumento en la fosforilación de ERK. Este aumento es visible también en tratamientos con ambas hormonas (fig 3.16).

FIGURA 3.14

FIGURA 3.15 Y 3.16

Luego decidimos estudiar si los mismos efectos eran obtenidos utilizando células de un cultivo primario del tumor C4-HI. Como se observa en la figura 3.17, tanto el MPA en las dos concentraciones estudiadas, como el RU-486, inducen un aumento en la marca, similar al obtenido con células CC4-HD.

Estudiamos también la activación de ERK mediante *western blot* con células del cultivo CC4-HD y C4-HI. Hicimos los experimentos utilizando tiempos desde 1 min hasta 20 min resultando 5 min el tiempo óptimo para observar activación de ERK por medio de *western blot*. Los resultados obtenidos eran poco reproducibles, en algunas ocasiones los aumentos se notaban en tiempos más tempranos y otras en tiempos más tardíos. En general también se observaba dispersión dentro de los controles. Fuimos variando las condiciones experimentales hasta ayunar a las células durante 48 h con medio sólo antes de cambiar los medios con las soluciones problema. Cabe destacar que para los experimentos de *western blot* se realizaron al menos 15 experimentos diferentes con extractos diferentes de las cuales sólo se consideraron para su análisis aquellas en las cuales se observó una baja fosforilación basal de ERK pareja entre los tres replicados.

En la figura 3.18 se muestra el incremento en la fosforilación de ERK inducida tanto por el agonista MPA como por el antagonista RU-486, siendo ERK2 la quinasa que parecería estar más involucrada. El gráfico mostrado es la cuantificación de la intensidad de la banda obtenida para fosfo-ERK1 (44KDa) o fosfo-ERK2 (42 KDa) en relación a la cantidad total de ERK1 y ERK2 respectivamente, de 5 experimentos. Independientemente de la heterogeneidad, el RU-486 indujo un efecto similar al MPA.

Estos resultados en su conjunto sugieren que ambos compuestos, MPA y RU-486, inducen un aumento temprano de activación de ERK. Dada la dificultad obtenida para lograr estos resultados y la dispersión de datos no nos parece apropiado aseverar el tiempo óptimo en que ocurre esta activación. Más allá de esta dispersión, los efectos similares ejercidos por agonista y antagonista fueron sin embargo, constantes intra-experimento.

FIGURA 3.17

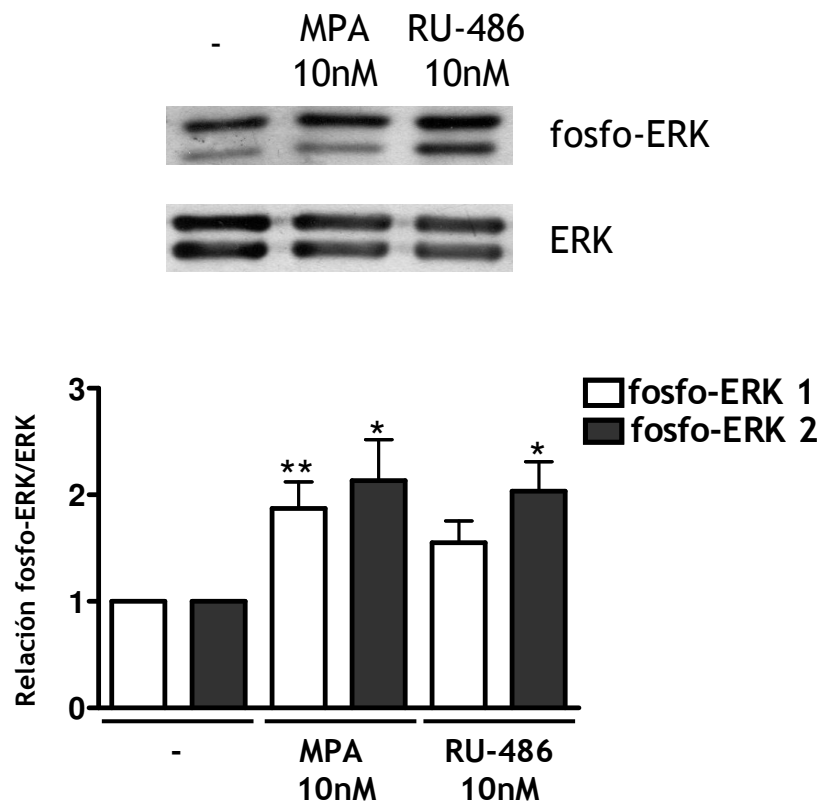


Figura 3.18: Activación de ERK en cultivos primarios del tumor C4-HI. Se realizaron cultivos primarios C4-HI, cuando alcanzaron un 80% de confluencia se ayunaron las células durante 48 h con medio sin adición de suero. Se trataron luego durante 5 min con medio, MPA 10nM o RU-486 10nM. Se obtuvieron los extractos protéicos que fueron estudiados mediante *Western Blot*. Se sembraron 50 µg de proteína por calle, cuantificadas mediante la técnica de Lowry. Las bandas obtenidas fueron densitometradas y cada ERK fosforilada fue relativizada a la proteína total correspondiente. El gráfico muestra los resultados de 5 experimentos. * p<0.05; ** p<0.01. Se observa un aumento de la fosforilación de ERK inducido tanto por MPA como por RU-486.11

B. Efectos de MPA y RU-486 sobre la vía de AMPc

Para estudiar el efecto de los mismos tratamientos anteriores sobre la vía de AMPc, las células de un cultivo primario del tumor CC4-HD fueron tratadas a diferentes tiempos ambos compuestos y se realizó el ensayo mencionado utilizando como control positivo un tratamiento con forskolina.

En la figura 3.19 se observa que, ya al minuto de tratamiento, el MPA es capaz de inducir un aumento en los niveles de AMPc intracelular, efecto que se produce también a los 3 y 10 minutos. A su vez, el antagonista RU-486 es capaz de producir un aumento en los niveles de AMPc similares a los inducidos por el agonista, aunque si bien el aumento es estadísticamente significativo, es leve. Más aún, el tratamiento con RU-486 10nM fue incapaz de antagonizar el efecto inducido por MPA, dado que el aumento observado fue aún mayor. Estos efectos estimulatorios no resultaron tan fuertes como el inducido por forskolina, ya que el efecto más alto obtenido en presencia de MPA fue de aproximadamente un 40% comparado con el generado por forskolina.

Dado que si estuvieran comprometidos los receptores nóveles mediando la acción del MPA y el RU-486 se tendría que haber observado una disminución en los niveles de AMPc intracelular, y nuestros resultados sugieren que ambos, MPA y RU-486, inducen un aumento; suponemos la intervención del RP clásico en estos fenómenos.

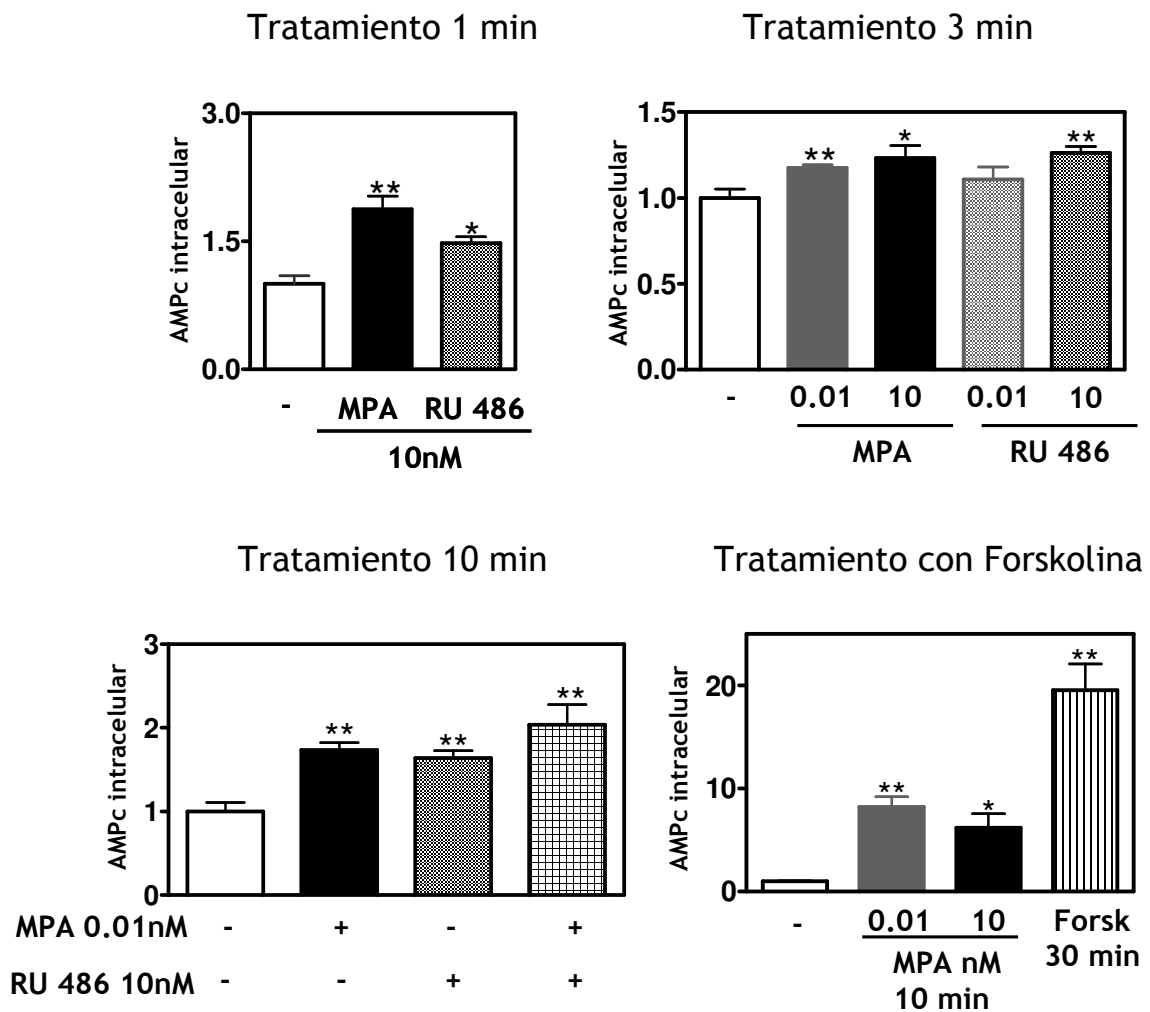


Figura 3.19: Variación en los niveles de AMPc en cultivos primarios del tumor CC4-HD. Se realizaron cultivos primarios de CC4-HD, cuando alcanzaron un 80% de confluencia se ayunaron las células durante 24 h con medio 1% SFBch. Se trataron luego durante los tiempos indicados con medio, MPA 0.01nM, MPA 10nM, RU-486 0.01nM, RU-486 10nM, o MPA 10nM + RU-486nM. Se obtuvieron los extractos celulares, se realizó un ensayo de RIA para AMPc y se contó la radiactividad en un contador gama. Como control positivo se trató a las células con forskolina 500nM durante 30 min. EL AMPc intracelular se calculó por millón de células y se relativizaron los valores obtenidos al valor del tratamiento control. En la figura se observa que el tratamiento de las células tanto con el progestágeno como con el antiprogestágeno induce un aumento de la producción de AMPc intracelular. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

V. Efecto del RU-486 sobre la proliferación celular

El tratamiento de un cultivo primario de células tumorales de este modelo con RU-486 a una concentración de 10nM produce una inhibición de la proliferación celular funcionando como antagonista de RP (ya descrito en la figura 3.1) o bien, si las cpm basales son muy bajas no produce cambios. Sin embargo en los estudios realizados sobre activación de vías de transducción de señales hemos observado una actividad similar a la obtenida con el agonista MPA. Es por esa razón que decidimos analizar el efecto biológico que podría tener el uso de concentraciones menores a 10nM de RU-486, estudiándolo por medio de ensayos de proliferación celular. Nuestra hipótesis es que, a concentraciones menores que el Kd del receptor, el antagonista no podría interferir con la acción genómica del mismo, sino que estaría funcionando solamente mediante el RP acoplado a la membrana plasmática. Por lo tanto, si sólo activa MAPK sin ejercer luego el efecto genómico, se debería observar una estimulación de la proliferación celular.

En la figura 3.20 se muestra el resultado obtenido al realizar curvas de incorporación de timidina tritiada utilizando concentraciones de RU-486 desde 10^{-15} M hasta 10^{-7} M. Como se observa en la figura, concentraciones del antagonista menores a 10^{-8} M son capaces de inducir la proliferación celular, mientras que las concentraciones mayores son inhibitorias. Cabe destacar que este resultado no se observa siempre. El cultivo debe estar muy puro y con bajo número de células para que se pueda registrar esta sensibilidad al RU-486.

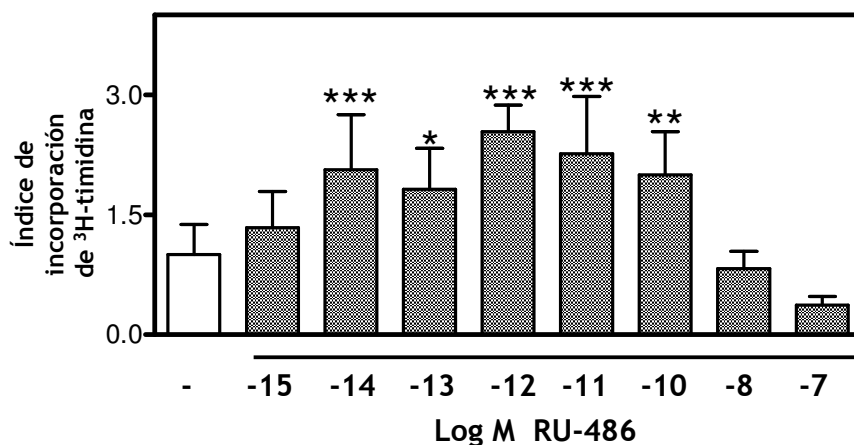


Figura 3.20: Ensayos de proliferación por incorporación de ³H-timidina en cultivos primarios del tumor C4-HI. Se realizaron cultivos primarios C4-HI, se arrestarton las células con medio 1% SFBch durante 24 h. Se trataron durante 48 h con concentraciones crecientes de RU-486 y luego de las primeras 24 h de tratamiento se refrescó el medio y se les dio un pulso de ³H-timidina. Al final del ensayo de proliferación se descartó el medio, se cosecharon las células y la radiactividad se midió en un contador beta. Esta figura demuestra que las concentraciones menores a 10nM de RU-486 inducen un aumento en la proliferación celular. * p<0.05; ** p<0.01, ***p<0.001.

Al combinar el MPA con el RU-486 0.01nM en el tratamiento, no sólo no resultó inhibitorio sino que además se obtuvo en algunos casos, una mayor proliferación celular que utilizando sólo el progestágeno (fig 3.21, panel izquierdo). En presencia de MPA y RU-486 10nM si se observó el antagonismo esperado ya reportado (fig 3.21, panel derecho).

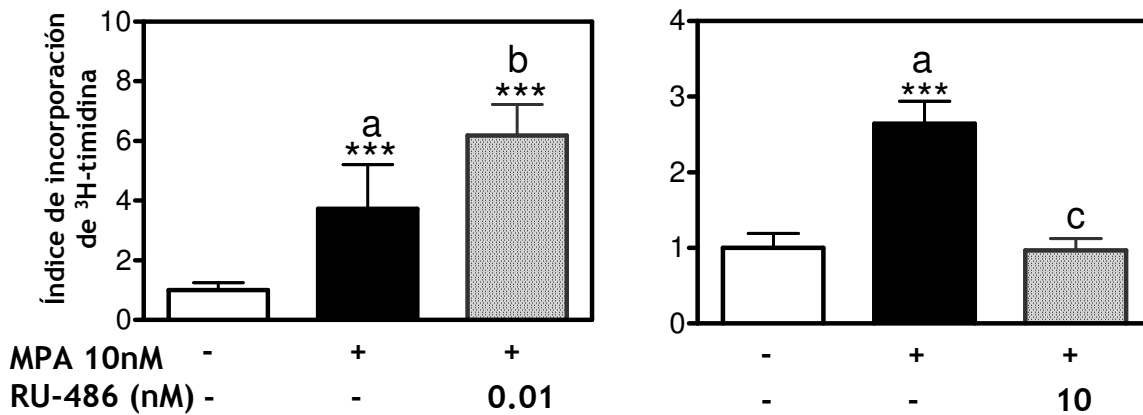


Figura 3.21: Ensayos de proliferación por incorporación de ³H-timidina en cultivos primarios del tumor C4-HI. Se realizaron cultivos primarios C4-HI, se arrestartaron las células con medio 1% SFBch durante 24 h. Se trataron durante 48 h con MPA y/o RU-486 en las concentraciones indicadas y luego de las primeras 24 h de tratamiento se refrescó el medio y se les dio un pulso de ³H-timidina. Al final del ensayo de proliferación se descartó el medio, se cosecharon las células y la radiactividad se midió en un contador beta. Los gráficos muestran que el co-tratamiento con MPA 10nM y RU-486 puede resultar en un efecto inhibitorio o estimulador dependiendo de las concentraciones del antagonista. ***p<0.001, a vs b p <0.01, a vs c p<0.001

VI. Efectos inducidos por el tratamiento con un antiprogestágeno novel (ZK 230 211) y Pg.

A. Efectos inducidos por ZK 230 211 sobre la proliferación celular.

Dado que el MPA además de tener efectos progestacionales posee efectos glucocorticoides y androgénicos; surgió la duda de si los resultados obtenidos se debían únicamente al efecto progestacional.

Por otra parte, si bien son conocidos los efectos antiglucocorticoides del RU-486, se ha descrito anteriormente que en células T47Dco (una sublínea de T47D que sintetiza altos niveles de RP fisicoquímica y estructuralmente similar al de oviducto de pollo) el RU-486 10nM es incapaz de unirse al RG (Horwitz, 1985). Por lo tanto, en este trabajo de tesis el RU-486 fue usado en esa concentración de manera de evitar efectos mediados por el RG.

Sin embargo, para confirmar la procedencia del efecto observado, decidimos utilizar otro antagonista del RP con escasa actividad antiglucocorticoide, el ZK 230 211 (ZK-211; (Chwalisz et al., 2000). Anteriormente se había utilizado en el laboratorio el ZK98 299 u onapristona, que presentaba menos afinidad por el RGc que el RU-486, obteniéndose resultados idénticos; pero la producción de este compuesto fue discontinuada.

Contando entonces con este nuevo antiprogestágeno, decidimos realizar ensayos de proliferación en los que se hicieron tratamientos con MPA 10nM, y MPA 10nM combinado con RU-486 10nM o ZK-211 10nM según se muestra en la figura 3.22. Los antiprogestágenos fueron usados a concentraciones de 10nM porque aún en estas bajas concentraciones ejercen efecto antiprogestacional. Como se ve en la figura 3.22, el tratamiento, tanto de los cultivos C4-HD como C4-HI, con RU-486 10nM, disminuye significativamente la proliferación celular inducida por MPA. El tratamiento combinado con ZK-211 10nM tiene efectos similares a los ya descritos con el RU-486 y ZK-299. Ante estos resultados, consideramos que el MPA estaría ejerciendo su actividad estimuladora a través de RP.

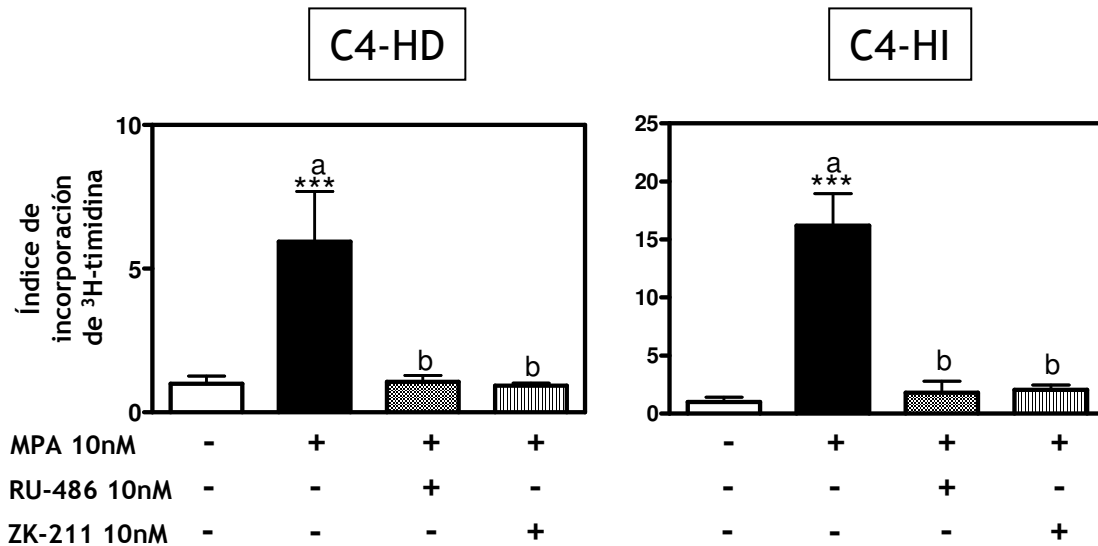


Figura 3.22: Ensayos de proliferación por incorporación de ^3H timidina en cultivos primarios de los tumores C4-HD y C4-HI. Se realizaron cultivos primarios C4-HD y C4-HI, se arrestartaron las células con medio 1% SFBch durante 24 h. Se trataron durante 48 h con MPA 10nM, RU-486 10nM y ZK-211 10nM en las combinaciones indicadas y luego de las primeras 24 h de tratamiento se les dio un pulso de ^3H -timidina. Al final del ensayo de proliferación el medio fue descartado, las células fueron cosechadas y la radiactividad se midió en un contador beta. Los gráficos muestran que el MPA 10nM tiene un efecto estimulador mediado por RP ya que se inhibe al co-incubar con RU-486 y con el antagonista específico de RP, ZK-211. *** $p < 0.001$, a vs b $p < 0.001$.

El hecho de que los 2 antiprogestágenos que tienen actividad pura en concentración 10nM (ZK-211 y ZK-299) inhiben completamente la estimulación inducida por MPA sugiere que el RP es el receptor involucrado en estos efectos.

B. Efectos inducidos por Pg

Si bien elegimos realizar los estudios con MPA porque es el agente progestacional usado en este modelo y además para no interferir con los receptores n6veles de 7 pasos transmembrana, fue necesario elegir algunos de los experimentos anteriores y validarlos utilizando la Pg en lugar de MPA. Si el tratamiento con Pg era capaz de producir marcaci3n de membrana para RP y de activar v1as no gen6micas de manera similar a la generada por MPA, entonces ser1a el RP cl1sico el involucrado.

En los estudios por inmunofluorescencia utilizamos el anticuerpo Ab-11 anteriormente descrito. Como se observa en la figura 3.23, el tratamiento de las c3lulas de un cultivo primario del tumor C4-HI con Pg 10nM durante 20 min induce un aumento en la marcaci3n para RP tanto nuclear como de membrana. Lo mismo pudo ser observado cuando se utilizaron c3lulas de un cultivo primario del tumor C4-HD (no se muestra).

En lo que respecta a efectos no gen6micos, el tratamiento de las c3lulas de un cultivo primario C4-HI con Pg 0.01nM o Pg 10nM es capaz de inducir un aumento en la fosforilaci3n de ERK, visible mediante inmunofluorescencia. Este aumento no se reduce en presencia de RU-486 (figura 3.24). El mismo resultado se obtuvo por *western blot*. En la figura 3.25 se observa el aumento de fosforilaci3n de ERK inducido por Pg 10 nM, que se mantiene en presencia de RU-486 10 nM.

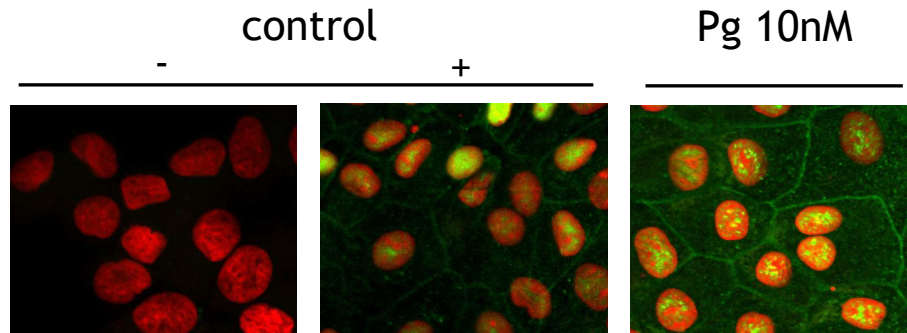


Figura 3.23: Detección de RP en células de un cultivo primario de C4-HI tratadas con Pg. Se realizó un cultivo primario a partir del tumor C4-HI y una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia se las ayunó durante 24 h con 1% SFBch. Luego se las incubó durante 20 min con medio solamente o con Pg 10nM y se las fijó con etanol 70%. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo Ab-11 para detectar la fosfo-Ser190 de RP y un anticuerpo secundario unido a FITC. Los núcleos fueron teñidos con IP. Barra: 10 μ m

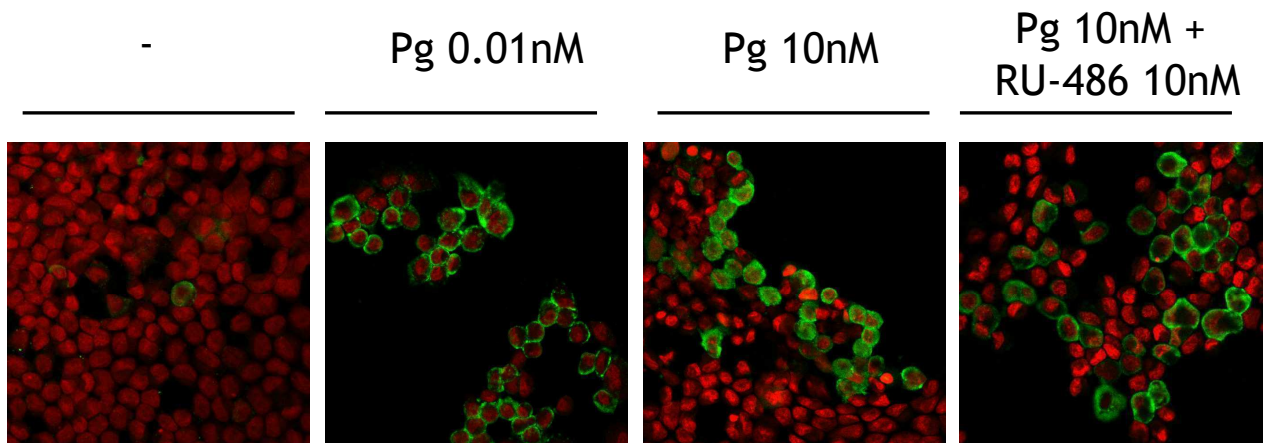


Figura 3.24: Activación de ERK inducida por Pg en cultivos primarios del tumor C4-HI. Se realizaron cultivos primarios C4-HI, cuando alcanzaron un 80% de confluencia se ayunaron las células durante 24 h con medio sin suero. Se trataron luego durante 5 min con medio, Pg 0.01nM, Pg 10nM o Pg 10nM+RU-486 10nM. Luego se realizó una inmunofluorescencia para fosfo-ERK utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC y los núcleos se tiñeron con IP.

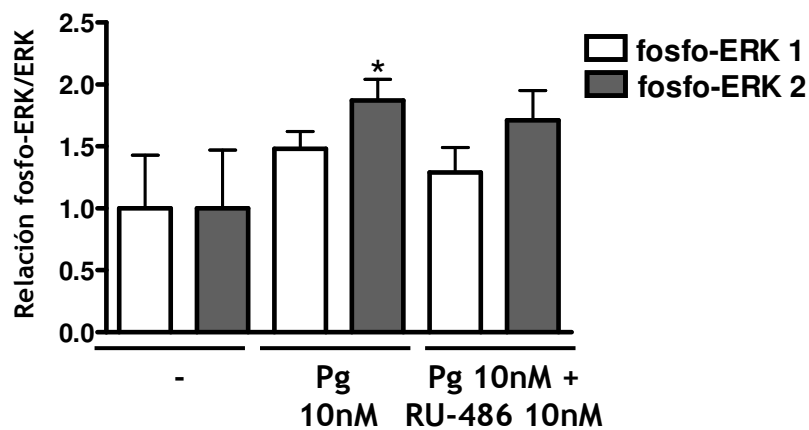
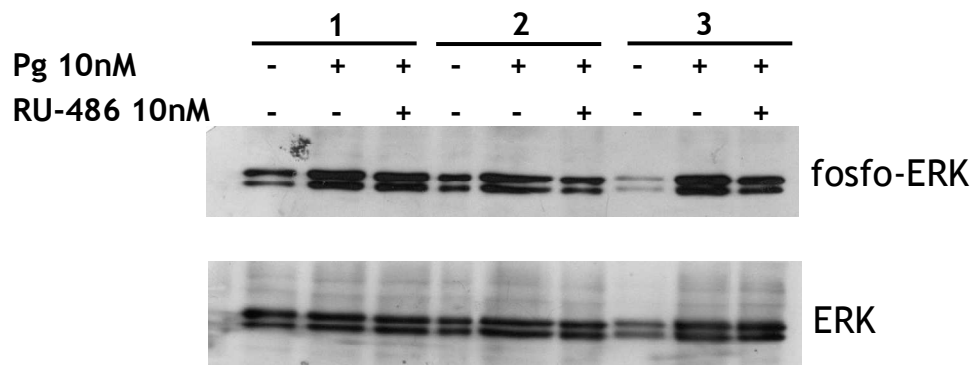
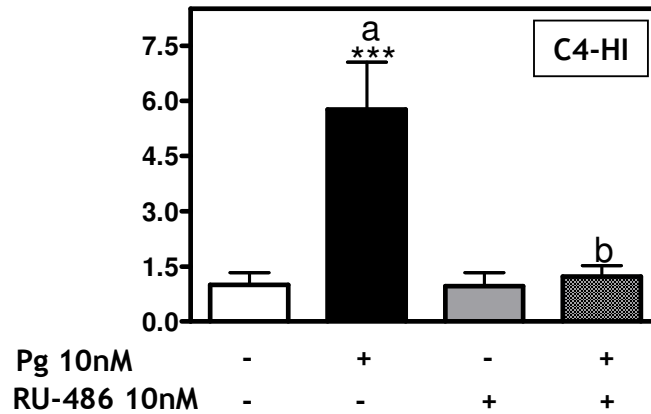
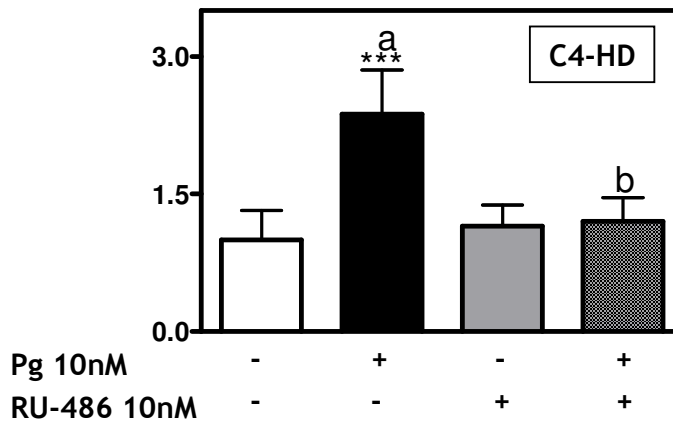


Figura 3.25: Activación de ERK en cultivos primarios del tumor C4-HI. Se realizaron cultivos primarios C4-HI, cuando alcanzaron un 80% de confluencia se ayunaron las células durante 48 h con medio sin adición de suero. Se trataron luego durante 5 min con medio, Pg 10nM o Pg 10nM + RU-486 10nM. Se obtuvieron los extractos protéicos que fueron estudiados mediante Western Blot. Se sembraron 50 µg de proteína por calle, cuantificadas mediante la técnica de Lowry. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las bandas obtenidas fueron densitometradas y cada ERK fosforilada fue relativizada a la proteína total correspondiente, datos con los cuales se realizó el gráfico. * $p < 0.05$. Se observa un aumento de la fosforilación de ERK inducido por Pg, que se mantiene en presencia de RU-486.

Realizamos también ensayos de proliferación por incorporación de timidina tritiada. En la figura 3.26A se muestra que Pg 10nM tiene un efecto proliferativo, tanto en células de cultivo de tumores C4-HD como C4-HI. El agregado de RU-486 10nM al tratamiento revierte el efecto generado por Pg en ambos cultivos celulares. A su vez, el tratamiento con una concentración menor del antagonista (RU-486 0.01nM) en conjunto con Pg genera un efecto estimulador igual que el tratamiento solamente con Pg (fig 3.26B).

A.



B.

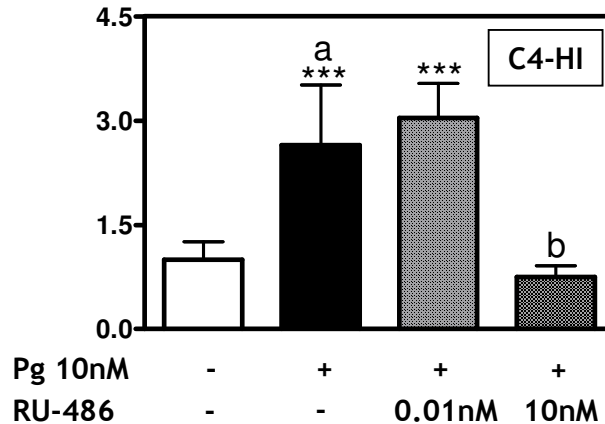


Figura 3.26: Ensayos de proliferación por incorporación de ^3H timidina en cultivos primarios. Se realizaron cultivos primarios C4-HD y C4-HI, se arrestarton las células con medio 1% SFBch durante 24 h. A. Las células se trataron durante 48 h con Pg 10nM y/o RU-486 10nM. B. Las células se trataron durante 48 h con Pg y/o RU-486 en las concentraciones indicadas. En ambos casos luego de las primeras 24 h de tratamiento se les dio un pulso de ^3H -timidina. Al final del ensayo de proliferación el medio fue descartado, las células fueron cosechadas y la radiactividad se midió en un contador beta. *** $p < 0.001$; a vs b $p < 0.001$.

Los mismos ensayos realizados con MPA en combinación con los inhibidores antes mencionados se realizaron en presencia de Pg. En este caso, también la proliferación celular inducida por Pg es revertida por ambos antiprogestágenos, RU-486 y ZK-211 (figura 3.27). Ante estos resultados, consideramos que la Pg estaría ejerciendo su actividad estimuladora mediante RP al igual que el MPA.

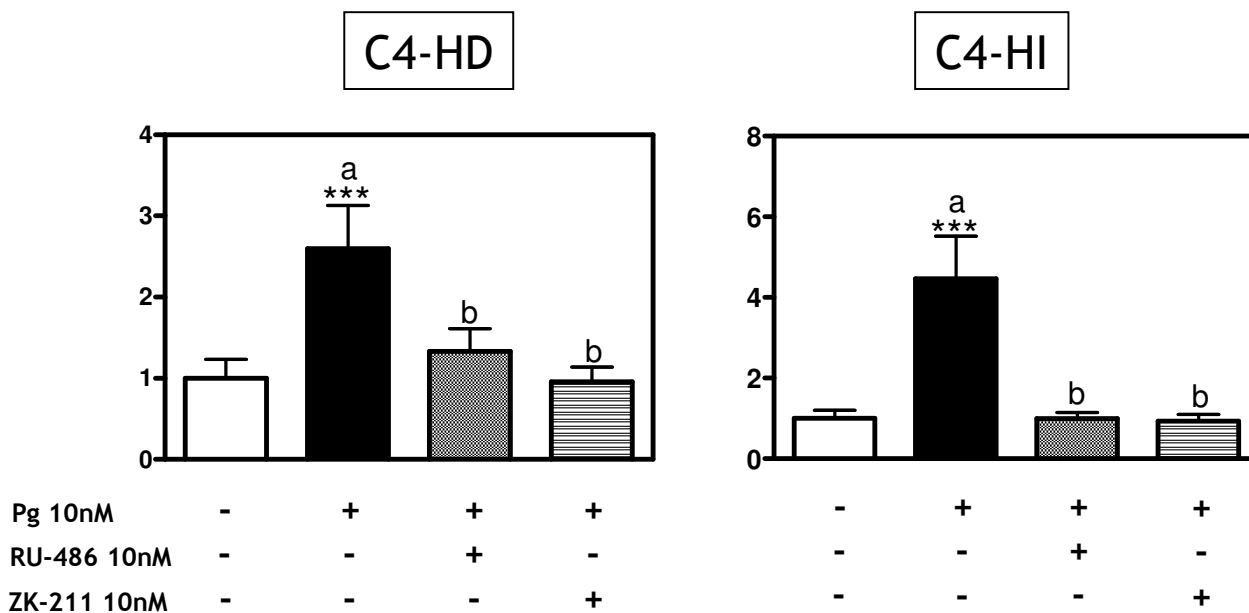


Figura 3.27: Ensayos de proliferación en cultivos primarios de los tumores C4-HD y C4-HI. Se realizaron cultivos primarios C4-HD y C4-HI, se arrestaron las células con medio 1% SFBch durante 24 h. Se trataron durante 48 h con Pg 10nM, RU-486 10nM y ZK-211 10nM en las combinaciones indicadas y luego de las primeras 24 h de tratamiento se les dio un pulso de ³H-timidina. Al final del ensayo de proliferación el medio fue descartado, las células fueron cosechadas y la radiactividad se midió en un contador beta. Los gráficos muestran que la Pg 10nM tiene un efecto estimulador mediado por RP ya que se inhibe al co-incubar con RU-486 y con el antagonista específico de RP, ZK 211 230. ***p<0.001, a vs b p<0.001.

Estos resultados indican que la Pg tiene efectos similares al MPA induciendo el aumento de pSer 190 PR en la membrana y en el núcleo, y activando ERK. Los efectos generados por Pg sobre la proliferación fueron similares a los obtenidos con MPA, sugiriendo la participación del RP clásico en estos eventos.

PARTE IV

DISCUSION

CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis estudiamos la localización de los receptores de progesterona (RP) en la membrana celular de carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA, HD y HI; y su participación en fenómenos no-genómicos.

Los tumores HD de este modelo crecen *in vivo* sólo en presencia de MPA o Pg, mientras que los HI son capaces de crecer en ausencia de esta hormona (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989; Kordon et al., 1990). Sin embargo, los tumores HD y la mayoría de los tumores HI, poseen la capacidad de regresionar ante la administración de un antiprogestágeno, como el RU-486 (Montecchia et al., 1999). Por otra parte, *in vitro*, las células de ambos tumores presentan características similares, ya que su proliferación se estimula en presencia de MPA (Dran et al., 1995), y se inhibe en presencia de RU-486 (Lamb et al., 1999). En cuanto a la expresión de receptores hormonales, ambos tumores expresan altos niveles de receptor de estrógenos alfa (RE α) y RP (Molinolo et al., 1987; Montecchia et al., 1999; Helguero et al., 2003b). En cuanto a la regulación de RE α y RP, habíamos observado que tanto el MPA como el RU-486 era capaces de disminuir la expresión de estos receptores luego de 48h de tratamiento. En este trabajo, observamos que a tiempos cortos (20 min) no se produce una regulación negativa sino que la expresión de RP es regulada positivamente tanto por los agonistas del receptor, MPA y Pg, como por el antagonista RU-486.

La hipótesis de la presencia de RP en la membrana celular desarrollada en este trabajo de tesis surgió como consecuencia de estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio por la Dra. Helguero. Los resultados obtenidos mediante ensayos de proliferación mostraban una respuesta bifásica de las células tumorales ante la estimulación con MPA. Esta curva, que presentaba dos EC₅₀ diferentes, sugería la existencia de efectos inducidos por la unión de la hormona a dos sitios diferentes.

Al realizarse ensayos de unión al ligando, se observó que la unión de la hormona era desplazable por progestágenos y antiprogestágenos mostrando nuevamente una curva de dos pendientes. Luego se llevaron a cabo ensayos de *Scatchard* en los que se encontraron dos sitios de unión a progesterona, el sitio clásico de baja afinidad y alta capacidad, y otro nivel de alta afinidad y baja capacidad (Helguero et al., 2003a).

Los receptores de hormonas esteroideas han sido considerados históricamente como receptores localizados en el citoplasma celular y el núcleo, ejerciendo acciones a nivel de regulación de la transcripción de aquellos genes que poseen elementos respondedores a estas hormonas. Sin embargo, desde hace muchos años, se conocen efectos no convencionales observados ante la administración de hormonas esteroideas, como los generados por ejemplo por progesterona (Selye, 1941) y estradiol (Szego and Davis, 1967). Más tarde surgieron evidencias que demostraban que todas las hormonas esteroideas eran capaces de generar efectos no nucleares. Sin embargo, o bien se adjudicaban estos efectos a receptores no clásicos, como es el caso de GPR30, el receptor huérfano de estrógenos; o a la interacción de los receptores clásicos con otras proteínas (*cross-talk* con vías de señalización) (Migliaccio et al., 1998).

En el año 1999 se demostró por primera vez la presencia del RE α en la membrana plasmática (Levin, 1999). Luego se demostró la localización en membrana del RE β (Pedram et al, 2005), y aún 9 años más tarde no hay trabajos que describan la presencia de RP en la membrana plasmática de células de glándula mamaria o útero.

Estos antecedentes, los resultados previos del laboratorio y el hecho de disponer de un microscopio confocal, nos alentaron a encarar el estudio de la presencia del RP en la membrana celular. Nuestro modelo resultaba apropiado para este estudio ya que hay pocos modelos en los cuales se expresan niveles tan altos de RP como en los tumores desarrollados en nuestro laboratorio.

Decidimos entonces realizar una primera aproximación mediante estudios de microscopía confocal. Para ello utilizamos una metodología que involucra al ligando del receptor a estudiar, en este caso Pg, acoplado a la molécula de gran tamaño, como la seroalbúmina bovina (BSA), y a un fluoróforo (FITC). El tamaño de este complejo le impide atravesar la membrana celular, por lo cual, sólo puede ser observado en el caso de que sea retenido por la unión de Pg a su receptor. Como control utilizamos BSA-FITC, que al no poseer Pg acoplada no se une a los receptores en la membrana. Esta técnica se realiza con las células vivas a 4°C, ya que la fijación de las mismas produce poros en la membrana que llevarían a

resultados falsos positivos. Esta misma técnica fue realizada por el Dr. Price y col. (Saner et al., 2003b) para demostrar la presencia de RP en membrana de células endoteliales. Si bien no es una técnica muy limpia, dado que la BSA presenta *per se* pegado a la membrana, es importante remarcar que debe compararse la señal con la obtenida con el complejo sin progesterona. Esta metodología ha sido utilizada también para estudiar la activación de vías no genómicas (Benten et al., 1999b), sin embargo ha sido cuestionada porque, en caso de desacoplarse el complejo de la hormona, ésta es capaz de atravesar la membrana y desencadenar efectos a nivel de citoplasma o núcleo, impidiendo entonces la correcta discriminación de la localización del receptor. Es por esta razón que decidimos utilizarla solamente para microscopía confocal.

Mediante este ensayo pudimos obtener las primeras evidencias de la presencia de sitios aceptores de Pg en la membrana celular que podrían tratarse de RP clásicos, no clásicos, o sitios como receptores de GABA A capaces de unir Pg.

Dado que se había descrito la localización del RE α en la membrana, y se lo había visto asociado a estructuras de membrana denominadas caveolas (Razandi et al., 2002); y que, por otra parte, el grupo de la Dra. Elizalde había observado que el MPA regulaba la expresión de caveolina-1 (Beguelin et al., 2004) decidimos colocalizar RP usando ambos anticuerpos.

Observamos una discreta colocalización como se muestra en la Figura 3.6 usando células C4-HI, resultado muy similar al que luego fue publicado en C4-HD (Salatino et al., 2006) observándose a su vez muy pobre marca nuclear. La baja eficiencia de esta marcación se debe a que en ambos casos no se usaron las condiciones óptimas para visualizar RP en la membrana celular. Posteriormente observamos que fijando las células en etanol en lugar de formalina, e incubándolas con FGF-2 o MPA la marca en membrana aumenta notablemente, sin embargo cuando quisimos realizar la doble marcación en estas condiciones experimentales, observamos que éstas no resultaron apropiadas para el anticuerpo contra caveolina que poseemos.

Utilizando entonces células fijadas en etanol, realizamos ensayos de inmunofluorescencia usando un anticuerpo comercial específico para RP (Ab-7), de

manera de determinar si eran los RP clásicos los putativos receptores de membrana. De esta forma, pudimos observar marcación tanto nuclear como de membrana. Es importante destacar que el proceso de fijación de las células con etanol resulta esencial para la detección de la marcación de membrana. Otros autores han utilizado una fijación con metanol (Salatino et al., 2006; Razandi et al., 2002). Este tipo de fijación, al igual que con etanol, expone mejor los epítopes reconocidos por los anticuerpos, permitiendo una marcación en membrana. Sin embargo, en forma empírica parecería que la fijación realizada con etanol produce mejores marcaciones que las reportadas por otros autores con metanol. En este caso, la realización además de un tratamiento con FGF-2, que regula positivamente al RP (Cerliani et al manuscrito en preparación), permite también una mayor visualización de la marca de membrana.

Es interesante destacar que en ensayos de nuestro laboratorio, utilizando células T47D (que sobreexpresan RP), fijadas con etanol; y usando un anticuerpo dirigidos contra el extremo amino-terminal del receptor (Ab-7), no pudimos observar marcación de membrana. La marcación obtenida mediante inmunofluorescencia fue nuclear, aún en condiciones de quiescencia (Cerliani et al manuscrito en preparación).

Sin embargo, el equipo del Dr. Price detectó la presencia del RP en membrana de células T47D sólo cuando los ensayos fueron realizados previo fijado de las células. La detección se llevó a cabo utilizando anticuerpos comerciales dirigidos contra el dominio de unión al ligando del receptor. Además realizando ensayos con células T47D-Y sin permeabilizar, que no poseen el RP nuclear, y utilizando esos mismos anticuerpos, pudo detectar la presencia de formas inmunoreactivas del RP en la membrana. Estas mismas no se observaron cuando se usaron anticuerpos dirigidos contra epítopes más cercanos al amino terminal. Por esta razón los autores consideran que se trata del RP de membrana de 38 KDa (PR-M) que habían caracterizado previamente y sugieren que su función tendría que ver con la movilización de calcio intracelular (Price et al., 2005).

La diferencia principal entre los resultados obtenidos por Price y col. y los observados en nuestro laboratorio se debe a los anticuerpos utilizados y métodos de fijación. El anticuerpo C-19 que reconoce el extremo carboxi-terminal, no fue el elegido en nuestros estudios de inmunofluorescencia dado que la marca no era tan

buena como la obtenida con el Ab-7 o Ab-11 y por otra parte, el grupo de Price realizó los estudios con las células vivas en frío y en nuestros estudios usamos células fijadas en etanol. Teniendo en cuenta que el receptor descrito por el grupo del Dr. Price y col. no sería detectable por Ab 7 y por Ab-11, consideramos que en nuestros experimentos se trataría de las isoformas de clásicas de RP de mayor peso molecular.

Dado que la línea T47D es ampliamente utilizada como modelo de cáncer de mama, creemos que la dificultad en la detección mediante microscopía es una posible razón por la cual aún no se ha descrito la presencia de estos receptores en membrana. Hasta el día de hoy, las únicas menciones a la presencia del RP en membrana de células de cáncer de mama son las isoformas de bajo peso molecular recientemente mencionadas (Price et al., 2005), el mismo que hizo el reporte en células endoteliales; y hace unos meses en una revisión bibliográfica del grupo del Dr. Ellis Levin se mostraron evidencias preliminares en células MCF-7 (Pedram et al., 2007a). Por estas razones, nuestro modelo resulta especialmente adecuado para estos estudios.

Más allá de las evidencias presentadas por medio de microscopía, hay un único trabajo realizado con células de granulosa humanas, en el cual el estudio de la presencia del RP en membrana se lleva a cabo mediante fraccionamiento subcelular. En el mismo no se detectó la presencia de las isoformas A y B clásicas del RP en la fracción de membrana sino de formas de bajo peso molecular (Younglai et al., 2006).

En este trabajo de tesis se realizó por primera vez la técnica de fraccionamiento subcelular utilizando células de carcinoma mamario; en los cuales se pudo detectar la presencia de ambas isoformas de RP clásico en membrana.

Para ampliar el estudio por microscopía confocal, utilizamos el anticuerpo Ab-11, capaz de reconocer la serina 190 del RP. Como se mencionó anteriormente, esta serina se encuentra basalmente fosforilada, pero su fosforilación es inducible por la unión al ligando (Clemm et al., 2000). Usando este anticuerpo y tratando a las células durante 20 min con MPA, pudimos observar un aumento en la marcación tanto nuclear como de membrana. Cuando los tratamientos se realizaron con el antiprogéstágeno RU-486, pudimos ver también un aumento en la marcación en membrana, además de la nuclear. Como control de la especificidad del anticuerpo

utilizamos la línea celular LM3, que no expresa RE ni RP (Bal et al., 1983), gentilmente cedida por la Dra. Bal, en la cual no se observa ningún cambio ante el tratamiento hormonal.

Dado que no se había utilizado el anticuerpo Ab-11 en tejidos de ratón, validamos su especificidad por medio de estudios *in vivo*, utilizando tumores de nuestro modelo de los cuales sabemos que el RU-486 es capaz de hacerlos regresionar de manera muy rápida. Realizamos luego *western blots* de extractos proteicos del tejido tumoral, e inmunohistoquímica. También en este ensayo el RU-486 indujo la fosforilación de la Ser 190, demostrando que este antiprogéstágeno induce la activación rápida del receptor (6h) aún si el destino del tumor es la inhibición del crecimiento. De esta forma, los resultados obtenidos para el RU-486 *in vivo* coinciden con los observados *in vitro*.

Resumiendo, observamos mediante estudios de microscopía confocal la localización en membrana del RP. Pudimos ver también que, aunque el MPA es la hormona que estimula el crecimiento tumoral y el RU-486 aquella que lo inhibe; en estos ensayos, ambas hormonas cumplen un rol similar en la activación del receptor localizado tanto en el núcleo como en la membrana celular. Dado que el RU-486 posee una alta afinidad por RP, mayor aún que la de la Pg misma (DeMarzo et al., 1992; Skafar, 1991) y que su actividad antiprogestacional se produce por el bloqueo del inicio de la transcripción (Jackson et al., 1997; Tanenbaum et al., 1998), resulta razonable que este compuesto sea capaz de inducir la activación de RP, tanto en núcleo como en membrana celular.

Para confirmar la presencia de RP en la membrana celular, decidimos abordar el estudio de extractos purificados de membrana mediante *western blot*. Para ello, luego de analizar varios métodos de purificación, optamos por utilizar el descripto por Powell y col. para identificar al RE α en la membrana celular de las células MCF-7 (Powell et al., 2001), que debió ser modificado para realizarse con tumores en lugar de células. Esta metodología nos permitió trabajar con un extracto de proteínas de membrana altamente purificado.

Una contaminación, tanto con citoplasma como con núcleo, podría llevar a falsos resultados positivos, razón por la cual los extractos fueron sometidos a

controles de contaminación mediante técnicas de *western blot* y ensayos de medición de actividad enzimática; demostrando éstos ausencia de contaminación.

La utilización de extractos purificados nos permitió detectar, usando dos anticuerpos comerciales diferentes, uno monoclonal, Ab-7, y otro policlonal, C-19; tanto a RP-A como a RP-B en la membrana de células tumorales. Así mismo, la utilización del anticuerpo contra la serina 190 mencionado anteriormente, Ab-11, permitió también la detección de ambas isoformas de RP. Este estudio fue realizado utilizando también dos líneas celulares derivadas del tumor C4-HD, MC4-L2 y MC4-L5, y cultivos primarios del tumor C4-HI. En estos casos también se pudo observar la presencia de ambas isoformas de RP en los extractos de membrana mediante la utilización de los dos anticuerpos. Además de las bandas inmunoreactivas obtenidas, en todos los casos se obtuvo otra banda, entre RP-A y RP-B, de 105 KDa. Esta banda inmunoreactiva ya había sido reportada en trabajos anteriores del laboratorio (Helguero et al., 2003b), y podría tratarse de un clivaje proteolítico del receptor; pero no fue el objetivo de este trabajo su caracterización.

Por otra parte, si bien el objetivo de este trabajo no fue caracterizar al RE α , dado que su presencia en membrana en células de cáncer de mama ya ha sido descrita (Razandi et al., 1999; Chambliss et al., 2000) no podíamos dejar de estudiarlos debido a su estrecha relación con los RP. Los resultados observados muestran que RE α fue detectado en los mismos extractos de membrana en los cuales se detectó RP. Tanto estos resultados como la presencia de FGFR-2 y de integrina- β 1 sólo en los extractos de membrana y no en los totales a una misma concentración proteica, refuerzan que la purificación de proteínas de membrana fue exitosa.

Es interesante destacar que, luego del proceso de purificación, el extracto con el cual trabajamos se encontraba mil veces más enriquecido en proteínas de membrana que un extracto total. Esa es la razón por la cual la señal para RP detectada en los *western blots* fue tan fuerte. Si bien un extracto total de proteínas posee mayor cantidad de receptores, el extracto de membrana tiene solamente las proteínas presentes en la membrana en un alto grado de pureza, permitiendo una muy buena detección. Un indicador del grado de pureza es la determinación del receptor de FGF-2 (FGFR-2) que se muestra en la figura 3.10C. Allí se observa que, aunque el tumor con el cual se realizó el extracto total

expresaba FGFR-2 (Giulianelli et al., 2008) dada la baja concentración de proteínas que se utiliza en esta técnica, este receptor sólo pudo ser detectado en el extracto purificado de membrana.

Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante microscopia confocal que sugerían la presencia de RP en membrana, fueron corroborados por medio de la utilización de extractos purificados de membrana. A su vez, estos últimos nos permitieron detectar ambas isoformas de RP en membrana celular, observándose mayoritariamente la isoforma A del receptor, isoforma predominante en el ratón (Schneider et al., 1991) y en las fracciones nucleares de los carcinomas mamarios (Helguero et al., 2003b; Wargon et al., 2008d).

La localización de receptores de hormonas esteroides en membrana celular es actualmente un tema de discusión, ya que su secuencia no posee una señal de localización de membrana. Se ha reportado que los RP, al igual que otros receptores de hormonas esteroides, poseen un sitio de palmitoilación (Pedram et al., 2007b). Esta modificación post-traducciona sería capaz de permitir la localización no-clásica del receptor. El grupo del Dr. Edwards ha reportado además que el RP humano posee una secuencia rica en prolinas que le permite la interacción con proteínas con dominios SH3, acercándola de esta forma a la membrana plasmática (Boonyaratanakornkit et al., 2001). Sin embargo, no se ha encontrado esta secuencia en los RP de ratón (Hammes and Levin, 2007a), dejando entonces como posibilidad la localización en membrana inducida por la palmitoilación.

Mientras nos encontrábamos analizando la presencia del RP clásico en la membrana celular, el grupo del Dr. Thomas clonó y caracterizó tres receptores para progesterona del tipo de 7 pasos transmembrana, denominados mRP α , mRP β y mRP γ (Zhu et al., 2003b). Inicialmente se los describió en pez, pero luego se observó que se encontraban altamente conservados en la escala evolutiva, presentándose en otras especies, incluyendo al ratón y al humano (Zhu et al., 2003a). Estos receptores no poseen ningún tipo de homología con el RP clásico. Se encuentran acoplados a proteínas G inhibitorias, por lo que su activación lleva a una disminución de los niveles de AMPc.

Con estos antecedentes nos resultó de interés estudiar la presencia de los mRP en el modelo con el cual nos encontrábamos trabajando. Al no existir anticuerpos comerciales confiables contra estos receptores, encaramos su estudio mediante RT-PCR. De esta manera pudimos detectar la expresión de mRP α , mRP β y mRP γ , tanto en los tumores homono-dependientes C4-HD, en los independientes C4-HI, como en la línea celular MC4-L2 derivada del tumor C4-HD. Sabemos la importancia que tiene el RP clásico en el crecimiento de estos tumores (Lamb et al., 2005) pero hasta la fecha, desconocemos el rol que pueden estar cumpliendo los receptores nóveles mRP y si es que tienen alguna función en el crecimiento celular.

Ha sido reportado en miometrio humano que se encuentran moduladas diferencialmente las formas α y β durante el parto, y la disminución de los niveles de AMPc generada por la progesterona (Pg) mediante estos receptores lleva a un aumento en la fosforilación de la cadena liviana de miosina, facilitando la contracción miometrial. La presencia de estos receptores en miometrio podría mediar la disminución de Pg, llevando al útero a un estado de contracción (Karteris et al., 2006).

Al momento en el cual obtuvimos estos resultados no se había informado la presencia de los receptores transmembrana en células de cáncer de mama. En el año 2007 se publicaron trabajos que demostraban que se estos receptores nóveles se encontraban presentes en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3 (Dressing and Thomas, 2007). El rol que están cumpliendo es aún desconocido. En cuanto a sus funciones en tejidos malignos se observó que, si bien la mama normal expresa estos receptores, la expresión del mRP α se encuentra elevada en biopsias de tumores de mama (Dressing and Thomas, 2007). En nuestro modelo, por medio de RT-PCR, se observa una alta expresión de mRP α en la línea celular, no así en los tumores primarios, que presentan mayormente las formas β y γ . Para evaluar si esta diferencia es significativa, deberán realizarse los estudios mediante PCR en tiempo real. Pero como se desconoce todavía el significado biológico de estos receptores, no hemos profundizado en cuantificaciones.

Sintetizando, los carcinomas mamarios murinos con los cuales trabajamos poseen entonces al menos dos proteínas capaces de unir Pg en membrana, de diferentes características.

Teniendo en cuenta que se había descrito que el efecto de la activación de los mRP era la activación de ERK 1/2 y la **disminución de los niveles de AMPc**, y que se sabía que no tenían afinidad por RU-486; decidimos estudiar estas dos vías paradigmáticas de señalización. El objetivo era avocarnos a los efectos no genómicos desencadenados por el RP clásico; razón por la cual realizamos los estudios con MPA y no Pg, y RU-486. Está reportado que el RU-486 no se une a los receptores n6veles (Thomas et al., 2007) y, si bien no hay publicaciones al respecto, Thomas en forma personal nos informó que el MPA tampoco se une.

El abordaje experimental fue mediante inmunofluorescencia y *western blot* para la activación de la vía de ERK 1/2, y por medio de RIA para medir la regulación de los niveles de AMPc. Anteriormente el grupo de la Dra. Elizalde había publicado que el tratamiento de las células del tumor C4-HD con MPA 10nM inducía la fosforilación de ERK (Elizalde et al., 2001) y que la misma era abolida por tratamiento con RU-486. Nosotros observamos aumento en la activación de ERK a una concentración 10 nM y además a concentraciones 1000 veces menores de MPA, resultado que se obtuvo tanto al tratar células del tumor C4-HD como C4-HI. Este resultado es compatible con el sitio de alta afinidad observado anteriormente.

Cabe destacar que para la realización de los extractos para *western blot* fue necesario incrementar la pureza de los cultivos primarios, dado que la presencia, aunque fuese mínima, de fibroblastos producía una alta fosforilación basal de ERK 1/2 impidiendo la regulación por hormonas. El efecto proliferativo inducido por los fibroblastos en cultivos primarios de los tumores de este modelo ya había sido estudiado por la Dra. Lamb (Lamb et al., 1999; Giulianelli et al., 2008) y pudo verse reflejado en el aumento de fosforilación basal de ERK 1/2 observado en este trabajo. Probablemente también influya el hecho de que los cultivos hayan sido realizados en plástico. Además tuvimos que eliminar la presencia de suero charcoalizado (agregado en todos los demás experimentos al momento de ayunar las células) porque también acarrea una alta fosforilación basal, razón por la cual los cultivos utilizados para ensayos de fosforilación de ERK se encuentran ayunados en ausencia de suero. Es importante destacar que las células no presentaron cambios morfológicos debido a este tratamiento.

Al tratar a las células de ambos tumores con RU-486 durante 5 min, observamos un aumento en la activación de ERK 1/2 por ambas técnicas. Por medio de inmunofluorescencia, pudimos observar que el tratamiento conjunto de MPA y RU-486, inducía también un aumento en la fosforilación de ERK 1/2.

Recurriendo a la bibliografía encontramos, como única referencia a este fenómeno, un trabajo publicado por el equipo de la Dra. Lange utilizando las células de cáncer de mama humano T47D. En el mismo, el tratamiento de las células por 10 min con RU-486, inducía la activación de las MAPK p42/44 (ERK 1/2) y p38. Curiosamente en la interpretación de este resultado lo asocian al efecto agonista que podría tener el RU-486, mencionando solamente que el RU-486 no sería el antiprogéstágeno de elección para la terapia dada su capacidad de activar vías esenciales en la progresión del ciclo celular (Faivre et al., 2005).

Luego analizamos la regulación de los niveles de AMPc ante el tratamiento con MPA y/o RU-486. El MPA aumentó los niveles de AMPc intracelular a diferentes tiempos de tratamiento, resultado que hasta ahora no ha sido reportado pero que está en la misma línea que los resultados publicados por el grupo del Dr. Levin quienes habían demostrado que el tratamiento con un análogo de AMPc estimula el crecimiento del tumor C4-HD (Actis et al., 1995). El RU-486 por otra parte, no sólo no era capaz de revertir el aumento inducido por MPA, sino que generaba un aumento *per se*; asemejándose entonces a lo que ocurría con las MAPK. Si bien los aumentos en los niveles de AMPc no son muy altos comparados con la forskolina, aunque resultan significativos, cabe destacar que lo importante es que no se trata de disminuciones, que podrían ser indicativas de la participación de los mRP no clásicos en estos fenómenos no genómicos. Dado que usamos ligandos que teóricamente no se unirían a los mRP, estos resultados refuerzan la hipótesis de que serían los RP clásicos localizados en la membrana celular, los involucrados en estos fenómenos rápidos.

Con respecto a la activación inducida por RU-486, si bien es un antagonista de RP, su actividad ha sido descripta a nivel nuclear. En el caso del RP en la membrana, su alta afinidad por el receptor induce la activación de al menos estas dos vías de señalización, de manera similar a la generada por el agonista. Cuando se

analizó *in vivo* el efecto del RU-486 a tiempos cortos, también se observó un aumento de fosfo-ERK a las 6 h con posterior disminución a las 24 horas (resultados no mostrados).

Habiendo obtenido estos resultados con el RU-486, consideramos que era interesante estudiar el efecto biológico desencadenado por esta hormona. Con anterioridad nuestro grupo había publicado que el RU-486 inhibía el crecimiento tumoral (Montecchia et al., 1999) y que *in vitro*, RU-486 10nM inhibía el efecto estimulador inducido por MPA (Lamb et al., 1999). En este caso, decidimos analizar el efecto que podía tener sobre la proliferación celular una concentración tal de RU-486 que no fuese capaz de activar al RP nuclear sino que sus efectos fuesen sólo mediados por el receptor de membrana. Según nuestra hipótesis, el receptor en membrana debía tener alta afinidad y baja capacidad. Es así como realizamos un estudio de dosis-respuesta, utilizando concentraciones decrecientes del antagonista, y estudiamos mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada, los cambios en la proliferación celular. Cabe destacar que ya hemos validado en nuestro modelo que la incorporación de timidina tritiada es una medida indirecta de proliferación celular (Lamb et al., 1999; Giulianelli et al., 2008)

El tratamiento de las células de un cultivo primario del tumor C4-HI con RU-486 demostró que, a concentraciones entre 0.01pM y 0.1nM, este antiprogéstágeno generó un efecto proliferativo; mientras que a concentraciones mayores su efecto fue inhibitorio. A su vez, el tratamiento combinado de MPA y RU-486 0.001nM tuvo un efecto aditivo, ya que fue capaz de aumentar la proliferación por sobre los niveles inducidos por MPA; mientras que el tratamiento con RU-486 10nM inhibió completamente el aumento inducido por MPA.

En nuestro modelo ya habíamos demostrado la capacidad del antiprogéstágeno ZK-299 10nM (onapristona), cuya producción fue discontinuada, de inhibir la proliferación celular (Montecchia et al., 1999). El lanzamiento reciente del ZK-211, con menor efecto antiglucocorticoide que el RU-486 (Chwalisz et al., 2000) resultó de interés para estos estudios. Por lo tanto, ensayamos la capacidad de este compuesto de revertir la proliferación inducida por el agonista, y observamos que fue capaz de inhibir completamente el efecto del MPA. Esta inhibición resultó

similar a la observada con RU-486. Si bien se ha descripto que el RU-486 no posee actividad antiglucocorticoide a una concentración 10nM ya que no se une al receptor (Horwitz 1985), teniendo en cuenta que esos estudios datan de veinte años atrás, queríamos descartar por completo el posible efecto de MPA o RU-486 a través de los RG. Los estudios realizados usando el ZK-211, sugieren que el efecto proliferativo estaría mediado por RP. Una vez más observamos que los RP son esenciales para el crecimiento tumoral en este modelo, acompañando los resultados obtenidos por la Dra. Lamb, en los cuales la utilización de una estrategia antisentido contra RP llevó a la inhibición *in vitro* de la proliferación e *in vivo* del crecimiento tumoral (Lamb et al., 2005).

Una vez realizados los ensayos con MPA, surgió la pregunta si la progesterona (Pg), el agonista natural del RP, generaba efectos similares a los observados con MPA. Aunque parecería interesante estudiar los efectos de la Pg sobre la regulación de los niveles de AMPc, esta hormona al ser capaz de unirse a los receptores nóveles de 7 pasos transmembrana generaría por esta vía una disminución de los niveles de AMPc. Razón por la cual decidimos no realizarlo por el momento para evitar la activación de la vía no-genómica mediante los mRP que dificultaría la discriminación entre receptores y focalizarnos una vez más solamente en los RP clásicos.

Para ello realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo Ab-11 y pudimos observar que el tratamiento por 20 min con Pg también indujo marcación de membrana y nuclear.

El tratamiento con Pg durante 5 min produjo, a igual que el MPA, un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 observado tanto por inmunofluorescencia como por *western blot*. Además, el tratamiento conjunto de las células con Pg 10nM y RU-486 10nM también indujo la activación de ERK 1/2.

Con respecto a los efectos biológicos, se realizaron ensayos de proliferación en los cuales se observó que la Pg estimula la proliferación celular. La misma se inhibió en presencia de RU-486 10nM pero, el co-tratamiento con RU-486 0.01nM no incrementó en forma significativa la estimulación inducida por Pg.

La capacidad de un antagonista como el RU-486, que no se une a los receptores de 7 pasos transmembrana, de estimular la activación de ERK al ser co-incubado

con Pg y de bloquear completamente el efecto proliferativo de la misma sugiere que el efecto estimulador de ambos agonistas (MPA y Pg) sería ejercido mediante los RP clásicos.

Por lo tanto, si bien los tumores se inducen por administración del análogo sintético de Pg, MPA, la hormona fisiológica que es capaz de estimular el crecimiento *in vivo*, replica los efectos observados con MPA *in vitro*.

Es interesante destacar que uno de nuestros objetivos de este trabajo fue originalmente investigar si los tumores de crecimiento HI tendrían mayores niveles de receptores de membrana, por lo tanto mayor sensibilidad a pequeñas cantidades de hormona circulante insuficientes para activar al receptor clásico nuclear, y eso ser una posible explicación a su crecimiento HI. Sin embargo, fue tan difícil tener las cantidades suficientes de receptores de membrana para realizar estudios de *western blot* (15 gramos de tumor rinden para un único *western blot*), que consideramos que no estamos en condiciones de hacer estos estudios cuantitativos comparativos y preferimos avocarnos a confirmar por diferentes técnicas la presencia de este receptor. Por lo tanto, por el momento, no podemos informar diferencias entre ambas tipos de líneas tumorales.

En forma similar, se habían realizado en un principio estudios de otras vías de señalización como la de Akt y p38. La heterogeneidad de resultados, falta de reproducibilidad propia quizás de los sistemas de cultivo primario en plástico, hizo que nos concentráramos sólo en la vía de ERK 1/2. Fue muy difícil encontrar las condiciones experimentales en las cuales las fosfo-ERK estuvieran bajas en los controles, situación indispensable para evaluar aumentos. Sin embargo aún en esos experimentos en los cuales las fosfo-ERK estaban altas, los controles tenían menor proliferación que en los tratados. Uno se cuestiona entonces, en cuántas situaciones se correlaciona en forma equivocada la activación de ERK con la estimulación de la proliferación celular.

Recapitulando, en este trabajo de tesis hemos detectado por primera vez en células de carcinoma mamario la presencia del RP clásico en la membrana celular tanto por microscopía confocal como por ensayos a partir de extractos altamente purificados de membrana. Hemos determinado por primera vez en células mamarias

murinas, la presencia de los receptores mPR (α , β y γ) recientemente clonados, sin embargo no hemos abordado aún el estudio de su funcionalidad. Nos hemos avocado al estudio del rol de los RP clásicos en la membrana usando agonistas y antagonistas que sólo ligarían al receptor clásico. Se estudiaron dos vías paradigmáticas de señalización, como la activación de ERK y la regulación de los niveles de AMPc. Ambas vías se vieron estimuladas en presencia de MPA y RU-486. Este efecto agonista controversial del antiprogestágeno nos llevó a estudiar los efectos del RU-486 a concentraciones incapaces de ejercer los efectos genómicos conocidos (menores al K_d del receptor). Mientras que el MPA ejerció efectos estimulatorios en concentraciones mayores a 0.01nM y estos efectos resultaban mayores al incrementar la concentración, el RU-486 tuvo una respuesta bifásica: estimulatoria en concentraciones menores al K_d e inhibitorias en concentraciones mayores al K_d . Estos resultados nos llevaron a hipotetizar que cuando el tratamiento se realiza con RU-486, a una concentración hormonal muy baja, permitiendo hipotéticamente la unión del RU-486 sólo a los receptores de alta afinidad localizados en la membrana, el efecto bioquímico obtenido sería entre otros, aumento de MAPK y cAMP y esto llevaría a un pequeño aumento de proliferación celular. Sin embargo, si la concentración de la hormona es suficiente como para unirse al RP de membrana y al RP nuclear, receptor de menor K_d y mayor capacidad, se activarían los mecanismos genómicos que serían diferentes para el agonista y para el antagonista. En el caso del MPA sería también proliferativa, habría un sinergismo entre activación de ERK y activación de ciclo celular. En el caso del RU-486 se reclutarían los represores y en forma activa se induciría la síntesis de proteínas inhibitorias del ciclo celular como p53, p21 o p27 (Vanzulli et al., 2002) de modo que el efecto genómico sería un efecto predominante, que lo llevaría finalmente a una inhibición de la proliferación (figura 4.1).

Ante estos resultados consideramos que sería conveniente tener en cuenta que, de usarse al RU-486 como tratamiento en cáncer de mama, las concentraciones deberían ser lo suficientemente altas como para desencadenar el efecto genómico, evitando las cascadas no-genómicas que podrían llevar a resultados no deseados.

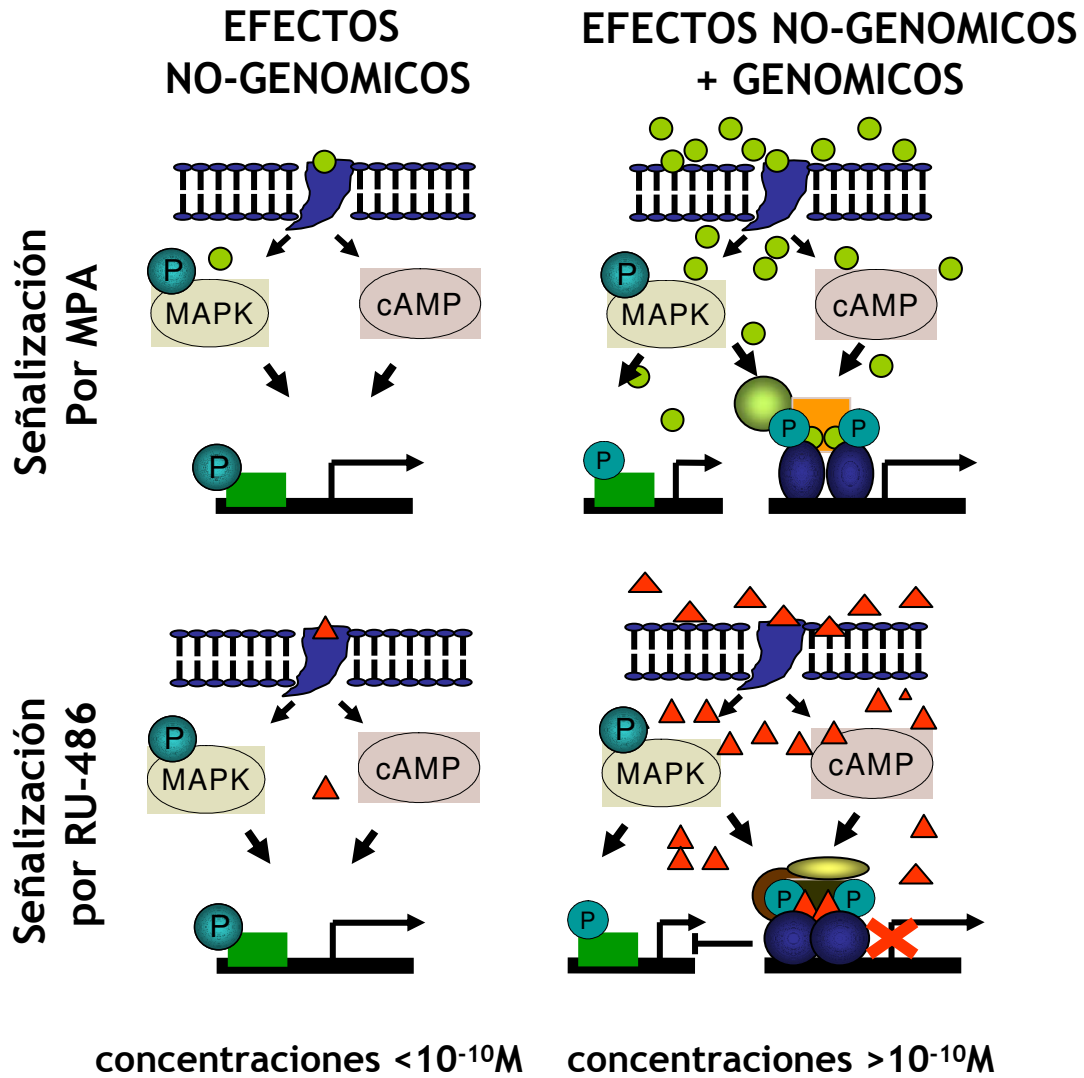


Figura 4.1: Modelo para la señalización inducida por el progestágeno MPA y el antiprogestágeno RU-486. Las concentraciones menores a 10^{-10} M de ambas hormonas inducen la activación de vías no genómicas de señalización iniciadas en membrana (MISS) que llevan finalmente a la activación de la transcripción génica seguida de proliferación. Cuando las concentraciones son mayores, los efectos que se inducen dependen de cuál sea la hormona unida a los RP. Si se trata de MPA, el efecto final es también la proliferación; mientras que si se trata de RU-486, aunque se desencadenen vías de señalización no-genómicas, prepondera la actividad antagonista ejercida a nivel nuclear inhibiendo la transcripción génica y bloqueando en consecuencia la proliferación celular.

CONCLUSIONES PARCIALES

- ◆ Determinamos por primera vez la presencia de RP clásicos en la membrana celular de los carcinomas mamarios murinos C4-HD y C4-HI y en células de la línea MC4-L5 por técnicas de microscopía confocal utilizando Pg-BS-FITC y 3 anticuerpos diferentes, y por medio de fraccionamiento subcelular y estudios de Western blot pudimos demostrar la presencia de ambas isoformas de RP.
- ◆ Demostramos también por primera vez en células de carcinomas mamarios murinos (ya estaba demostrado en humanos) la presencia de RE α en fracciones purificadas de membrana.
- ◆ Detectamos por RT-PCR la expresión de otro tipo de proteína que une progesterona, de siete pasos transmembrana, coexistiendo con el receptor clásico, tanto en tumores HD como HI y en la línea celular MC4-L2. Estos receptores fueron descritos hace un año en 2 líneas de cáncer de mama humano pero su función no se conoce aún.
- ◆ Analizamos la respuesta al tratamiento con RU-486 que en concentración de 10nM es inhibitorio y bloquea la estimulación inducida por MPA. Sin embargo, el RU-486 y el MPA 10 nM tuvieron efectos similares, agonistas, en los siguientes fenómenos:
 - Indujeron a los 20 minutos un aumento de localización de RP en el núcleo (evaluada con el anticuerpo Ab-7).
 - Produjeron a los 20 minutos un aumento de localización de membrana y nuclear de la fosfo-Ser190.
 - Generaron efectos no genómicos rápidos, como la activación de ERK 1/2 y el aumento en los niveles de AMPc.

Estos resultados sugieren que en sí mismos, ninguno de ellos correlaciona con proliferación celular.

- ◆ Estudiamos el tratamiento simultáneo con MPA y RU-486, que excepto en proliferación celular, no mostró un efecto antagónico sino más bien uno aditivo. Teniendo en cuenta que los receptores nódulos no unirían RU-486 o MPA, postulamos que estos efectos estarían mediados por RP clásicos.
- ◆ Seleccionamos algunos estudios para ser realizados usando concentraciones de agonistas 1000 veces menores al Kd del receptor clásico y aún así se obtuvieron los efectos no genómicos mencionados y la estimulación de la proliferación celular. Esto coincide con la descripción previa de un segundo sitio de mayor afinidad para RP.
- ◆ Determinamos que concentraciones 1000 veces más bajas de RU-486 también son capaces de inducir la proliferación celular; asemejándose a lo que ocurre con el progestágeno. En presencia de ambas hormonas, las bajas concentraciones de RU-486 aumentan aún más la proliferación inducida por MPA 10nM.
- ◆ Demostramos que *in vivo* la administración de RU-486, que induce regresión tumoral ya evidente a las 48 h, a las 6h induce un aumento de la fosfo-Ser190 nuclear para luego disminuir a las 24 h sugiriendo una concordancia entre los efectos *in vitro* y los efectos *in vivo*.
- ◆ Utilizamos otro antagonista, el ZK-211, con efectos antiglucocorticoides despreciables, que nos permitió corroborar que los efectos obtenidos ante la estimulación con MPA se debían principalmente a la activación del RP.
- ◆ Realizamos ensayos utilizando progesterona, el agonista natural del receptor, en lugar del análogo sintético, que produjo al igual que el MPA, un aumento en la localización de membrana de la fosfo-Ser190, así como

también desencadenó efectos no-genómicos en forma similar al MPA; apoyando que es el efecto progestacional del MPA el involucrado en estos fenómenos.

CONCLUSION GENERAL

Hemos descripto por primera vez la presencia de RP clásicos en la membrana celular de carcinomas mamarios. El hecho de disponer de un modelo experimental en el cual las células sobreexpresan RP ha permitido tener las condiciones apropiadas para tener estos resultados. Ya se han descripto los receptores de membrana para estrógenos, para andrógenos y se encuentran en estudio para glucocorticoides. Con este trabajo se completarían las evidencias que indican que los receptores para hormonas esteroides pueden estar ubicados en la membrana celular. Además, hemos demostrado por primera vez la expresión de los 3 receptores nóveles para RP en células que también expresan el RP clásico, sugiriendo la complejidad del fenómeno a la hora de la interpretación de las cascadas de señales desencadenadas por progesterona.

Hemos determinado que bajas concentraciones de MPA, o RU-486 inducen activación de ERKs y aumento de AMPc indicando que ambos se comportan como agonistas en los efectos de membrana. Estos resultados son coincidentes con los bibliográficos que sugieren que la actividad antagonista del RU-486 se ejerce por reclutamiento de represores a nivel génico. Este resultado nos llevó a postular que bajas concentraciones de RU-486, incapaces de activar la respuesta genómica inhibitoria, serían estimuladores de la proliferación celular, y eso fue lo que ocurrió. De estas evidencias experimentales se concluye que de usarse el RU-486 u otro antagonista de este tipo, las concentraciones de uso tendrían que ser las adecuadas para garantizar su efecto genómico.

Por último postulamos que estos efectos están generados por los receptores clásicos de RP ya que los nóveles no ligan ni MPA ni RU-486 e inducirían una disminución de AMPc y no un aumento. No hemos abordado aún el estudio del rol que cumplen los receptores nóveles en el crecimiento de estas células.

PARTE V

BIBLIOGRAFIA

- 't Veer,L.J., Dai,H., van de Vijver,M.J., He,Y.D., Hart,A.A., Mao,M., Peterse,H.L., van der,K.K., Marton,M.J., Witteveen,A.T., Schreiber,G.J., Kerkhoven,R.M., Roberts,C., Linsley,P.S., Bernards,R., and Friend,S.H. (2002a). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
- Acconcia,F., Ascenzi,P., Fabozzi,G., Visca,P., and Marino,M. (2004). S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 878-883.
- Acconcia,F., Manavathi,B., Mascarenhas,J., Talukder,A.H., Mills,G., and Kumar,R. (2006). An inherent role of integrin-linked kinase-estrogen receptor alpha interaction in cell migration. *Cancer Res.* 66, 11030-11038.
- Actis,A.M., Caruso,S.P., and Levin,E. (1995). Opposite effect of a cAMP analogue on tumoral growth related to hormone dependence of a murine mammary tumor. *Cancer Lett.* 96, 81-85.
- Albanell,J. and Baselga,J. (2001). Unraveling resistance to trastuzumab (Herceptin): insulin-like growth factor-I receptor, a new suspect. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1830-1832.
- Albanito,L., Madeo,A., Lappano,R., Vivacqua,A., Rago,V., Carpino,A., Oprea,T.I., Prossnitz,E.R., Musti,A.M., Ando,S., and Maggiolini,M. (2007). G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1859-1866.
- Alzamora,R., Michea,L., and Marusic,E.T. (2000). Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 35, 1099-1104.
- Attardi,B.J., Burgenson,J., Hild,S.A., and Reel,J.R. (2004). In vitro antiprogestational/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 277-288.
- Aupperlee,M., Kariagina,A., Osuch,J., and Haslam,S.Z. (2005a). Progestins and breast cancer. *Breast Dis.* 24, 37-57.
- Aupperlee,M.D., Smith,K.T., Kariagina,A., and Haslam,S.Z. (2005b). Progesterone Receptor Isoforms A and B: Temporal and Spatial Differences in Expression During Murine Mammary Gland Development. *Endocrinology.*
- Bal,D.K.J., Puricelli,L.I., Vidal,M.C., and de Lustig,E.S. (1983). Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2, 151-160.
- Balana,M.E., Lupu,R., Labriola,L., Charreau,E.H., and Elizalde,P.V. (1999). Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts

as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 18, 6370-6379.

Bamberger, C.M. and Chrousos, G.P. (1995). The glucocorticoid receptor and RU 486 in man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 761, 296-310.

Barnum, C.P., Ball, Z.B., Bittner, J.J., and Visscher, M.B. (1944). THE MILK AGENT IN SPONTANEOUS MAMMARY CARCINOMA. *Science* 100, 575-576.

Baulieu, E.E. (1978). Cell membrane, a target for steroid hormones. *Mol. Cell Endocrinol.* 12, 247-254.

Bayaa, M., Booth, R.A., Sheng, Y., and Liu, X.J. (2000). The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12607-12612.

Beck, C.A., Weigel, N.L., Moyer, M.L., Nordeen, S.K., and Edwards, D.P. (1993). The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4441-4445.

Beguelin, W., Salatino, M., Proietti, C., Charreau, E., and Elizalde, P. V. El acetato de medroxiprogesterona (MPA) regula la expresión de caveolina-1 por un mecanismo que requiere activación de MAPK y PI-3K en el tumor mamario murino C4-HD. *Medicina (B Aires)* 64. 2004.

Ref Type: Generic

Benhamou, B., Garcia, T., Lerouge, T., Vergezac, A., Gofflo, D., Bigogne, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1992). A single amino acid that determines the sensitivity of progesterone receptors to RU486. *Science* 255, 206-209.

Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., Mossmann, H., and Wunderlich, F. (1999a). Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J.* 13, 123-133.

Benten, W.P., Lieberherr, M., Sekeris, C.E., and Wunderlich, F. (1997). Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett.* 407, 211-214.

Benten, W.P., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z., and Wunderlich, F. (1999b). Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol. Biol. Cell* 10, 3113-3123.

Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-427.

Bernstein, L. (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 7, 3-15.

Birnbaumer, L. Techniques in cyclic nucleotide research. Schrader WT and O'Malley BW. *Laboratory Methods Manual for Hormone Action in Molecular Endocrinology.* Chapter 9, 4th Ed, 9-16. 1980. Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX.

Boonyaratanakornkit,V., Bi,Y., Rudd,M., and Edwards,D.P. (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73, 922-928.

Boonyaratanakornkit,V. and Edwards,D.P. (2007). Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin. Reprod. Med.* 25, 139-153.

Boonyaratanakornkit,V., McGowan,E., Sherman,L., Mancini,M.A., Cheskis,B.J., and Edwards,D.P. (2007c). 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.

Boonyaratanakornkit,V., Scott,M.P., Ribon,V., Sherman,L., Anderson,S.M., Maller,J.L., Miller,W.T., and Edwards,D.P. (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell* 8, 269-280.

Brueggemeier,R.W., Hackett,J.C., and Diaz-Cruz,E.S. (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr. Rev.* 26, 331-345.

Bumaschny,V., Urtreger,A., Diament,M., Krasnapolski,M., Fisman,G., Klein,S., and Joffe,E.B. (2004). Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model. *Breast Cancer Res.* 6, R116-R129.

Cardiff,R.D., Anver,M.R., Gusterson,B.A., Hennighausen,L., Jensen,R.A., Merino,M.J., Rehm,S., Russo,J., Tavassoli,F.A., Wakefield,L.M., Ward,J.M., and Green,J.E. (2000). The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* 19, 968-988.

Carnevale,R.P., Proietti,C.J., Salatino,M., Urtreger,A., Peluffo,G., Edwards,D.P., Boonyaratanakornkit,V., Charreau,E.H., Bal de Kier,J.E., Schillaci,R., and Elizalde,P.V. (2007). 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. *Mol. Endocrinol.* 21, 1335-1358.

Chambliss,K.L., Simon,L., Yuhanna,I.S., Mineo,C., and Shaul,P.W. (2005). Dissecting the basis of nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estradiol: role of ERalpha domains with known nuclear functions. *Mol. Endocrinol.* 19, 277-289.

Chambliss,K.L., Yuhanna,I.S., Anderson,R.G., Mendelsohn,M.E., and Shaul,P.W. (2002). ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.* 16, 938-946.

Chambliss,K.L., Yuhanna,I.S., Mineo,C., Liu,P., German,Z., Sherman,T.S., Mendelsohn,M.E., Anderson,R.G., and Shaul,P.W. (2000). Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ. Res.* 87, E44-E52.

- Cheng,J., Watkins,S.C., and Walker,W.H. (2007). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *Endocrinology* 148, 2066-2074.
- Chlebowski,R.T., Hendrix,S.L., Langer,R.D., Stefanick,M.L., Gass,M., Lane,D., Rodabough,R.J., Gilligan,M.A., Cyr,M.G., Thomson,C.A., Khandekar,J., Petrovitch,H., and 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.
- Christian,H.C., Rolls,N.J., and Morris,J.F. (2000). Nongenomic actions of testosterone on a subset of lactotrophs in the male rat pituitary. *Endocrinology* 141, 3111-3119.
- Chwalisz,K., Brenner,R.M., Fuhrmann,U.U., Hess-Stumpp,H., and Elger,W. (2000). Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* 65, 741-751.
- Clarke,C.A. and Glaser,S.L. (2007). Declines in breast cancer after the WHI: apparent impact of hormone therapy. *Cancer Causes Control* 18, 847-852.
- Clarke,R. (1996). Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res Treat* 39, 1-6.
- Clemm,D.L., Sherman,L., Boonyaratanakornkit,V., Schrader,W.T., Weigel,N.L., and Edwards,D.P. (2000). Differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol.* 14, 52-65.
- Comhaire,F.H. and Vermeulen,A. (1976). Testosterone concentration in the fluids of seminiferous tubules, the interstitium and the rete testis of the rat. *J. Endocrinol.* 70, 229-235.
- Conneely,O.M., Kettelberger,D.M., Tsai,M.J., Schrader,W.T., and O'Malley,B.W. (1989). The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J. Biol. Chem.* 264, 14062-14064.
- Cotran,R.S., Kumar,V., Collins,T., and Robbins,S.L. (1999). *Robbins Pathologic Basis of Disease* . W B Saunders Co).
- D'Astous,M., Mendez,P., Morissette,M., Garcia-Segura,L.M., and Di Paolo,T. (2006). Implication of the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signaling pathway in the neuroprotective effect of estradiol in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *Mol. Pharmacol.* 69, 1492-1498.
- Dauvois,S., White,R., and Parker,M.G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 4), 1377-1388.
- Del Punta,K., Charreau,E.H., and Pignataro,O.P. (1996b). Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137, 5337-5343.

- DeMarzo,A.M., Onate,S.A., Nordeen,S.K., and Edwards,D.P. (1992). Effects of the steroid antagonist RU486 on dimerization of the human progesterone receptor. *Biochemistry* 31, 10491-10501.
- Demonty,G., Bernard-Marty,C., Puglisi,F., Mancini,I., and Piccart,M. (2007). Progress and new standards of care in the management of HER-2 positive breast cancer. *Eur. J. Cancer* 43, 497-509.
- Dietel,M., Lewis,M.A., and Shapiro,S. (2005). Hormone replacement therapy: pathobiological aspects of hormone-sensitive cancers in women relevant to epidemiological studies on HRT: a mini-review. *Hum. Reprod.* 20, 2052-2060.
- Dorrance,A.M., Osborn,H.L., Grekin,R., and Webb,R.C. (2001). Spironolactone reduces cerebral infarct size and EGF-receptor mRNA in stroke-prone rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 281, R944-R950.
- Dran,G., Luthy,I.A., Molinolo,A.A., Charreau,E.H., Pasqualini,C.D., and 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.
- Dressing,G.E. and Thomas,P. (2007). Identification of membrane progesterin receptors in human breast cancer cell lines and biopsies and their potential involvement in breast cancer. *Steroids* 72, 111-116.
- Duffy,M.J. (2005b). Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin. Chem.* 51, 494-503.
- Duffy,M.J. (2005a). Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin. Chem.* 51, 494-503.
- Duss,S., Andre,S., Nicoulaz,A.L., Fiche,M., Bonnefoi,H., Brisken,C., and Iggo,R.D. (2007). An oestrogen-dependent model of breast cancer created by transformation of normal human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 9, R38.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 351, 1451-1467.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687-1717.
- Elizalde, P, Labriola, L., Salatino, M., Movsichoff, F., Proietti, C., Pecci, A., Coso, O., Kornblihtt, A., and Charreau, E. Heregulin Regulates the Progesterone Receptor (Pr) Transcriptional Activity by a Mechanism That Requires a Functional erbB-2 and Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) Activation. *AACR.* 42. 25-3-2001. Proceedings of the AACR. Proceedings of the AACR.
Ref Type: Conference Proceeding
- Engelbrecht,Y., de Wet,H., Horsch,K., Langeveldt,C.R., Hough,F.S., and Hulley,P.A. (2003). Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein

kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology* 144, 412-422.

Estrada,M., Espinosa,A., Muller,M., and Jaimovich,E. (2003). Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 144, 3586-3597.

Evans,S.J., Murray,T.F., and Moore,F.L. (2000). Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72, 209-221.

Fabris,V., Lamb,C.A., Keck,C., Aldaz,M.C., Merani,S., and Lanari,C. (2003). Karyotypic evolution of four novel mouse mammary carcinoma cell lines. Identification of marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 142, 36-45.

Fabris,V.T., Benavides,F., Conti,C., Merani,S., and Lanari,C. (2005a). Cytogenetic findings, Trp53 mutations, and hormone responsiveness in a medroxyprogesterone acetate induced murine breast cancer model. *Cancer Genet. Cytogenet.* 161, 130-139.

Faivre,E., Skildum,A., Pierson-Mullany,L., and Lange,C.A. (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.

Faivre,E.J., Daniel,A.R., Hillard,C.J., and Lange,C.A. (2008). Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol. Endocrinol.* 22, 823-837.

Falkenstein,E., Norman,A.W., and Wehling,M. (2000a). Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J. Clin. Endocrinol. Metab* 85, 2072-2075.

Falkenstein,E., Tillmann,H.C., Christ,M., Feuring,M., and Wehling,M. (2000b). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52, 513-556.

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

Fernandes,D., Guida,E., Koutsoubos,V., Harris,T., Vadiveloo,P., Wilson,J.W., and Stewart,A.G. (1999). Glucocorticoids inhibit proliferation, cyclin D1 expression, and retinoblastoma protein phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 77-88.

- Fix,C., Jordan,C., Cano,P., and Walker,W.H. (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 10919-10924.
- Florian,J.A., Dorrance,A., Webb,R.C., and Watts,S.W. (2001). Mineralocorticoids upregulate arterial contraction to epidermal growth factor. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* *281*, R878-R886.
- Frank,D.W., Kirton,K.T., Murchison,T.E., Quinlan,W.J., Coleman,M.E., Gilbertson,T.J., Feenstra,E.S., and Kimball,F.A. (1979). Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate or progesterone for four years. *Fertil. Steril.* *31*, 340-346.
- Gametchu,B. (1987). Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science* *236*, 456-461.
- Gekle,M., Freudinger,R., Mildenerger,S., and Silbernagl,S. (2002). Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* *282*, F669-F679.
- Geraldes,P., Sirois,M.G., and Tanguay,J.F. (2003). Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ. Res.* *93*, 399-405.
- Gerdes,D., Wehling,M., Leube,B., and Falkenstein,E. (1998). Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol. Chem.* *379*, 907-911.
- Gill,A., Jamnongjit,M., and Hammes,S.R. (2004). Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Mol. Endocrinol.* *18*, 97-104.
- Giulianelli,S., Cerliani,J.P., Lamb,C.A., Fabris,V.T., Bottino,M.C., Gorostiaga,M.A., Novaro,V., Gongora,A., Baldi,A., Molinolo,A., and Lanari,C. (2008). Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *Int. J. Cancer.* *123* (11), 2518-2531
- Goodenough,S., Schleusner,D., Pietrzik,C., Skutella,T., and Behl,C. (2005). Glycogen synthase kinase 3beta links neuroprotection by 17beta-estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience* *132*, 581-589.
- Gorczyńska,E. and Handelsman,D.J. (1995). Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* *136*, 2052-2059.
- Grady,D., Cauley,J.A., Geiger,M.J., Kornitzer,M., Mosca,L., Collins,P., Wenger,N.K., Song,J., Mershon,J., and Barrett-Connor,E. (2008). Reduced incidence of invasive breast cancer with raloxifene among women at increased coronary risk. *J. Natl. Cancer Inst.* *100*, 854-861.
- Grossmann,C., Benesic,A., Krug,A.W., Freudinger,R., Mildenerger,S., Gassner,B., and Gekle,M. (2005). Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol. Endocrinol.* *19*, 1697-1710.

Grossmann,C., Krug,A.W., Freudinger,R., Mildenerger,S., Voelker,K., and Gekle,M. (2007). Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 292, E1790-E1800.

Guo,X., Razandi,M., Pedram,A., Kassab,G., and Levin,E.R. (2005). Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* 280, 19704-19710.

Gustafsson,J.A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinol.* 163, 379-383.

Haddow, A., Watkinson, J. M., and Paterson, E. Influence of synthetic oestrogens upon advanced malignant disease. *BMJ* 2, 393-398. 1944.

Hafezi-Moghadam,A., Simoncini,T., Yang,Z., Limbourg,F.P., Plumier,J.C., Rebsamen,M.C., Hsieh,C.M., Chui,D.S., Thomas,K.L., Prorock,A.J., Laubach,V.E., Moskowitz,M.A., French,B.A., Ley,K., and Liao,J.K. (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 8, 473-479.

Hall,J., Jones,R.D., Jones,T.H., Channer,K.S., and Peers,C. (2006). Selective inhibition of L-type Ca²⁺ channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology* 147, 2675-2680.

Hammes,S.R. and Levin,E.R. (2007a). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr. Rev.* 28, 726-741.

Hammes,S.R. and Levin,E.R. (2007b). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr. Rev.* 28, 726-741.

Hanna,R., Pang,Y., Thomas,P., and Zhu,Y. (2006). Cell-surface expression, progestin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progestin receptors alpha and beta in transfected cells. *J. Endocrinol.* 190, 247-260.

Haseroth,K., Gerdes,D., Berger,S., Feuring,M., Gunther,A., Herbst,C., Christ,M., and Wehling,M. (1999). Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 257-261.

Heinlein,C.A. and Chang,C. (2002). The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol.* 16, 2181-2187.

Helguero,L.A., Lamb,C., Molinolo,A.A., and Lanari,C. (2003a). Evidence for two progesterone receptor binding sites in murine mammary carcinomas. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 9-14.

Helguero,L.A., Viegas,M., Asaithamby,A., Shyamala,G., Lanari,C., and Molinolo,A.A. (2003b). Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res. Treat.* 79, 379-390.

Horwitz,K.B. (1992). The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocr. Rev.* 13, 146-163.

Howe,H.L., Wu,X., Ries,L.A., Cokkinides,V., Ahmed,F., Jemal,A., Miller,B., Williams,M., Ward,E., Wingo,P.A., Ramirez,A., and Edwards,B.K. (2006). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer* 107, 1711-1742.

Institute of Laboratory Animal Resources,C.o.L.S.N.R.C. (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (Washington, D.C.: National Academy Press).

Jackson,T.A., Richer,J.K., Bain,D.L., Takimoto,G.S., Tung,L., and Horwitz,K.B. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11, 693-705.

Joensuu,H., Kellokumpu-Lehtinen,P.L., Bono,P., Alanko,T., Kataja,V., Asola,R., Utriainen,T., Kokko,R., Hemminki,A., Tarkkanen,M., Turpeenniemi-Hujanen,T., Jyrkkio,S., Flander,M., Helle,L., Ingalsuo,S., Johansson,K., Jaaskelainen,A.S., Pajunen,M., Rauhala,M., Kaleva-Kerola,J., Salminen,T., Leinonen,M., Elomaa,I., and Isola,J. (2006). Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 809-820.

Jordan,V.C. (2008). The 38th David A. Karnofsky lecture: the paradoxical actions of estrogen in breast cancer--survival or death? *J. Clin. Oncol.* 26, 3073-3082.

Jung,M.E., Watson,D.G., Wen,Y., and Simpkins,J.W. (2003). Role of protein kinase C in estrogen protection against apoptotic cerebellar cell death in ethanol-withdrawn rats. *Alcohol* 31, 39-48.

Kampa,M. and Castanas,E. (2006). Membrane steroid receptor signaling in normal and neoplastic cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 246, 76-82.

Kampa,M., Nifli,A.P., Charalampopoulos,I., Alexaki,V.I., Theodoropoulos,P.A., Stathopoulos,E.N., Gravanis,A., and Castanas,E. (2005). Opposing effects of estradiol- and testosterone-membrane binding sites on T47D breast cancer cell apoptosis. *Exp. Cell Res.* 307, 41-51.

Kampa,M., Papakonstanti,E.A., Hatzoglou,A., Stathopoulos,E.N., Stournaras,C., and Castanas,E. (2002). The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J.* 16, 1429-1431.

Kanda,N. and Watanabe,S. (2004). 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J. Invest Dermatol.* 123, 319-328.

Karteris,E., Zervou,S., Pang,Y., Dong,J., Hillhouse,E.W., Randeve,H.S., and Thomas,P. (2006). Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol. Endocrinol.* 20, 1519-1534.

Kassel,O., Sancono,A., Kratzschmar,J., Kreft,B., Stassen,M., and Cato,A.C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* 20, 7108-7116.

Kastner,P., Bocquel,M.T., Turcotte,B., Garnier,J.M., Horwitz,K.B., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (1990a). Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 265, 12163-12167.

Kastner,P., Krust,A., Turcotte,B., Stropp,U., Tora,L., Gronemeyer,H., and Chambon,P. (1990b). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9, 1603-1614.

Key,T.J. and Pike,M.C. (1988). The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur. J Cancer Clin. Oncol.* 24, 29-43.

Kim,H.P., Lee,J.Y., Jeong,J.K., Bae,S.W., Lee,H.K., and Jo,I. (1999). Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 257-262.

King,T.A., Gemignani,M.L., Li,W., Giri,D.D., Panageas,K.S., Bogomolny,F., Arroyo,C., Olvera,N., Robson,M.E., Offit,K., Borgen,P.I., and Boyd,J. (2004). Increased progesterone receptor expression in benign epithelium of BRCA1-related breast cancers. *Cancer Res.* 64, 5051-5053.

Klijn,J.G., Setyono-Han,B., and Foekens,J.A. (2000). Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65, 825-830.

Koehler,K.F., Helguero,L.A., Haldosen,L.A., Warner,M., and Gustafsson,J.A. (2005). Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr. Rev.* 26, 465-478.

Koike,S., Sakai,M., and Muramatsu,M. (1987). Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 15, 2499-2513.

Kordon,E., Lanari,C., Meiss,R., Charreau,E., and Pasqualini,C.D. (1990). Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced in vivo by medroxyprogesterone acetate. *Breast Cancer Res. Treat.* 17, 33-43.

Koukouritaki,S.B., Margioris,A.N., Gravanis,A., Hartig,R., and Stournaras,C. (1997). Dexamethasone induces rapid actin assembly in human endometrial cells without affecting its synthesis. *J. Cell Biochem.* 65, 492-500.

Kousteni,S., Almeida,M., Han,L., Bellido,T., Jilka,R.L., and Manolagas,S.C. (2007). Induction of osteoblast differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of the estrogen receptor. *Mol. Cell Biol.* 27, 1516-1530.

Kousteni,S., Bellido,T., Plotkin,L.I., O'Brien,C.A., Bodenner,D.L., Han,L., Han,K., DiGregorio,G.B., Katzenellenbogen,J.A., Katzenellenbogen,B.S., Roberson,P.K.,

Weinstein,R.S., Jilka,R.L., and Manolagas,S.C. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719-730.

Kousteni,S., Chen,J.R., Bellido,T., Han,L., Ali,A.A., O'Brien,C.A., Plotkin,L., Fu,Q., Mancino,A.T., Wen,Y., Vertino,A.M., Powers,C.C., Stewart,S.A., Ebert,R., Parfitt,A.M., Weinstein,R.S., Jilka,R.L., and Manolagas,S.C. (2002). Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 298, 843-846.

Krietsch,T., Fernandes,M.S., Kero,J., Losel,R., Heyens,M., Lam,E.W., Huhtaniemi,I., Brosens,J.J., and Gellersen,B. (2006). Human homologs of the putative G protein-coupled membrane progesterin receptors (mPR α , β , and γ) localize to the endoplasmic reticulum and are not activated by progesterone. *Mol. Endocrinol.* 20, 3146-3164.

Krug,A.W., Grossmann,C., Schuster,C., Freudinger,R., Mildenerger,S., Govindan,M.V., and Gekle,M. (2003). Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J. Biol. Chem.* 278, 43060-43066.

Krug,A.W., Schuster,C., Gassner,B., Freudinger,R., Mildenerger,S., Troppmair,J., and Gekle,M. (2002). Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 45892-45897.

Kuhnel,B., el Ashry,D., Edwards,D.P., and Nordeen,S.K. (1989). Mapping contacts between unpurified human progesterone receptor and the hormone response element of mouse mammary tumor virus. *DNA* 8, 703-713.

Kuiper,G.G., Carlsson,B., Grandien,K., Enmark,E., Haggblad,J., Nilsson,S., and Gustafsson,J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138, 863-870.

Kuiper,G.G., Enmark,E., Peltö-Huikko,M., Nilsson,S., and Gustafsson,J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5925-5930.

Labombarda,F., Gonzalez,S.L., Deniselle,M.C., Vinson,G.P., Schumacher,M., De Nicola,A.F., and Guennoun,R. (2003). Effects of injury and progesterone treatment on progesterone receptor and progesterone binding protein 25-Dx expression in the rat spinal cord. *J. Neurochem.* 87, 902-913.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamb,C., Simian,M., Molinolo,A., Pazos,P., and Lanari,C. (1999). Regulation of cell growth of a progesterin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70, 133-142.

Lamb,C.A., Helguero,L.A., Giulianelli,S., Soldati,R., Vanzulli,S.I., Molinolo,A., and Lanari,C. (2005). Antisense oligonucleotides targeting the progesterone receptor inhibit hormone-independent breast cancer growth in mice. *Breast Cancer Res.* 7, R1111-R1121.

Lameh,J., Cone,R.I., Maeda,S., Philip,M., Corbani,M., Nadasdi,L., Ramachandran,J., Smith,G.M., and Sadee,W. (1990). Structure and function of G protein coupled receptors. *Pharm. Res.* 7, 1213-1221.

Lanari,C., Kordon,E., Molinolo,A., Pasqualini,C.D., and Charreau,E.H. (1989). Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int. J. Cancer* 43, 845-850.

Lanari,C., Luthy,I., Lamb,C.A., Fabris,V., Pagano,E., Helguero,L.A., Sanjuan,N., Merani,S., and Molinolo,A.A. (2001). Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res* 61, 293-302.

Lanari,C., Molinolo,A.A., and Pasqualini,C.D. (1986a). Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.* 33, 215-223.

Lanari,C., Molinolo,A.A., and Pasqualini,C.D. (1986b). Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 77, 157-164.

Lange,C.A. (2007). Editorial: membrane and nuclear steroid hormone receptors: two integrated arms of the same signaling pathway? *Steroids* 72, 105-106.

Lange,C.A. (2008). Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 108, 203-212.

Lasa,M., Brook,M., Saklatvala,J., and Clark,A.R. (2001). Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol. Cell Biol.* 21, 771-780.

LeClercq,G. (2002). Molecular forms of the estrogen receptor in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80, 259-272.

Leonhardt,S.A., Boonyaratanakornkit,V., and Edwards,D.P. (2003). Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68, 761-770.

Leonhardt,S.A. and Edwards,D.P. (2002c). Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 227, 969-980.

Levin,E.R. (1999). Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. *Trends Endocrinol. Metab* 10, 374-377.

Li,X. and O'Malley,B.W. (2003). Unfolding the action of progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 39261-39264.

- Lim,C.S., Baumann,C.T., Htun,H., Xian,W., Irie,M., Smith,C.L., and Hager,G.L. (1999). Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol. Endocrinol.* 13, 366-375.
- Liu,L., Benten,W.P., Wang,L., Hao,X., Li,Q., Zhang,H., Guo,D., Wang,Y., Wunderlich,F., and Qiao,Z. (2005). Modulation of *Leishmania donovani* infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: signaling via surface binding sites. *Steroids* 70, 604-614.
- Loscalzo,J. (1995). Nitric oxide and vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 333, 251-253.
- Losel,R., Breiter,S., Seyfert,M., Wehling,M., and Falkenstein,E. (2005). Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm. Metab Res.* 37, 10-14.
- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., and Farr,A.L. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lu,M.L., Schneider,M.C., Zheng,Y., Zhang,X., and Richie,J.P. (2001). Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J. Biol. Chem.* 276, 13442-13451.
- Luconi,M., Bonaccorsi,L., Maggi,M., Pecchioli,P., Krausz,C., Forti,G., and Baldi,E. (1998). Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 877-885.
- Lutz,L.B., Cole,L.M., Gupta,M.K., Kwist,K.W., Auchus,R.J., and Hammes,S.R. (2001). Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 13728-13733.
- Lyng,F.M., Jones,G.R., and Rommerts,F.F. (2000). Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol. Reprod.* 63, 736-747.
- Marquez,D.C., Chen,H.W., Curran,E.M., Welshons,W.V., and Pietras,R.J. (2006). Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* 246, 91-100.
- Mazak,I., Fiebeler,A., Muller,D.N., Park,J.K., Shagdarsuren,E., Lindschau,C., Dechend,R., Viedt,C., Pilz,B., Haller,H., and Luft,F.C. (2004). Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 109, 2792-2800.
- McGowan,E.M., Russell,A.J., Boonyaratanakornkit,V., Saunders,D.N., Lehrbach,G.M., Sergio,C.M., Musgrove,E.A., Edwards,D.P., and Sutherland,R.L. (2007). Progestins reinitiate cell cycle progression in antiestrogen-arrested breast cancer cells through the B-isoform of progesterone receptor. *Cancer Res.* 67, 8942-8951.

- McGuire,W.L. (1975). Endocrine therapy of breast cancer. *Annu. Rev. Med.* 26, 353-363.
- McGuire,W.L. (1980). Steroid hormone receptors in breast cancer treatment strategy. *Recent Prog. Horm. Res.* 36, 135-156.
- Meyer,C., Schmid,R., Scriba,P.C., and Wehling,M. (1996). Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur. J. Biochem.* 239, 726-731.
- Meyer,M.E., Pornon,A., Ji,J.W., Bocquel,M.T., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (1990). Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J* 9, 3923-3932.
- Michels,G., Er,F., Eicks,M., Herzig,S., and Hoppe,U.C. (2006). Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* 147, 5160-5169.
- Migliaccio,A., Castoria,G., Di Domenico,M., de Falco,A., Bilancio,A., Lombardi,M., Barone,M.V., Ametrano,D., Zannini,M.S., Abbondanza,C., and Auricchio,F. (2000a). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 19, 5406-5417.
- Migliaccio,A., Piccolo,D., Castoria,G., Di Domenico,M., Bilancio,A., Lombardi,M., Gong,W., Beato,M., and Auricchio,F. (1998). Activation of the *Src/p21ras/Erk* pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17, 2008-2018.
- Mihailidou,A.S. (2006). Nongenomic actions of aldosterone: physiological or pathophysiological role? *Steroids* 71, 277-280.
- Mihailidou,A.S., Bundgaard,H., Mardini,M., Hansen,P.S., Kjeldsen,K., and Rasmussen,H.H. (2000). Hyperaldosteronemia in rabbits inhibits the cardiac sarcolemmal Na(+)-K(+) pump. *Circ. Res.* 86, 37-42.
- Mihailidou,A.S., Mardini,M., and Funder,J.W. (2004). Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C. *Endocrinology* 145, 773-780.
- Molinolo,A.A., Lanari,C., Charreau,E.H., Sanjuan,N., and Pasqualini,C.D. (1987). Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J. Natl. Cancer Inst.* 79, 1341-1350.
- Montecchia,M.F., Lamb,C., Molinolo,A.A., Luthy,I.A., Pazos,P., Charreau,E., Vanzulli,S., and Lanari,C. (1999). Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 68, 11-21.
- Montero,G.G., Vanzulli,S.I., Cerliani,J.P., Bottino,M.C., Bolado,J., Vela,J., Becu-Villalobos,D., Benavides,F., Gutkind,S., Patel,V., Molinolo,A., and Lanari,C. (2007). Association of estrogen receptor-alpha and progesterone receptor A expression with

hormonal mammary carcinogenesis: role of the host microenvironment. *Breast Cancer Res.* 9, R22.

Moulder, S.L., Craft, B.S., and Hortobagyi, G.N. (2008). Inhibition of receptor tyrosine kinases in combination with chemotherapy for the treatment of breast cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8, 481-487.

Nakano, S., Kobayashi, N., Yoshida, K., Ohno, T., and Matsuoka, H. (2005). Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 28, 925-936.

Nakhla, A.M., Khan, M.S., and Rosner, W. (1990). Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 71, 398-404.

Nakhla, A.M., Leonard, J., Hryb, D.J., and Rosner, W. (1999). Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. *Steroids* 64, 213-216.

Nardulli, A.M., Greene, G.L., O'Malley, B.W., and Katzenellenbogen, B.S. (1988). Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 122, 935-944.

Nelson, H.D., Humphrey, L.L., Nygren, P., Teutsch, S.M., and Allan, J.D. (2002). Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA* 288, 872-881.

Nemere, I., Pietras, R.J., and Blackmore, P.F. (2003). Membrane receptors for steroid hormones: signal transduction and physiological significance. *J. Cell Biochem.* 88, 438-445.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.L., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., and Gray, J.W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515-527.

Norfleet, A.M., Thomas, M.L., Gametchu, B., and Watson, C.S. (1999). Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* 140, 3805-3814.

Northcott, C., Florian, J.A., Dorrance, A., and Watts, S.W. (2001). Arterial epidermal growth factor receptor expression in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* 38, 1337-1341.

- Olayioye,M.A., Neve,R.M., Lane,H.A., and Hynes,N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159-3167.
- Oonate,S.A., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
- Orchinik,M., Murray,T.F., and Moore,F.L. (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252, 1848-1851.
- Owen,G.I., Richer,J.K., Tung,L., Takimoto,G., and Horwitz,K.B. (1998). Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 273, 10696-10701.
- Palmieri,C., Cheng,G.J., Saji,S., Zelada-Hedman,M., Warri,A., Weihua,Z., Van Noorden,S., Wahlstrom,T., Coombes,R.C., Warner,M., and Gustafsson,J.A. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* 9, 1-13.
- Pandis,N., Heim,S., Bardi,G., Limon,J., Mandahl,N., and Mitelman,F. (1992). Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer [published erratum appears in *Genes Chromosom Cancer* 1992 Nov;5(4):410]. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 14-20.
- Pappas,T.C., Gametchu,B., and Watson,C.S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* 9, 404-410.
- Pedram,A., Razandi,M., Aitkenhead,M., and Levin,E.R. (2005). Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J. Biol. Chem.* 280, 26339-26348.
- Pedram,A., Razandi,M., and Levin,E.R. (2006a). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol.* 20, 1996-2009.
- Pedram,A., Razandi,M., Sainson,R.C., Kim,J.K., Hughes,C.C., and Levin,E.R. (2007b). A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 282, 22278-22288.
- Pedram,A., Razandi,M., Wallace,D.C., and Levin,E.R. (2006b). Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 17, 2125-2137.
- Peluso,J.J., Fernandez,G., Pappalardo,A., and White,B.A. (2001). Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 65, 94-101.
- Pietras,R.J. and Szego,C.M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265, 69-72.
- Pike,M.C. (2005). The role of mammographic density in evaluating changes in breast cancer risk. *Gynecol. Endocrinol.* 21 *Suppl* 1, 1-5.

- Powell,C.E., Soto,A.M., and Sonnenschein,C. (2001). Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen-target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77, 97-108.
- Powell,C.E., Watson,C.S., and Gametchu,B. (1999). Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine*. 10, 271-280.
- Price,T.M., Hansen,E.L., and Oliver,T.N. (2005). Immunofluorescent localization of a novel progesterone receptor(s) in a T47D-Y breast cancer cell line lacking genomic progesterone receptor expression. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12, 610-616.
- Qiu,M., Olsen,A., Faivre,E., Horwitz,K.B., and Lange,C.A. (2003). Mitogen Activated Protein Kinase Regulates Nuclear Association of Human Progesterone Receptors. *Mol. Endocrinol.*
- Razandi,M., Alton,G., Pedram,A., Ghonshani,S., Webb,P., and Levin,E.R. (2003a). Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* 23, 1633-1646.
- Razandi,M., Oh,P., Pedram,A., Schnitzer,J., and Levin,E.R. (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.* 16, 100-115.
- Razandi,M., Pedram,A., Greene,G.L., and Levin,E.R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.* 13, 307-319.
- Razandi,M., Pedram,A., Rosen,E.M., and Levin,E.R. (2004). BRCA1 inhibits membrane estrogen and growth factor receptor signaling to cell proliferation in breast cancer. *Mol. Cell Biol.* 24, 5900-5913.
- Revankar,C.M., Cimino,D.F., Sklar,L.A., Arterburn,J.B., and Prossnitz,E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- Robertson,J.F., Willsher,P.C., Winterbottom,L., Blamey,R.W., and Thorpe,S. (1999). Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *Eur. J. Cancer* 35, 214-218.
- Rose,J.D. and Moore,F.L. (1999). A neurobehavioral model for rapid actions of corticosterone on sensorimotor integration. *Steroids* 64, 92-99.
- Rousseau-Merck,M.F., Misrahi,M., Loosfelt,H., Milgrom,E., and Berger,R. (1987). Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum. Genet.* 77, 280-282.
- Russell,K.S., Haynes,M.P., Sinha,D., Clerisme,E., and Bender,J.R. (2000). Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5930-5935.

- Russo, J. and Russo, I.H. (1995). Hormonally induced differentiation: a novel approach to breast cancer prevention. *J. Cell Biochem. Suppl.* 22, 58-64.
- Saji, S., Jensen, E.V., Nilsson, S., Rylander, T., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2000). Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 337-342.
- Salatino, M., Beguelin, W., Peters, M.G., Carnevale, R., Proietti, C.J., Galigniana, M.D., Vedoy, C.G., Schillaci, R., Charreau, E.H., Sogayar, M.C., and Elizalde, P.V. (2006). Progesterin-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 25, 7723-7739.
- Saner, K.J., Welter, B.H., Zhang, F., Hansen, E., Dupont, B., Wei, Y., and Price, T.M. (2003a). Cloning and expression of a novel, truncated, progesterone receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* 200, 155-163.
- Schiff, R., Massarweh, S.A., Shou, J., Bharwani, L., Arpino, G., Rimawi, M., and Osborne, C.K. (2005). Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56 Suppl 1, 10-20.
- Schneider, W., Ramachandran, C., Satyaswaroop, P.G., and Shyamala, G. (1991). Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton 'A' form. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38, 285-291.
- Selmin, O., Lucier, G.W., Clark, G.C., Tritscher, A.M., Vanden Heuvel, J.P., Gastel, J.A., Walker, N.J., Sutter, T.R., and Bell, D.A. (1996). Isolation and characterization of a novel gene induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis* 17, 2609-2615.
- Selye, H. (1941). ON THE HORMONAL ACTIVITY OF A STEROID COMPOUND. *Science* 94, 94.
- Shyamala, G., Schneider, W., and Schott, D. (1990). Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology* 126, 2882-2889.
- Shyamala, G., Yang, X., Cardiff, R.D., and 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.
- Simoncini, T., Scorticati, C., Mannella, P., Fadiel, A., Giretti, M.S., Fu, X.D., Baldacci, C., Garibaldi, S., Caruso, A., Fornari, L., Naftolin, F., and Genazzani, A.R. (2006). Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol. Endocrinol.* 20, 1756-1771.
- Singletary, S.E. (2003). Rating the risk factors for breast cancer. *Ann. Surg.* 237, 474-482.
- Skafar, D.F. (1991). Differences in the binding mechanism of RU486 and progesterone to the progesterone receptor. *Biochemistry* 30, 10829-10832.

- Song,R.X., Barnes,C.J., Zhang,Z., Bao,Y., Kumar,R., and Santen,R.J. (2004). The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 2076-2081.
- Stabile,L.P., Davis,A.L.G., Gubish,C.T., Hopkins,T.M., Luketich,J.D., Christie,N., Finkelstein,S., and Siegfried,J.M. (2002). Human Non-Small Cell Lung Tumors and Cells Derived from Normal Lung Express Both Estrogen Receptor {alpha} and {beta} and Show Biological Responses to Estrogen. *Cancer Research* 62, 2141-2150.
- Steiner,A.L., Kipnis,D.M., Utiger,R., and Parker,C. (1969). Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 64, 367-373.
- Steinsapir,J., Socci,R., and Reinach,P. (1991). Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 90-96.
- Sukocheva,O., Wadham,C., Holmes,A., Albanese,N., Verrier,E., Feng,F., Bernal,A., Derian,C.K., Ullrich,A., Vadas,M.A., and Xia,P. (2006). Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell Biol.* 173, 301-310.
- Swantek,J.L., Cobb,M.H., and Geppert,T.D. (1997b). Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell Biol.* 17, 6274-6282.
- Szego,C.M. and Davis,J.S. (1967). Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 58, 1711-1718.
- Tanenbaum,D.M., Wang,Y., Williams,S.P., and Sigler,P.B. (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5998-6003.
- Thomas,P., Pang,Y., Dong,J., Groenen,P., Kelder,J., de Vlieg,J., Zhu,Y., and Tubbs,C. (2007). Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology* 148, 705-718.
- Thomas,P., Pang,Y., Filardo,E.J., and Dong,J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632.
- Tian,J., Kim,S., Heilig,E., and Ruderman,J.V. (2000). Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 14358-14363.
- Tonetti,D.A. and Jordan,V.C. (1997). The role of estrogen receptor mutations in tamoxifen-stimulated breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 119-128.
- Tung,L., Mohamed,M.K., Hoeffler,J.P., Takimoto,G.S., and Horwitz,K.B. (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.

Turner,T.T., Jones,C.E., Howards,S.S., Ewing,L.L., Zegeye,B., and Gunsalus,G.L. (1984). On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology* 115, 1925-1932.

Vallejo,G., Ballare,C., Baranao,J.L., Beato,M., and Saragueta,P. (2005). Progesterin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor beta induces proliferation of endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol.* 19, 3023-3037.

Vanzulli,S., Efeyan,A., Benavides,F., Helguero,L., Peters,G., Shen,J., Conti,C.J., Lanari,C., and Molinolo,A. (2002). p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogestin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. *Carcinogenesis* 23, 749-757.

Vargo-Gogola,T. and Rosen,J.M. (2007a). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* 7, 659-672.

Vazquez,S.M., Mladovan,A., Garbovesky,C., Baldi,A., and Luthy,I.A. (2004). Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. *J. Cell Physiol* 199, 460-469.

Vegeto,E., Allan,G.F., Schrader,W.T., Tsai,M.J., McDonnell,D.P., and O'Malley,B.W. (1992). The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* 69, 703-713.

Vegeto,E., Shahbaz,M.M., Wen,D.X., Goldman,M.E., O'Malley,B.W., and McDonnell,D.P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7, 1244-1255.

Vivacqua,A., Bonofiglio,D., Recchia,A.G., Musti,A.M., Picard,D., Ando,S., and Maggiolini,M. (2006). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 20, 631-646.

Vorherr,H. and Messer,R.H. (1978). Breast cancer: potentially predisposing and protecting factors. Role of pregnancy, lactation, and endocrine status. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130, 335-358.

Wang,Z., Zhang,X., Shen,P., Loggie,B.W., Chang,Y., and Deuel,T.F. (2006). A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 9063-9068.

Wargon,V., Helguero,L.A., Bolado,J., Rojas,P., Novaro,V., Molinolo,A., and Lanari,C. (2008a). Reversal of antiprogestin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*

- Wargon,V., Helguero,L.A., Bolado,J., Rojas,P., Novaro,V., Molinolo,A., and Lanari,C. (2008d). Reversal of antiprogesterin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*
- Watson,C.S., Medina,D., and Clark,J.H. (1979). Characterization and estrogen stimulation of cytoplasmic progesterone receptor in the ovarian-dependent MXT-3590 mammary tumor line. *Cancer Res.* 39, 4098-4104.
- Wehling,M., Kasmayr,J., and Theisen,K. (1991). Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am. J. Physiol* 260, E719-E726.
- Wei,L.L., Norris,B.M., and Baker,C.J. (1997). An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 287-297.
- Welter,B.H., Hansen,E.L., Saner,K.J., Wei,Y., and Price,T.M. (2003). Membrane-bound progesterone receptor expression in human aortic endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1049-1055.
- Wen,D.X., Xu,Y.F., Mais,D.E., Goldman,M.E., and McDonnell,D.P. (1994). The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell Biol.* 14, 8356-8364.
- White,S.N., Jamnongjit,M., Gill,A., Lutz,L.B., and Hammes,S.R. (2005). Specific modulation of nongenomic androgen signaling in the ovary. *Steroids* 70, 352-360.
- Wilson,M.E., Liu,Y., and Wise,P.M. (2002). Estradiol enhances Akt activation in cortical explant cultures following neuronal injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 102, 48-54.
- Wyckoff,M.H., Chambliss,K.L., Mineo,C., Yuhanna,I.S., Mendelsohn,M.E., Mumby,S.M., and Shaul,P.W. (2001). Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J. Biol. Chem.* 276, 27071-27076.
- Yada-Hashimoto,N., Nishio,Y., Ohmichi,M., Hayakawa,J., Mabuchi,S., Hisamoto,K., Nakatsuji,Y., Sasaki,H., Seino-Noda,H., Sakata,M., Tasaka,K., and Murata,Y. (2006). Estrogen and raloxifene inhibit the monocytic chemoattractant protein-1-induced migration of human monocytic cells via nongenomic estrogen receptor alpha. *Menopause.* 13, 935-941.
- Yamada,Y. (1979). Effects of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. *Brain Res.* 172, 165-168.
- Younglai,E.V., Wu,Y., Foster,W.G., Lobb,D.K., and Price,T.M. (2006). Binding of progesterone to cell surfaces of human granulosa-lutein cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101, 61-67.
- Yu,X., Rajala,R.V., McGinnis,J.F., Li,F., Anderson,R.E., Yan,X., Li,S., Elias,R.V., Knapp,R.R., Zhou,X., and Cao,W. (2004b). Involvement of insulin/phosphoinositide

3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J. Biol. Chem.* 279, 13086-13094.

Yu,X., Rajala,R.V., McGinnis,J.F., Li,F., Anderson,R.E., Yan,X., Li,S., Elias,R.V., Knapp,R.R., Zhou,X., and Cao,W. (2004a). Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J. Biol. Chem.* 279, 13086-13094.

Zhang,Z., Maier,B., Santen,R.J., and Song,R.X. (2002). Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 926-933.

Zhu,Y., Bond,J., and Thomas,P. (2003a). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2237-2242.

Zhu,Y., Rice,C.D., Pang,Y., Pace,M., and Thomas,P. (2003b). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2231-2236.