

Tesis Doctoral

Papel de los receptores de estrógenos alfa en el crecimiento de carcinomas mamarios murinos con respuesta diferencial a progestágenos

Giulianelli, Sebastián Jesús

2009

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:

Giulianelli, Sebastián Jesús. (2009). Papel de los receptores de estrógenos alfa en el crecimiento de carcinomas mamarios murinos con respuesta diferencial a progestágenos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giulianelli, Sebastián Jesús. "Papel de los receptores de estrógenos alfa en el crecimiento de carcinomas mamarios murinos con respuesta diferencial a progestágenos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

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

**PAPEL DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS
ALFA EN EL CRECIMIENTO DE CARCINOMAS
MAMARIOS MURINOS CON RESPUESTA
DIFERENCIAL A PROGESTÁGENOS**

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

Sebastián Jesús Giulianelli

Director de Tesis: Claudia L. M. Lanari

Consejero de Estudios: Norberto Iusem

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires, 2009.

AGRADECIMIENTOS

A Claudia, por ser mi directora de tesis y permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. Por su comprensión, paciencia e incondicionalidad, por la discusión de los resultados, y sobre todo por ser tan buena persona.

A todos mis compañeros del laboratorio, por ser tan AMIGOS. A María por su ayuda incondicional en cultivo, a Caro, por sus rimas, por enseñarme el EMSA y por corregir parte de este manuscrito, a Virgi por corregir parte de este manuscrito, a Rocío por ayudarme con las inmunos, a Juan, a Ceci, a Vicky y a Paola. A Juli por su ayuda en el bioterio, y a Pablo por su ayuda con el confocal. A todos los chicos nuevos, en orden de llegada: Ana, Marina, Laura, Tomás y Betina.

A Ari y a Marina, Gracias a todos!

Al CONICET, por su apoyo económico con la beca de doctorado tipo I.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) donde realicé este trabajo de investigación.

A la Fundación Sales por su apoyo económico con subsidios para el desarrollo de esta investigación.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por los subsidios provistos al laboratorio durante estos años.

A la fundación AVON, por las becas otorgadas para participar de los congresos de la AACR 2006, 2007, 2008, y 2009, donde pude presentar los resultados de esta tesis.

A la UICC, por la beca ICRETT otorgada en el año 2006 para poder llevar a cabo los estudios de *microarrays* en el laboratorio del doctor Charles Perou.

Al doctor Charles Perou, por recibirme en su laboratorio, y a Jason Herschkowitz por capacitarme para llevar a cabo los estudios de *microarrays*.

Al doctor Silvio Gutking, por recibirme en su laboratorio, donde pude realizar los experimentos de LCM.

A Vyomesh Patel, por enseñarme a usar el LCM, por su buena predisposición y amabilidad.

A Alfredo Molinolo y su familia, por alojarme en su casa.

A la doctora Elisa Bal, por prestarnos gentilmente la línea celular LM3.

A Kate Horwitz, por compartirnos la línea celular T47D-YA.

A Laboratorios Aztrazeneca, por proveernos el ICI 182.780.

A Laboratorios Craveri, por proveernos el MPA.

Muy especialmente a mis viejos, sin ellos esto no sería posible. Gracias por apoyarme y respetarme en todo momento. A mis hermanas, Vanina y Daniela; y a mis abuelos.

A Viqui.....gracias sobre todo por ser coautora del proyecto más importante de nuestras vidas.

A Viqui y Lucia!

PAPEL DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL CRECIMIENTO DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS CON RESPUESTA DIFERENCIAL A PROGESTÁGENOS

Resumen

Los mecanismos por los cuales los estrógenos y los progestágenos, a través de sus respectivos receptores (RE y RP), participan en el desarrollo y crecimiento del cáncer de mama es un tema controversial y de gran interés. La detección de estos receptores se utiliza como factor pronóstico y direcciona la terapéutica hacia una de tipo hormonal, dirigida principalmente a bloquear la fuente de estrógenos o inhibir la acción del RE. Sin embargo, han aparecido en los últimos años numerosas evidencias que implican a los RP en el desarrollo y progresión de carcinomas mamarios.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por la administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona (MPA) en ratones hembras vírgenes de la cepa BALB/c. Se establecieron líneas tumorales hormono-dependientes (HD) y hormono-independientes (HI) que expresan RE, *alfa* y *beta*, y las dos isoformas del RP (RP_A y RP_B). Se ha demostrado que el RP es fundamental en el crecimiento de estos tumores, tanto en los HD como en los HI. El tratamiento con antiprogestágenos u oligonucleótidos antisentido para el RP, inducen regresión de ambas variantes tumorales. Paradójicamente los estrógenos inducen regresión tumoral, mientras que el tamoxifeno inhibe el crecimiento tumoral. En estudios preliminares observamos que el antiestrógeno puro ICI 182.780, inhibe *in vitro*, la estimulación inducida por el MPA sobre células epiteliales tumorales HD. Todas estas observaciones nos llevaron a investigar qué papel cumple el RE α , además del RP, en el crecimiento de estos tumores. Utilizamos la línea C4-HD como prototipo de tumor HD, y su variante C4-HI, capaz de crecer en ausencia de la administración de hormonas. Asimismo, teniendo en cuenta las líneas de trabajo llevadas a cabo en el laboratorio que sugerían que el estroma tumoral participaba en el crecimiento tumoral HI, quisimos investigar la participación de fibroblastos asociados a tumor (CAF's) en la activación de los

RP, e investigar si los RE α podrían estar también involucrados en la proliferación epitelial inducida por CAFs. Si bien en un principio pretendimos abarcar a los RE β en este estudio, dada la complejidad de las interacciones observadas con el RE α , decidimos abocarnos sólo a éste último.

En cultivos primarios de células epiteliales o en tumores creciendo *in vivo*, observamos que el MPA induce la expresión, fosforilación y activación del RE α en tumores HD, mientras que en los HI, éstos se encontrarían basalmente fosforilados y activos. La inhibición farmacológica o génica del RE α indujo una inhibición de la proliferación celular de la misma manera que anteriormente se había observado al inhibir el RP. Esta inhibición fue lograda aún en presencia del RP. *In vivo* el antiestrógeno puro inhibió completamente el crecimiento tumoral inducido por MPA, mientras que indujo efectos inhibitorios en el tumor HI. Los resultados sugieren la necesidad de un RE α presente y activado en forma ligando independiente en el crecimiento de ambas variantes tumorales. Demostramos además que la expresión del RP, si bien es modulable por estrógenos, no sería totalmente dependiente del RE α .

Por otra parte, detectamos interacción nuclear entre el RE α y el RP en tumores creciendo *in vivo*, y en células epiteliales C4-HD *in vitro*, en un mecanismo regulado por el MPA. Estos resultados fueron corroborados usando anticuerpos que reconocen a los receptores fosforilados sugiriendo que los receptores estarían activos transcripcionalmente. Si bien ya estaba reportada la interacción citoplasmática entre el RP_B y el RE α , no hay datos aún que demuestren la interacción nuclear entre el RP_A y el ER α . Teniendo en cuenta que el 17 β -estradiol (E2) y el ICI indujeron una disminución de la colocalización de ambos receptores sugerimos que dicha interacción es imprescindible para inducir el crecimiento tumoral. Quisimos evaluar si se trataba de una particularidad de nuestro modelo experimental y estudiamos la interacción de los mismos receptores en la línea de cáncer de mama humano T47D, en la cual pudimos observar que ambos receptores también interaccionan en el núcleo. La diferencia importante entre ambos modelos radica en el hecho que la línea T47D es estimulada por E2, además de progesterona, mientras que nuestros tumores son inhibidos por E2.

En estudios previos hemos demostrado la participación de los *CAFs*, en el crecimiento tumoral HI. Vimos que el FGF-2 está más expresado en *CAFs* de tumores HI en cultivo, que en los *CAFs* HD y que es capaz de activar al RP. En este trabajo mostramos que los *CAFs* HI son más eficientes que los *CAFs* HD en estimular la activación del RP, y demostramos además que los antagonistas estrogénicos también inhiben la estimulación inducida por el FGF-2, mostrando nuevamente un paralelismo entre la estimulación inducida por MPA y la estimulación inducida por *CAFs*.

Interesados por las diferencias observadas entre los *CAFs* HD y los *CAFs* HI en regular el crecimiento celular y activar los receptores hormonales, el siguiente objetivo planteado fue caracterizar de forma molecular, a través de *microarrays* de ADN, la participación del MPA en el crecimiento tumoral HD, como así también, obtener información sobre las diferencias entre el crecimiento tumoral HD y HI, y la participación del estroma y del epitelio en la adquisición del fenotipo HI.

Los resultados mostraron que en ausencia del MPA, un mayor número de genes resultaron sobreexpresados en tumores C4-HD en comparación a la condición proliferativa con el progestágeno. Genes asociados con arresto del ciclo celular se vieron incrementados en el tumor sin MPA, mientras que curiosamente en el tumor creciendo en presencia del MPA, uno de los genes sobreexpresados fue el FGF-2.

Pudimos establecer diferencias en los patrones de expresión génica entre tumores C4-HD y C4-HI; mientras que por estudios de *Laser capture microdissection (LCM)* acoplados a *microarrays* de ADN, confirmamos que tanto el parénquima como el estroma de tumores HI, son diferentes a los del tumor HD. Observamos alta expresión de metaloproteasas y genes relacionados a mecanismos de reparación de heridas y quimiotaxis, en el estroma C4-HI.

Las evidencias sustentan la hipótesis de la participación del estroma en la adquisición del fenotipo HI, dado que cambios en el compartimiento estromal podrían causar cambios en las señales parácrinas que modifiquen el comportamiento del tumor, a través de mecanismos que involucren tanto la activación del RP como del RE α .

Palabras clave: Cáncer de mama, acetato de medroxiprogesterona, receptor de progesterona, receptor de estrógenos *alfa*.

ROLE OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA IN MURINE MAMMARY CARCINOMA TUMOR GROWTH WITH DIFFERENT PROGESTIN RESPONSIVENESS

Summary

The mechanisms by which estrogens and progestins activate estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) respectively, is still a main and controversial area in breast cancer research. The detection of these receptors is used as a prognostic factor and patients with high levels of ER and PR will be treated with a hormone therapy aimed to block estrogen synthesis or to inhibit ER activation. There is however compelling evidence that points out that PR is also involved in the development and progression of breast carcinomas.

In our Laboratory we have developed an experimental model of mammary carcinomas induced by the continuous administration of medroxyprogesterone acetate (MPA) into BALB/c female mice. This procedure gave rise to MPA-dependent tumors (HD) that are maintained by syngeneic transplantations in MPA-treated mice. Spontaneously, tumors which are able to grow without exogenous hormone supply may arise, and these are referred to as hormone independent tumors (HI). Both tumor types express ER alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$), and both isoforms of PR (PR_A and PR_B). We have already demonstrated that PR play a key role mediating tumor growth in both tumor types since antisense oligonucleotides of PR and different antiprogestins inhibit their growth. Interestingly, estrogens (E2) also induce tumor regression, while tamoxifen inhibits tumor growth. In previous studies we observed that the pure antiestrogen ICI 182780 was able to inhibit MPA-induced cell proliferation *in vitro*. All these observations prompted us to study the role of $ER\alpha$ in tumor growth in the MPA-induced breast cancer model. In this study we used the C4-HD, as a representative of HD tumors, and its HI variant, C4-HI.

In addition, and considering previous works from our Lab which suggested that the tumor stroma participates in the acquisition of hormone independence, we have evaluated if carcinoma associated fibroblasts (CAFs) from HI tumors had a different ability than

CAFs from HD tumors to activate PR and cell proliferation. We also evaluated if ER α is involved in CAF-induced proliferative effects.

We demonstrated that MPA induced the expression, phosphorylation and activation of ER α in HD tumors growing *in vivo* or in primary cultures derived from the tumors. Interestingly, the ER α was already activated in HI tumors in the absence of MPA, but this constitutive activation was not enough to induce cell proliferation. The mitogenic signal that activates PR and induces cell proliferation is still needed *in vitro*. Furthermore, the pharmacological or genetic inhibition of ER α in both tumor types inhibited tumor growth, even when PR was not completely abolished, suggesting that ligand independent activation of ER α is needed for tumor growth. Similar results were previously obtained when we inhibit PR. Finally, all these results suggested that PR expression is not completely ER α dependent in this model.

Nuclear interaction between ER α and PR was observed in both tumors types growing *in vivo* and in C4-HD cells growing *in vitro* in the presence of MPA. These results were corroborated using different antibodies that recognize the phosphorylated forms of the receptors suggesting that they may be transcriptionally active. The cytosolic interaction between PR_B and ER α was already reported in the literature; however we described here a nuclear interaction of PR_A and ER α which seems to be necessary to mediate MPA-induced cell proliferation since it can be blocked by E2 and ICI 182780. The nuclear interaction of steroid receptors was not a particularity of our experimental model, since we found similar results in T47D cell. The most important difference between this model and ours lies in the fact that E2 stimulates T47D cells whereas it is inhibitory in the C4 cells.

In previous studies we have analyzed the role of CAFs in HI tumor growth. We have demonstrated that FGF-2 expression was higher in CAFs derived from HI tumors than in CAFs derived from HD ones and that FGF-2 was able to activate PR. In this study we demonstrated that CAFs from HI tumors had a higher stimulatory effect on cell proliferation and PR activation than CAFs from HD tumors. Estrogen antagonists could inhibit this CAFs-induced epithelial cell proliferation, suggesting a parallelism between the mechanisms underlying MPA-induced effects and CAFs-induced effects.

As we were interested in the differences found between CAFs HD and CAFs HI, activating PR, our next aim was to characterize by DNA microarrays the molecular portraits of C4-HD and C4-HI tumors. We searched for differences in C4-HD tumors in the presence or absence of MPA, and also differences between the tumor parenchyma and the stroma from C4-HI tumors and C4-HD tumors growing with MPA. For this purpose tumor parenchyma and stroma was dissected using Laser Capture Microdissection (LCM) and samples processed for microarray studies.

Interestingly, most of the genes were down regulated by MPA. Only 8 genes were up regulated in MPA-treated C4-HD tumors as compared with tumors in which MPA was removed. One of them was FGF-2. In tumors where MPA was removed, we registered increases in genes related with cell cycle arrest. We could establish patterns of gene expression from samples obtained by LCM confirming that the stroma from C4-HD and C4-HI tumors were different. The stroma of C4-HI tumors showed higher expression of metalloproteases, wound healing proteins and chemotactic factors than the stroma of C4-HD tumors.

All these evidences support the idea of an “activated” stroma participating in the acquisition of the HI phenotype, suggesting that paracrine signaling may be inducing tumor growth through the activation of both ER α and PR in the parenchyma compartment of the tumor.

Keywords: mammary carcinomas, medroxyprogesterone acetate, progesterone receptor, estrogen receptor *alfa*.

ABREVIATURAS

AR	Receptor de andrógenos
CAF	Fibroblastos asociados a carcinoma
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	Dominio de unión a ADN
DPN	<i>4-hydroxy-phenyl-propionitrile</i> (agonista selectivo del RE β)
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E2	17 β -estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	<i>Electrophoretic mobility gel shift assay</i>
Epi	Células epiteliales
ERE	Elemento respondedor a estrógenos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormona folículo estimulante
GR	Receptor de glucocorticoides
H ₂ O _d	Agua destilada
H&E	Tinción con hematoxilina-eosina
HRE	Elemento respondedor a hormonas
HRT	Terapia de reemplazo hormonal (<i>Hormone replacement therapy</i>)
HSP	Proteínas de <i>shock</i> térmico
ICI	ICI 182.780 o Fulvestrant
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmunoprecipitación
LBD	Dominio de unión al ligando
LH	Hormona luteinizante
LY	LY294002, inhibidor de la vía PI3K/Akt
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
MAPK o Erk1/2	Proteínas quinasas activadas por mitógenos p44/42
MR	Receptor de mineralocorticoides
OVX	Ovariectomía
PD	PD98059, inhibidor de la vía MEK1/MAPK

PD/HD	Progestágeno dependiente/Hormono-dependiente
PD/HI	Progestágeno independiente/Hormono-independiente
Pg	Progesterona
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKB/Akt	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	<i>Phenylmethanesulphonyl fluoride</i>
PPT	<i>4,4',4''-(4-propyl-(1H)-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol</i> (agonista selectivo del RE α)
PRE	Elemento respondedor a progestágenos
PRM	Moduladores del RP
RP	Receptor de progesterona
RP _A	Isoforma A del RP
RP _B	Isoforma B del RP
RP _C	Isoforma C del RP
RE α	Receptor de estrógenos <i>alpha</i>
RE β	Receptor de estrógenos <i>beta</i>
RU 486	RU 38.486 o mifepristona
SC	Subcutáneo
SERD	Disruptor selectivo del RE (<i>selective estrogen receptor disrupter</i>)
SERM	Modulador selectivo de receptores estrogénicos
SFB	Suero fetal bovino
SFBch	Suero fetal bovino charcolizado
SN	Sobrenadante
SR	Receptores para hormonas esteroideas (<i>steroid hormone receptors</i>)
Src	Tirosina-quinasa Src
Tam	Tamoxifeno
TAME	<i>Nα-p-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride</i>
TLCK	<i>Nα-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride</i>
TPCK	<i>N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone</i>
WB	Western blot
WHI	Estudio aleatorio de la Iniciativa para la Salud de la Mujer (<i>The Women's Health Initiative Randomized Trial</i>)

wt	<i>Wild type</i>
ZK 211	ZK 230211
ZK 299	ZK 98 299 u onapristona
ZPCK	<i>N-Carbobenzyloxy-L-phenylalanyl chloromethyl ketone</i>

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	viii
ABREVIATURAS.....	xi
Parte I. Introducción, Hipótesis y Objetivos	1
I. Glándula mamaria.....	2
II. Cáncer de mama	3
Cáncer de mama y hormonas.....	5
Marcadores predictivos en cáncer de mama.....	6
Tratamientos.....	7
III. Receptores hormonales.....	9
Receptores de estrógenos.....	10
Receptores de progesterona.....	15
Mecanismos no genómicos.....	20
IV. Estroma tumoral.....	25
V. <i>Microarrays</i> de ADN y cáncer de mama.....	28
VI. Modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios por progestágenos.....	30
Hipótesis.....	37
Objetivos.....	39
Parte II. Materiales y Métodos.....	41
I. Animales, tumores y líneas celulares.....	42
Animales.....	42
Tumores.....	42
Hormonas y antihormonas utilizadas <i>in vivo</i>	42
Tratamientos con antihormonas <i>in vivo</i>	43
Pasajes tumorales.....	43
Líneas celulares.....	43

II. Cultivo celular: medios y soluciones.....	44
III. Cultivos primarios.....	47
Repique de células.....	49
Ensayos de proliferación celular (Incorporación de ³ H-timidina).....	50
Recuento de células.....	51
Transfecciones.....	51
IV. Extractos tumorales y celulares.....	52
Extractos totales de tumor.....	52
Extractos nucleares de tumor.....	53
Extractos celulares totales.....	53
Extractos celulares nucleares.....	53
V. Cuantificación de proteínas: Método de Lowry.....	54
VI. Ensayos de Inmunoprecipitación (IP).....	55
VII. <i>Western blot</i>	55
VIII. Ensayos de <i>Mobility gel shift</i> (EMSA).....	59
IX. Inmunohistoquímica.....	62
X. Inmunofluorescencia (IF).....	63
Cortes en parafina.....	64
Cultivos primarios.....	64
Ensayo de colocalización nuclear del RP y el RE α por IF, en células epiteliales en cultivo.....	65
Ensayo de colocalización nuclear del RP y el RE α por IF, a partir de tumores creciendo <i>in vivo</i>	66
Incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) por IF.....	66
XI. Análisis estadístico.....	67
XII. Ensayos de <i>Microarrays</i> de ADN.....	68
Procesamiento de los tejidos y <i>Laser Capture Microdissection (LCM)</i>	68
Extracción de <i>RNA</i> total y amplificación lineal.....	69
Hibridizaciones sobre los <i>microarrays</i> de ADN y análisis de datos.....	70
Parte III. Resultados.....	72
CAPITULO I.....	73
I. Fosforilación y activación del receptor de estrógenos <i>alfa</i>	73

A. Nivel de expresión y fosforilación del RE α en tumores C4-HD y C4-HI <i>in vivo</i>	73
B. Nivel de fosforilación basal del RE α en cultivo primario de células epiteliales tumorales.....	77
C. Participación de las vías PI3K/Akt y MEK1/MAPK en la fosforilación del RE α	79
D. Fosforilación del RE α inducida por MPA.....	82
E. Unión del RE α a su elemento respondedor en el ADN.....	86
II. Participación del RE α en la proliferación celular inducida por MPA y en la expresión del RP.....	89
A. Rol del RE α en los niveles de expresión del RP.....	89
B. Rol del RE α en la proliferación celular mediada por MPA.....	92
C. Efecto del ICI en el crecimiento tumoral hormono-dependiente e independiente, <i>in vivo</i>	97
III. Interacción entre receptores de estrógenos <i>alfa</i> y receptores de progesterona....	99
A. Interacción nuclear entre RP y RE α en tumores C4-HD y C4-HI <i>in vivo</i>	99
B. MPA induce colocalización nuclear entre el RP y el RE α	102
C. MPA induce colocalización nuclear entre las formas fosforiladas del RP y el RE α	104
D. MPA induce colocalización nuclear entre el RP y el RE α en la línea tumoral humana T47D.....	109
IV. Estroma tumoral y receptores hormonales.....	115
CAPITULO II.....	123
I. Patrón de expresión génica correspondiente a tumores creciendo <i>in vivo</i>	123
A. Cambios en el perfil de expresión génica mediado por MPA en tumores C4-HD.....	123
B. Diferencias en el perfil de expresión génica entre tumores C4-HD y C4-HI.....	125
II. Análisis de los perfiles de expresión génica entre estroma y parénquima tumoral obtenidos de tumores C4-HD y C4-HI.....	129
A. Análisis de los genes específicos del microambiente tumoral.....	132
B. Análisis de los genes específicos del parénquima tumoral.....	135
C. Validación de los resultados obtenidos en los ensayos	

de <i>microarrays</i> de ADN.....	139
Parte IV. Discusión.....	143
Parte V. Conclusiones.....	165
Parte VI. Apéndice.....	171
Parte VII. Bibliografía.....	181

PARTE I

INTRODUCCI ÓN

HI PÓTESI S

OBJETI VOS

I. Glándula mamaria

Al nacimiento, la glándula mamaria consiste de un sistema ductal rudimentario, y el grado de desarrollo depende de los niveles hormonales maternos. A los dos años de edad, la mama sufre una involución, y se mantiene como un primitivo sistema ductal sin alvéolos hasta el inicio de la pubertad. Es en este punto cuando la secreción de FSH y LH por la glándula pituitaria, estimula a los folículos ováricos a liberar 17β -estradiol (E2). Esta hormona actúa sobre la mama, a través de su receptor, el RE, induciendo proliferación y crecimiento del tejido ductal, conectivo y vascular. Con el inicio del ciclo menstrual ovulatorio, se sintetiza y se libera progesterona (Pg, fase luteal), y se forman los elementos lobuloadveolares maduros en la mama. Este desarrollo de la glándula por Pg, es a través de su receptor, el receptor de progesterona (RP). El rol de la Pg y el RP en el desarrollo de la mama, proviene de estudios en ratones *knockout* para el RP. Los estrógenos o el E2, juegan un rol muy importante en la acción de la Pg, dado que regulan la expresión del RP. Aproximadamente el 12 % de las células epiteliales son RP positivas. La mama alcanza su máximo desarrollo durante la preñez, donde se exhibe un aumento en el número y tamaño de los lóbulos, en parte debido a los elevados niveles de E2 y Pg. Luego de la menopausia, con la cesación de la función ovárica, la mama sufre una regresión resultando en un incremento en el número de lóbulos pequeños y una reducción en el número de lóbulos mayores (Figura 1.1; Aupperlee et al., 2005a).

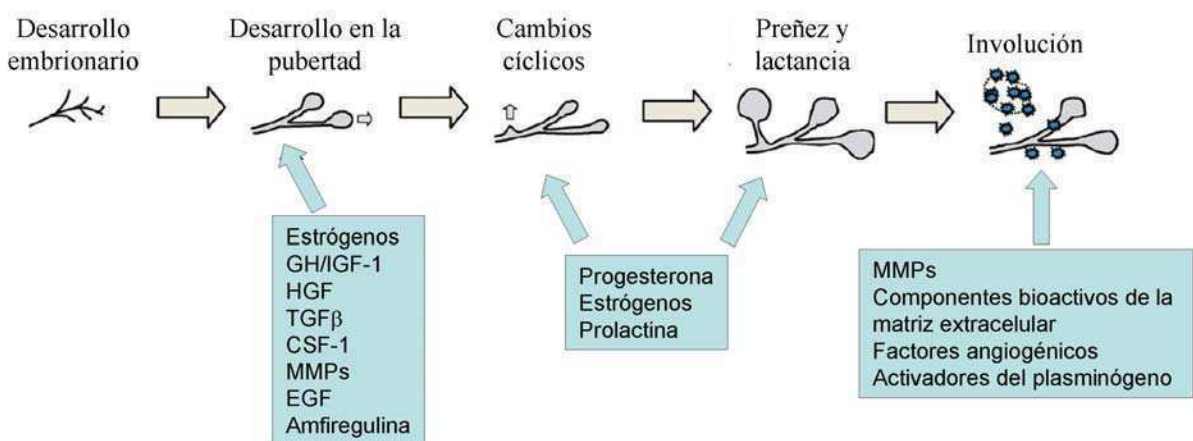


Figura 1.1. Esquema del desarrollo de la glándula mamaria y los diversos factores que cumplen un rol central en este proceso. Tomado de Lanigan et al., 2007.

II. Cáncer de Mama

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte (superado recientemente por el cáncer de pulmón) en mujeres de los países industrializados (Parkin, 2004). 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, se detalla el porcentaje estimado de nuevos casos y de muertes por cáncer en el año 2009 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.



*Excludes basal and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

©2009, American Cancer Society, Inc., Surveillance and Health Policy Research

Tabla 1.1. Muertes y nuevos casos de cáncer en EEUU para hombres y mujeres estimados en el año 2009. Datos *American Cancer Society*.

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 (Russo and Russo, 2006). 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 postmenopáusicas.
- 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 representa menos del 5% de todos los cánceres de mama.

Con respecto a la edad de menarca y menopausia, se observó que cuanto más temprana es la edad de menarca, más alto es el riesgo de cáncer de mama. El efecto protector de una menopausia temprana así como también una menarca tardía demuestran que la exposición durante los ciclos menstruales normales al E2 y/o 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. La nuliparidad, un primer embarazo tardío y tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos implican una exposición prolongada a picos de estrógeno durante el ciclo menstrual, el cual aumentaría el riesgo de contraer la enfermedad. El amamantamiento tiene un efecto protector sobre la mama ya que induce la diferenciación del tejido mamario (Russo et al., 2005). La obesidad y el consumo de dietas ricas en grasas y proteínas aumentan el riesgo de contraer la enfermedad ya que estaría asociado a los altos niveles de estrógenos circulantes formados a partir de la aromatización de la androstenediona en el tejido adiposo (Franks and Teich, 1997; Cotran et al., 1999).

Cáncer de mama y hormonas

A pesar de que la mayoría de las evidencias apuntan a los estrógenos como principales responsables, se ha sugerido últimamente que la Pg puede tener importancia en el proceso de transformación de la glándula mamaria. Las siguientes observaciones estarían relacionadas con dicho riesgo:

- a. Un comienzo temprano de los ciclos ovulatorios regulares.
- b. Los anticonceptivos orales combinados de estrógenos y Pg en mujeres jóvenes asociados a un pequeño incremento en la incidencia de tumores (Thomas, 1993).
- c. Es controvertido el efecto de la inoculación de anticonceptivos de acción prolongada, por ejemplo el acetato de medroxiprogesterona (MPA) *depot* como factor de riesgo (Selman et al., 1995).
- d. Existe un aumento de riesgo de contraer cáncer de mama con la terapia conjunta de progestágenos y estrógenos en la postmenopausia (Thomas, 1991).

Durante años se postuló que los efectos proliferativos de los estrógenos y diferenciadores de la Pg en el útero eran extrapolables a la glándula mamaria (Aupperlee et al., 2005a). En los últimos años han surgido sin embargo, numerosas evidencias epidemiológicas que se han sumado a las experimentales que apuntan a un papel protagónico de los progestágenos en cáncer de mama (Hofseth et al., 1999; Greiser et al., 2005; Rossouw et al., 2002).

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 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).

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).

Marcadores predictivos en cáncer de mama

Se pueden definir como factores capaces de predecir la sensibilidad o resistencia a un tratamiento específico (Duffy, 2005). Los marcadores mas ampliamente utilizados son el estudio de la presencia del REalfa ($RE\alpha$) y del RP, asociados con un beneficio de la terapia endócrina adyuvante (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). Mas del 60% de los cánceres de mama invasivos expresan RE, mientras que entre el 50-60% de las mujeres con tumores positivos para el RE, responden a la terapia endócrina (McGuire, 1975; Jordan and Brodie, 2007). Posteriormente se demostró que el 70-80% de los tumores que expresaban ambos receptores, $RE\alpha$ y RP, luego de ser tratados con terapia hormonal presentaban un período libre de enfermedad mayor (McGuire, 1980). La expresión de ambos receptores es altamente indicativa de un $RE\alpha$ 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 deja de ser efectivo luego de un cierto tiempo; la enfermedad recurre y se disemina (Tonetti and Jordan, 1997). Otro marcador utilizado en la actualidad es HER-2/neu (o *ErbB2*), miembro de la superfamilia de receptores tirosina-quinasa pero que, a diferencia de HER-1 (también denominado receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR), 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 aumento 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).

Tratamientos

Luego del diagnóstico, el tratamiento a seguir depende del estadio de la enfermedad, y de factores patológicos como la expresión de receptores hormonales y el grado tumoral (Moulder et al., 2008). La primera decisión es la cirugía, y la evaluación del ganglio centinela. 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. En los casos en que se haya desarrollado metástasis ósea, se utilizan también los bisfosfonatos (Coleman, 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 tirosina-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, o contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), por ejemplo (Moulder et al., 2008). 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 con moduladores selectivos del RE (SERMs), pudiendo actuar de manera diferencial dependiendo del tejido en el cual se encuentren. El SERM que se utiliza actualmente es el Tamoxifeno. Sin embargo, dada su actividad agonista en el útero, se está intentando reemplazarlo por otros SERMs, como por ejemplo el Raloxifeno. Además de los SERMs se encuentran en estudio otros compuestos como el Fulvestrant (FaslodexTM, ICI 182.780), considerado como un antiestrógeno puro o regulador negativo selectivo del 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 mismo (Dauvois et al., 1993). El problema de este compuesto es que, al ser antagonista puro, priva al paciente de los efectos beneficiosos de los estrógenos en otros tejidos. Lo mismo sucede en las terapias con inhibidores de aromataasa, que inhiben la producción periférica de E2 en pacientes postmenopáusicos (Brueggemeier et al., 2005).

Gran parte de la investigación básica en cáncer de mama utiliza líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y T47D) que son positivas para el RE α , requieren del E2 para proliferar, y sufren apoptosis cuando son privadas de la hormona (Lewis et al., 2005a). De manera tal que las estrategias actuales para inhibir el crecimiento de tumores RE α +, son: inhibir la unión del E2 a su receptor, por tratamiento con tamoxifeno; bloquear la síntesis de E2, utilizando inhibidores de aromatasa; o reducir los niveles del RE α empleando el antiestrógeno puro Fulvestrant. Recientemente se ha visto que el E2 es capaz de inducir apoptosis en ciertos tipos celulares (células inmunes, células derivadas de hueso; Hughes et al., 1996), y en líneas celulares de cáncer de mama humano que han desarrollado resistencia a tamoxifeno (por tratamiento excesivo con antihormonas, MCF-7-Tam; Osipo et al., 2004), en aquellas que se hacen resistentes a la privación de E2 para crecer, MCF-7:5C o MCF-7 LTED (Lewis et al., 2005b; Lewis et al., 2005a; Song et al., 2001), o en aquellas que sobreexpresan PKC α , T47D:A18/PKC α (Lin et al., 2006; Zhang et al., 2009). Lo que estos autores observaron en las líneas MCF-7:5C tratadas con E2, fue un incremento en la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bax o Bak, pérdida del potencial de membrana mitocondrial e incremento en la liberación del citocromo c, todos eventos relacionados a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Lewis et al., 2005a). Mientras que en la línea MCF-7 LTED, el tratamiento con E2 produjo apoptosis mediada por receptores de muerte, FAS/FASL (Song and Santen, 2003). El mismo mecanismo de apoptosis fue demostrado en tumores desarrollados a partir de la línea T47D:A18/PKC α *in vivo*, por tratamiento con E2 (Zhang et al., 2009). Finalmente, estos autores proponen una terapia con bajas dosis de E2 en pacientes que han desarrollado resistencia a inhibidores de aromatasa, es decir, esos tumores son capaces de crecer en ausencia de E2, o en aquellos que sobreexpresan PKC α (Zhang et al., 2009; Lewis et al., 2005a). Es interesante aclarar que los estrógenos han sido utilizados en la terapia del cáncer de mama antes del advenimiento del tamoxifeno, con muy buenos efectos terapéuticos pero diversos efectos colaterales (Carter et al., 1977).

Teniendo en cuenta que el E2 regula la síntesis del RP (Kastner et al., 1990; Petz and Nardulli, 2000; Petz et al., 2002; Schultz et al., 2003), que existe una asociación entre el gen BRCA mutado y un aumento del RP (King et al., 2004), y que los RP median acciones proliferativas en la glándula mamaria, parecería razonable utilizar agentes que bloqueen al RP en 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 del RP podría beneficiarse de una terapia con antiprogéstágenos.

La Mifepristona (RU 486) fue el primer antagonista de la Pg desarrollado que exhibió actividad antiprogéstágeno en humanos. Desde entonces han surgido varios compuestos análogos cuya acción va desde antagonistas puros hasta antagonistas-agonistas mixtos, conocidos en el presente como moduladores del RP (PRM). El RU 486 entra en esta segunda categoría ya que puede funcionar como un agonista parcial bajo ciertas circunstancias celulares cuando activa a la isoforma B del RP (RP_B), no así cuando se une a la isoforma A (RP_A; Meyer et al., 1990). Asimismo, se ha observado que en presencia de activadores de PKA como el AMPc, RU 486 puede comportarse como agonista (Beck et al., 1993). Este compuesto, produce la dimerización del RP y la asociación al ADN, mayor que la inducida por el agonista (DeMarzo et al., 1992; Skafar, 1991). La unión del RU 486 induce el reclutamiento de corepresores (Jackson et al., 1997).

Otro antagonista utilizado anteriormente fue la Onapristona (ZK 299). Actúa de la misma forma que RU 486, produciendo dimerización de los receptores y unión al ADN, pero de forma mas débil que la inducida por RU 486 (Leonhardt and Edwards, 2002). Ambos compuestos tienen afinidad por el GR, siendo la del ZK menor que la del RU 486. El uso del ZK 299 fue discontinuado debido a los efectos colaterales que presentaron (Robertson et al., 1999).

El ZK 230211 (ZK 211), otro antagonista del RP, que posee una marcada reducción de la actividad glucocorticoide 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, es que se están reclutando pacientes para los ensayos clínicos.

III. Receptores hormonales

Los receptores para hormonas esteroides (SR, *steroid hormone receptors*) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de clase I. Son factores de transcripción entre los que se encuentran los RE α y el RE β (RE β), los RP, los receptores de andrógenos (AR), los receptores de glucocorticoides (GR) y

mineralocorticoides (MR). Mientras que dentro de la clase II de receptores nucleares encontramos a los receptores para ácido retinoico ($RAR\alpha/\beta/\gamma$), a los receptores X de retinoides ($RXR\alpha/\beta/\gamma$), al receptor de la vitamina D (VDR), los receptores activados por proliferadores peroxisomales ($PPAR\alpha/\gamma/\delta$), y a los receptores de la hormona tiroidea ($TR\alpha/\beta$). Todos estos receptores nucleares descriptos son factores de transcripción inducibles, los cuales se hacen activos en presencia de su ligando específico (Ellmann et al., 2009).

Receptores de estrógenos

Los estrógenos ejercen su acción por medio de la unión a los RE. Existen dos genes conocidos que codifican para los receptores de estrógenos clásicos, el gen para el $RE\alpha$ y el gen para el $RE\beta$. El primero en descubrirse y sobre el que más información se tiene es el $RE\alpha$. Fue clonado en 1986 a partir de la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (Green et al., 1986a; Green et al., 1986b; Greene et al., 1986; Walter et al., 1985), y luego, casi simultáneamente fue clonado el de rata (Koike et al., 1987) y el de ratón (White et al., 1987). En las tres especies, tiene un peso molecular muy similar, de aproximadamente 66-67 kDa (Stirone et al., 2003). Mientras que el $RE\beta$, clonado en rata y en ratón a mediados de los años '90 (Kuiper et al., 1996; Tremblay et al., 1997), tiene un peso molecular de 56 kDa en roedores, y de 59 kDa en humanos (Figura 1.2).

Ambos receptores unen E2, y luego de la unión con la hormona, pueden formar homo o heterodímeros (Pace et al., 1997), interactúan con la maquinaria de transcripción basal y con numerosos coactivadores. Se asocian con secuencias consenso de respuesta a estrógenos, AGGTCAnnnTGACCT, ERE (Tyulmenkov and Klinge, 2000; Roemer et al., 2006; Bourdeau et al., 2004), en promotores de genes blanco, regulando la expresión de estos genes. Además, pueden interactuar con otros factores de transcripción como Sp1 (Porter et al., 1997), AP-1 (Webb et al., 1995), Stat5b (Bjornstrom et al., 2001) o CRE, y regular la expresión de genes particulares de una manera tejido específica (Lazennec et al., 2001). Análisis de Scatchard, indican que el $RE\beta$ de ratón posee una menor afinidad por el E2 que el $RE\alpha$, aunque es capaz de inducir activación de genes respondedores a E2. Esto puede ser inhibido por antiestrógenos como el tamoxifeno o el ICI (Tremblay et al., 1997). El $RE\alpha$ y el $RE\beta$, poseen una capacidad transcripcional diferente, siendo el $RE\beta$ menos potente en su actividad que el $RE\alpha$, e incluso inhibiendo la actividad del $RE\alpha$ en

diferentes contextos, (Hall and McDonnell, 1999; Kuiper and Gustafsson, 1997; Montano et al., 1998). La sobreexpresión del RE β , en líneas celulares de cáncer de mama humano que expresan RE α y son dependientes de E2, causa una inhibición en la proliferación celular *in vitro*, e inhibe la formación de tumores *in vivo*, en respuesta a E2 (Paruthiyil et al., 2004; Strom et al., 2004; Behrens et al., 2007).

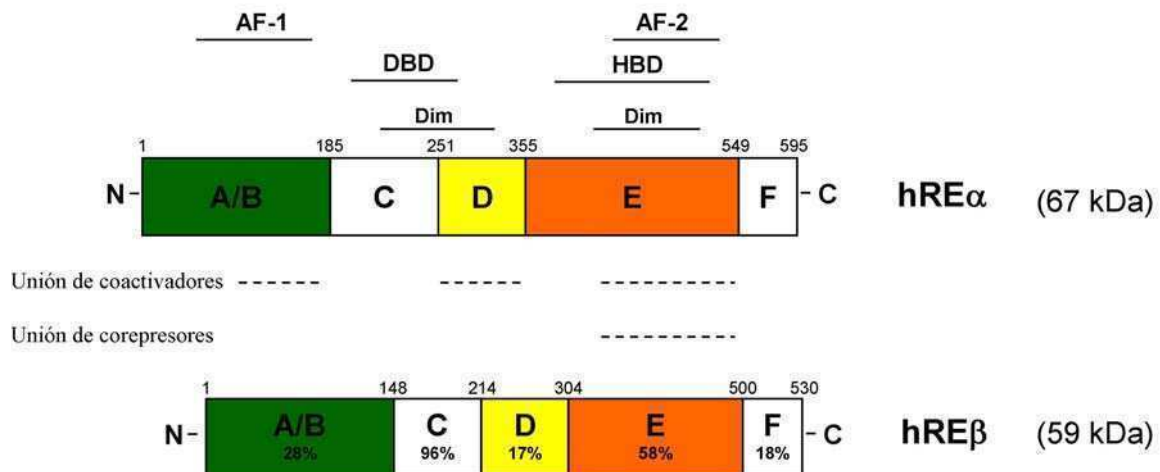


Figura 1.2. Esquema del RE α y el RE β de humanos. Se transcriben a partir de dos genes diferentes. El RE β es más corto en su extremo N-terminal que el RE α . Se muestra la organización de los dominios de las isoformas del RE humano. DBD: dominio de unión al ADN; HBD: dominio de unión a la hormona; Dim: dominio de dimerización; AF-1 y -2 son los dominios de activación transcripcional; también se indican los dominios de interacción con corepresores y coactivadores de la transcripción, y el porcentaje de homología entre los diferentes dominios de ambos receptores. Adaptado de Klinge, 2000.

En muchos tejidos de ratón, ambos receptores son coexpresados, como por ejemplo: en el ovario, útero, pulmón, glándula mamaria, tejido neural y en tejidos reproductivos del macho. Sin embargo, existen diferencias en su expresión en el ovario, donde la expresión del RE β es más abundante que la del RE α , y en glándula mamaria normal, donde ocurre lo contrario (Couse et al., 1997; Hewitt and Korach, 2003). Estudios en ratones *knockout* para el RE (REKO) han demostrado que el RE α y no el RE β , es esencial en la proliferación de la glándula mamaria, útero y próstata (Hewitt and Korach, 2003). La proliferación de estos tejidos estimulada por E2, es normal en RE β KO, pero está ausente en los RE α KO (Couse et al., 2000; Hewitt and Korach, 2003). Sin embargo, a pesar que el RE β KO muestra un desarrollo normal de la glándula mamaria hasta la pubertad, su participación sería fundamental en el desarrollo lóbuloalveolar de la mama

durante la preñez y la lactancia (Forster et al., 2002). En la Tabla 1.2, se citan algunos de los fenotipos más importantes de ambos *knockouts*.

Tabla 1.2. Resumen de los resultados obtenidos en ratones *knockouts* para ambos RE

Tejido	Función	Fenotipo
Glándula pituitaria	Producción y secreción de gonadotrofinas	RE α KO y RE α β KO: alta LH RE β KO: ningún fenotipo
Ovario	Producción de Pg y E2, ovulación	RE α KO: hemorragias; altos niveles de E2 y testosterona, debido a alta LH; anovulatorio RE β KO: ovulación reducida RE α β KO: falta de ovulación
Útero	Proliferación, secreción	RE α KO y RE α β KO: insensible a E2 RE β KO: crecimiento y respuesta a E2 normal
Embrión/Útero	Implantación/decidualización	RE α KO: decidualización independiente de E2, no hay implantación RE β KO: normal
Glándula mamaria	Desarrollo en la pubertad, lactancia	RE α KO y RE α β KO: sin desarrollo en la pubertad RE β KO: incompleta diferenciación de la glándula durante la preñez y lactancia

Adaptado de Hewitt and Korach, 2003; Forster et al., 2002

Los RE α sufren modificaciones post traduccionales, que tiene que ver con fosforilación, acetilación y glicosilación (Lannigan, 2003; Likhite et al., 2006). De éstas, la fosforilación del receptor es considerada la más importante y deriva de la activación de diferentes quinasas celulares que alteran la actividad del RE α . Diferentes sitios de fosforilación en la secuencia primaria del receptor, han sido caracterizados por métodos bioquímicos, y se esquematizan en la Figura 1.3. Fosforilación de los residuos localizados en el dominio N-terminal A/B del RE α , como la Ser104, Ser106 (por quinasas dependientes de ciclina, CDK; o por MAPK; Rogatsky et al., 1999; Thomas et al., 2008b), la Ser118 (por MAPK; Joel et al., 1998b), la Ser167 (por RSK y Akt; Joel et al., 1998a; Arnold et al., 1994), han sido determinados. A pesar de que esta región es responsable de las funciones de transactivación del RE α de forma ligando-independiente, estos sitios sufren fosforilación en respuesta a E2. El grupo de *L. Murphy*, demostró que el RE α fosforilado en la Ser118 por E2, está presente en promotores regulados por la hormona, como pS2, RP, c-Myc y ciclina D1, en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, en un mecanismo independiente de la sobreactivación de MAPK por HER-2 (Weitsman et al., 2006). Por otro lado, la fosforilación en Ser236, en el DBD, por PKA actuaría como un mecanismo regulatorio en la homo y heterodimerización, y en la unión al ADN (Chen et al., 1999). Además, se demostró que la fosforilación Tirosina537 por E2, vía c-Src, sería importante en la dimerización del receptor y en la unión al ADN (Arnold et al., 1995).

Pak1 media la fosforilación del RE α en la Ser305 de manera ligando independiente, y está relacionado a la actividad del receptor y a mecanismos de resistencia. A su vez, el E2 es capaz de inducir activación de Pak1 (Balasenthil et al., 2004). PKA también puede fosforilar la Ser305, alterando la sensibilidad del receptor al ligando, induciendo un cambio en la acción del tamoxifeno, de antagonista por agonista, mecanismos relacionados con resistencia (Giordano et al., 2009).

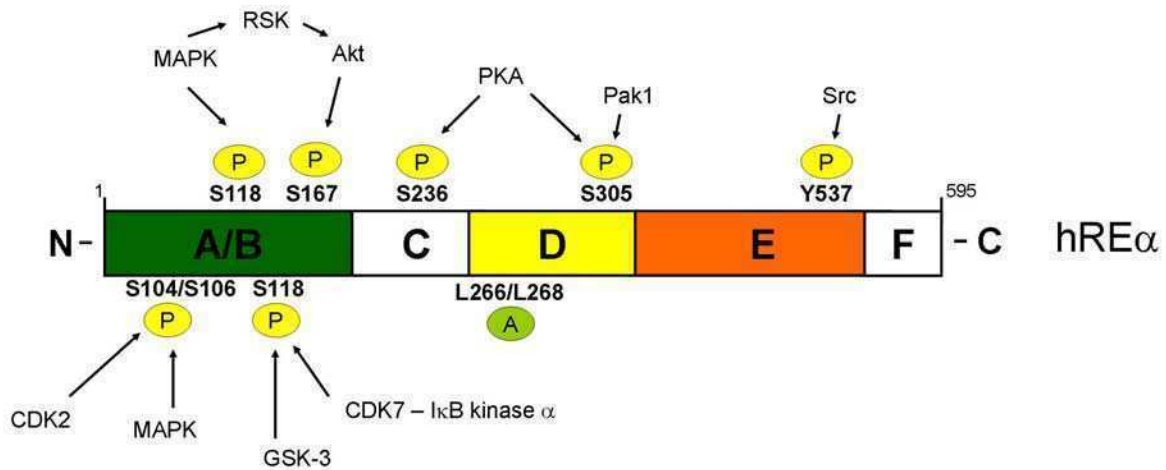


Figura 1.3. Esquema mostrando algunos de los sitios de fosforilación en el RE α humano y las quinasas involucradas.

Gran parte de estos estudios se realizaron con líneas celulares, muchas de ellas negativas para receptores hormonales, y sobreexpresando al RE α , mutando sitios de interés, sobreactivando diferentes vías de señalización o utilizando inhibidores de estas vías, entre otras estrategias. Sin embargo, en otros estudios se analizó el estado de fosforilación del RE α en tumores de mama humanos. En estos casos, se demostró que una elevada fosforilación del RE α en Ser167, es un marcador pronóstico de pacientes que pueden ser tratados con terapias endócrinas y que tendrían una mejor supervivencia libre de enfermedad luego de detectarse metástasis (Yamashita et al., 2005; Jiang et al., 2007). La fosforilación en Ser118 fue detectada mayormente en pacientes con tumores diferenciados, sin haber tenido un tratamiento previo, sugiriendo que la fosforilación en este sitio estaría asociado a un buen pronóstico. Sin embargo, también se detectaron altos niveles de pSer118 en tumores de pacientes que sufrieron una recaída luego del tratamiento con

tamoxifeno, sugiriendo también, que este sitio podría estar asociado a resistencia al tratamiento endócrino (Sarwar et al., 2006; Murphy et al., 2004). Además, en un estudio con pacientes con tumores de mama, antes y después de la terapia endócrina, demostraron que la pSer118 correlaciona con la activación de MAPK, que disminuye en respuesta al tratamiento, y que esta disminución es aun mayor en tumores sensibles a la terapia (Zoubir et al., 2008).

Otra modificación post traduccional descrita para el RE α que potencia su actividad transcripcional, es la acetilación en residuos Lisina 266 y 268, por la enzima acetilasa p300, en un mecanismo regulado por E2 (Kim et al., 2006b).

En numerosos trabajos se ha descrito activación del RE α en ausencia de ligando. En la línea celular de cáncer de mama humano, MCF-7, la prolactina induce la fosforilación del RE α en serina 118, y la transcripción de genes conteniendo secuencias ERE, en ausencia de E2. Este efecto fue inhibido por el antiestrógeno puro ICI (Gonzalez et al., 2009). Por otro lado, se demostró que la leptina, a través de la vía de señalización de MAPK, induce activación del RE α (Catalano et al., 2004), mientras que la sobreexpresión de PKC δ junto con el RE α en células Cos-1 y NIH3T3, dio como resultado un aumento en la fosforilación y activación transcripcional del RE α (Lahooti et al., 1998). Se demostró también, que la vía de señalización de PI3K/Akt modula la actividad del RE α *in vivo*, y esto correlaciona con la fosforilación, en ausencia de ligando, en serina 167 del RE α mediado por Akt *in vitro*. Sin embargo, la capacidad de Akt para inducir la expresión de genes conteniendo EREs, es dependiente del contexto en cada promotor no pudiéndose generalizar a todos los genes conocidos regulados por E2 (Campbell et al., 2001). Además, factores de crecimiento como EGF, IGF y heregulina- β 1 inducen fosforilación del RE α nuclear alterando su expresión y activación transcripcional vía Akt en ausencia de estrógenos (Stoica et al., 2000; Martin et al., 2000; Stoica et al., 2003). Recientemente se determinó un *loop* autócrino entre SDF-1 y los RE α y RE β en células MCF-7. Por este mecanismo, el E2 regula la expresión del SDF-1 vía sus receptores *alpha* y *beta*, mientras que el SDF-1 induce la activación de MAPKs por unión a su receptor de membrana CXCR4. La activación de estas vías de señalización llevan a un aumento en la fosforilación y activación del RE induciendo genes relacionados a proliferación celular (Sauve et al., 2009).

Receptores de progesterona

Los RP 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, RP_A y RP_B, que derivan de promotores alternativos de un gen localizado en el cromosoma 11 q22-q23 humano (Kastner et al., 1990; Rousseau-Merck et al., 1987), y en el cromosoma 9 de ratón (Schott et al., 1991). 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. Se observó que el RP_B se origina desde el codón de inicio de la traducción AUG1, mientras que el RP_A, lo hace a partir del codón AUG2 (Kastner et al., 1990). En roedores, el PM del RP_B y RP_A es 115 y 83 kDa, respectivamente (Schneider et al., 1991). Más recientemente, fue identificada una tercera isoforma del RP, llamada RP_C de 60 kDa (Figura 1.4; Wei and Miner, 1994; Wei et al., 1996), presente en líneas celulares de cáncer de mama humanas T47D y MCF-7, y en endometrio humano normal. Esta isoforma, fue identificada a partir de ensayos de traducción *in vitro* con un *cDNA* del RP sin los sitios de inicio de la traducción para RP_B y RP_A. De forma tal que se determinó un tercer codón AUG que mediaría el inicio de la traducción de esta nueva isoforma. RP_C, posee el dominio de unión a ligando, y un dominio de unión al ADN incompleto (Hagan et al., 2009), de manera tal que es un factor de transcripción no funcional, que une Pg (Wei et al., 1996), pero está restringida su localización al citoplasma (Wei et al., 1990). Se demostró que el RP_C puede formar heterodímeros con RP_B inhibiendo su actividad transcripcional (Wei et al., 1997). RP_C podría secuestrar Pg, impidiendo su unión con RP_B e inhibiendo la actividad de la misma (Wei et al., 1997). Sin embargo, el grupo de *B. Gellersen* en Alemania (Samalecos and Gellersen, 2008), niega la existencia de esta isoforma dado que no son capaces de detectarla con varios anticuerpos disponibles contra el RP.

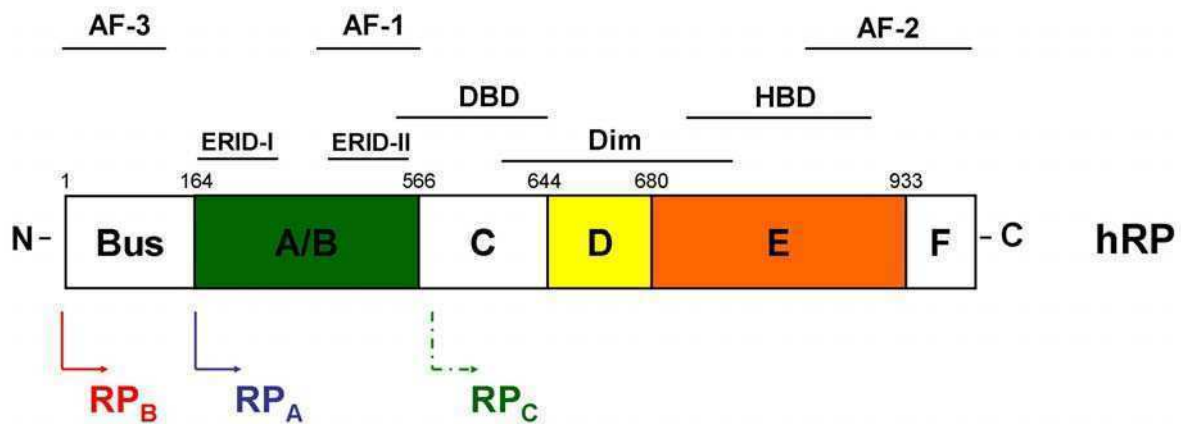


Figura 1.4. Esquema de las diferentes isoformas del RP. Organización de los dominios de las isoformas del RP humano (RP_A, RP_B y RP_C). DBD: dominio de unión al ADN; HBD: dominio de unión a la hormona; Dim: dominio de dimerización; Bus: dominio de 164 aminoácidos específicos de la isoforma B; AF-1, -2 y -3 son los dominios de activación transcripcional; ERID-I y ERID-II, dominios de interacción con el RE α . Adaptado de Cork et al., 2008; Kastner et al., 1990; Wei et al., 1996; Ballare et al., 2003.

Está ampliamente aceptado que el RP es un gen regulado por E2 (Horwitz et al., 1978; Horwitz and McGuire, 1979; Kastner et al., 1990; Kurita et al., 2000). Si bien se han encontrado secuencias de respuesta a E2 (ERE) en el promotor del RP humano (Kastner et al., 1990), no es la secuencia consenso completa, sino un medio sitio ERE (*half* ERE) en el promotor del RP_A. Se piensa que la expresión del RP se da a través de dos promotores, el promotor para el RP_B y el promotor para el RP_A, y si bien ambos promotores responden a E2, ninguno contiene la secuencia palindrómica completa ERE (Petz et al., 2004). La asociación del RE α a este medio sitio ERE, junto con la interacción con factores de transcripción como c-Fos, c-Jun y Sp1, mediarían la regulación por E2 del gen del RP (Petz and Nardulli, 2000; Petz et al., 2002; Schultz et al., 2003). También se han encontrado secuencias ERE en el promotor del RP de rata (Kraus et al., 1994), mientras que en ratón se han encontrado secuencias putativas para el pegado del RE, muy similares a la secuencia ERE consenso, ubicadas en el promotor del RP_A (Hagihara et al., 1994).

En ratones *knockout* para el RP (RPKO) se ha demostrado que es el RP_B el que media los efectos proliferativos de la Pg sobre la glándula mamaria. El ratón RP_AKO presentó severas anomalías en la función ovárica y uterina llevando a infertilidad en las hembras. Mientras que la acción de la Pg sobre la glándula mamaria o sobre el timo de estos ratones, no se vio afectada (Mulac-Jericevic et al., 2000). Más recientemente, se desarrolló el ratón RP_BKO, sobre el cual se demostró que la supresión en la expresión del RP_B no afecta la acción de la Pg sobre el útero, el ovario y timo. Pero resulta en una

reducida morfogénesis ductal y alveologénesis de la mama durante la preñez (Mulac-Jericevic et al., 2003). De esta manera, el RP_A es necesario y suficiente para desarrollar las respuestas reproductivas mediadas por Pg para la fertilidad de la hembra, mientras que el RP_B es necesario para las respuestas proliferativas y diferenciadoras de la Pg sobre la glándula mamaria (Conneely et al., 2003).

En la glándula mamaria normal y en el útero de ratón la relación RP_A/RP_B es 3/1 (Schneider et al., 1991), mientras que en la glándula mamaria humana *Sartorius y col.* informaron que ambas isoformas se encuentran en concentraciones equimolares (Sartorius et al., 1994).

Los RPs, sufren considerables modificaciones post traduccionales que tienen que ver con fosforilación, acetilación, sumoilación, y ubiquitinación (Dressing et al., 2009; Hagan et al., 2009). Existen 14 residuos serina en la secuencia primaria del RP, capaces de ser fosforilados *in vivo* o *in vitro* (Figura 1.5). Estas modificaciones pueden ocurrir de forma basal, como respuesta a la activación por ligandos específicos o por activación de vías de señalización intracelular. Seis de los sitios (Ser20, Ser25, Ser81, Ser102, Ser130, 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, Ser213, Ser294, Ser345, Ser400, Ser430, Ser554, Ser676; Hagan et al., 2009). Todos estos sitios, a excepción de la Ser345, están representados también en la secuencia primaria del RP de ratón (www.phosphosite.org). La fosforilación del RP, afecta su función y activación transcripcional sobre genes blanco, su localización subcelular, su estabilidad y vida media, y su capacidad de interactuar con otras proteínas (Clemm et al., 2000; Hagan et al., 2009; Dressing et al., 2009).

El tratamiento de las células con un agonista de la Pg 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 Ser400) y luego de 1 a 2 horas de tratamiento la fosforilación es máxima (Clemm et al., 2000). Se conocen diferentes quinasas capaces de fosforilar a los RP, como por ejemplo, MAPK, *Casein kinase II*, y la quinasa dependiente de ciclina II (CDK2; Shen et al., 2001; Weigel et al., 1992; Weigel, 1996). La unión de la Pg a su receptor produce la liberación de los complejos de proteínas de *shock* térmico

(HSP) como la hsp 90 (proteína de 90 kDa) y la hsp 70 (proteína de 70 kDa) a las que se encontraba unido, 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 progestágenos (PRE), y es una secuencia invertida separada por tres nucleótidos: AGAACAnnnTGTTCT. Los GR, AR y MR comparten esta secuencia, mientras que como dijimos, los RE se unen a la secuencia AGGTCAnnnTGACCT (Roemer et al., 2006). El homo u heterodímero 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.

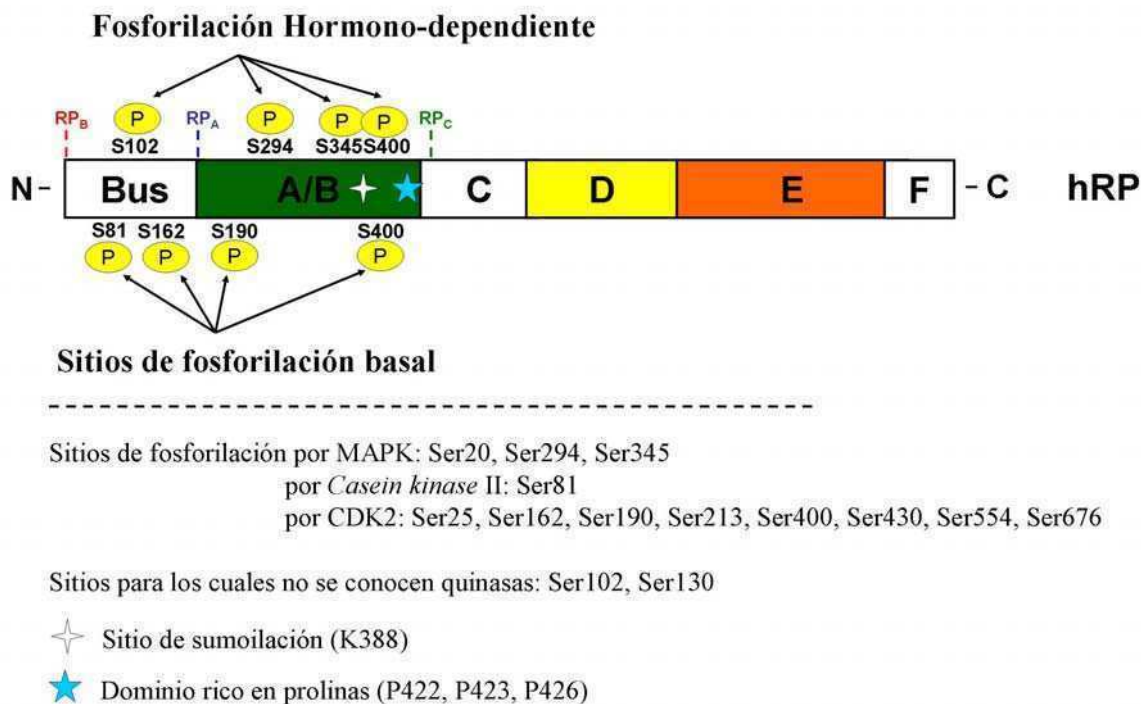


Figura 1.5. Esquema de los sitios de fosforilación en el RP. Se muestran los sitios de fosforilación más importantes y más estudiados en el RP, los basalmente fosforilados y los inducibles por hormonas. Adaptado de Daniel et al., 2009; Hagan et al., 2009.

Muchos factores de transcripción son modificados por sumoilación (SUMO), de una manera fosforilación-dependiente, inhibiendo su acción transcripcional. SUMO, es una proteína de unos 10 kDa, que se une reversiblemente a residuos lisina de una manera reversible, por la acción de enzimas Ubc9 y E3 ligasa. Mientras que la enzima SENPs, es

la responsable de liberar SUMO de las proteínas, en un mecanismo hormono-dependiente; trabajos citados en (Daniel et al., 2009). En respuesta a progestágenos, el RP puede sufrir sumoilación en la lisina388 (Figura 1.5). Las consecuencias de esta modificación es la represión transcripcional, mientras que el RP mutante en este sitio, es hiperactivo en relación el *wt* (Daniel et al., 2007). Por otro lado, la fosforilación en Ser294 por progestágenos, antagoniza este efecto represor, y el grado de fosforilación en Ser294 o sumoilación en Lys388, puede afectar diferencialmente la activación transcripcional de genes endógenos regulados por RP. Por ejemplo, TF (*tissue factor*) o MUC-1, son independientes del estado de sumoilación del RP, mientras que lo contrario ocurre con el HB-EGF (Daniel et al., 2009).

En general, el RP_B es un activador transcripcional más fuerte que el RP_A, mientras que este último, puede funcionar como un represor ligando-dependiente de otros receptores de hormonas esteroides, incluyendo RP_B, RE, AR, GR y MR, de una manera célula-contexto del promotor-dependiente (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007; Vegeto et al., 1993). La acción inhibitoria del RP_A se debería a su incapacidad de reclutar coactivadores de la transcripción, comparado con la del RP_B (Giangrande et al., 2000). Sin embargo, los estudios en ratones *knockouts* para una u otra isoforma, descritos previamente, sugieren que ambos receptores funcionan de una manera tejido-dependiente como activadores transcripcionales. En células de cáncer de mama humano que expresan sólo la isoforma B (T47D-YB) o sólo la A (T47D-YA) del RP (Sartorius et al., 1994), la gran mayoría de los genes regulados por el RP, lo hacen vía la isoforma B (~65% de los genes) del receptor en presencia de ligando. Mientras que sólo un 4% de los genes resultaron regulados por la isoforma A, aproximadamente un 25% se encontraron regulados por ambas isoformas (Richer et al., 2002). Además, se demostró que los progestágenos sintéticos tienen un alto grado de similitud con la Pg, en sus respuestas transcripcionales (alrededor de un 77-91% de semejanza; Bray et al., 2005). Aun en ausencia de ligando, el RP puede ser activo transcripcionalmente, y en oposición a los resultados obtenidos en presencia del progestágeno, el RP_A sería la isoforma mas activa (Jacobsen et al., 2002).

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 el 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 dependiente de ciclina p21 (Owen

et al., 1998). La interacción entre RP y Sp1 se encuentra regulada por la fosforilación dependiente de ligando, en la Ser345 del RP, producida por una vía rápida de señalización (MAPK) inducida por el mismo RP (Faivre et al., 2008).

El análisis de la localización intracelular de ambas isoformas en diferentes tipos celulares y condiciones, dio como resultado que el RP_B se encuentra distribuido entre citoplasma y núcleo, mientras que el RP_A es predominantemente nuclear (Boonyaratanakornkit et al., 2007; Lim et al., 1999). Estudios de nuestro Laboratorio sugieren que también podrían localizarse en la membrana celular, sobre todo a tiempos cortos luego de incubación con el ligando o con factores de crecimiento (Bottino et al., 2009).

Mecanismos no genómicos

Clásicamente, se considera a los SR como factores de transcripción nuclear, que cuando se activan por unión con sus ligandos específicos, regulan la expresión de diferentes genes blanco. Los SR activados pueden actuar como dímeros sobre secuencias específicas de respuesta a hormonas en promotores en el ADN (en forma general se las conoce como HREs, *hormone-responsive elements*), o pueden actuar por interacción con otros factores de transcripción. En ambos casos, el resultado es el reclutamiento de coreguladores de la transcripción, complejos remodeladores de la cromatina, y la maquinaria de transcripción basal (Beato et al., 1995; Onate et al., 1995). Por otro lado, se ha visto como los SR pueden modular también la activación de vías de señalización citoplasmáticas, como por ejemplo la activación de la adenilato ciclasa, de las MAPKs, y la PI3K, de la tirosina-quinasa Src, entre otras, sin necesitar de la actividad transcripcional clásica (Baulieu, 1978; Pietras and Szego, 1977). Incluso, por activación de estas vías, y sin ir al núcleo, los SR son capaces de regular la expresión de genes particulares. A estos efectos no dependientes de la acción nuclear de los SR, se lo denomina mecanismos no genómicos (Edwards, 2005).

Los SR localizados en la membrana plasmática o en el citoplasma, pueden asociarse de forma momentánea con otras moléculas de señalización incluyendo receptores acoplados a proteínas G (GPCR), a la tirosina-quinasa citosólica Src (c-Src, Fyn), proteínas con dominios SH2 (*SH2-containing domain*, Shc), o proteínas adaptadoras (Shc, p130Cas, MNAR, Grb2, Crk, p85) y asociadas a membrana (Caveolina 1), produciendo la

activación de vías de señalización como MAPKs o PI3K/Akt. La consecuencia biológica de la activación de estas cascadas de señalización, generadas por las hormonas esteroides, es influenciar la transcripción génica. Se han propuesto al menos tres mecanismos para describir este proceso: 1) un mecanismo de retroalimentación positiva donde la actividad transcripcional de los SR o de los coreguladores es aumentada por fosforilación, 2) vías de señalización que convergen y activan a genes blanco requiriendo que otros factores de transcripción (TF) cooperen con los SR mediante la unión de promotores HREs, y 3) activación de TF independientes de la unión directa de los SR al ADN (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007). Estos mecanismos se muestran en la Figura 1.6.

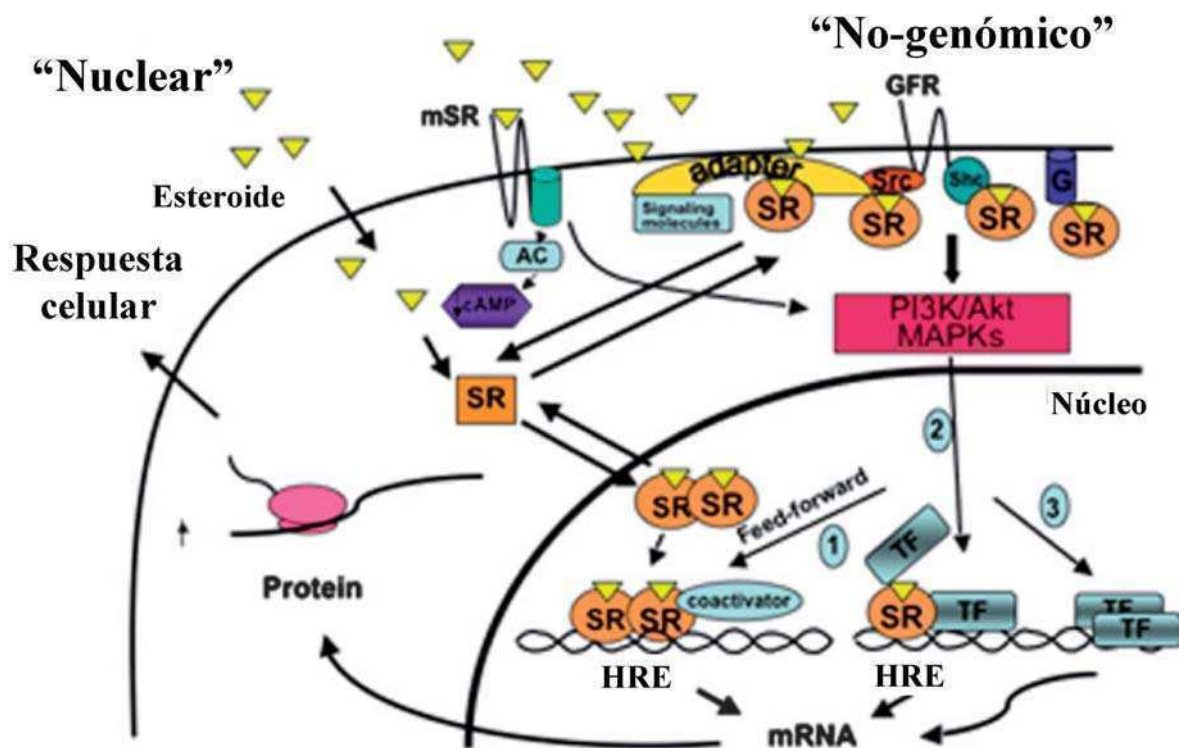


Figura 1.6. Vías de señalización clásicas y no-genómicas activadas por hormonas esteroides. SR: receptores de hormonas esteroides, TF: factores de transcripción, mSR: receptores no clásicos de esteroides en membrana, HRE: elementos de respuesta a hormonas esteroides. Adaptado de Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007.

En líneas celulares de cáncer de mama humano T47D, el RP_B puede mediar la activación de Src inducida por progestágenos, y la señalización río abajo por MAPK. Se observó un *crossstalk* entre el RP y el RE α en la activación de la vía c-Src/p21^{Ras}/MAPK por Pg. La unión de Pg al RP_B, induce la asociación del RE α a c-Src y la consecuente activación de la vía, un mecanismo que puede ser inhibido por antiprogestágenos o antiestrógenos. Los autores determinaron que la activación de c-Src por progestágenos implica la interacción del extremo N-terminal del RP_B con el RE α , y la asociación del RE α con c-Src (Migliaccio et al., 1998). Resultados similares se obtuvieron en células estromales de útero de rata, donde la activación de las vías de MAPK y Akt por Pg, ocurre de forma no genómica y mediante un *crossstalk* entre el RP y el RE β (Vallejo et al., 2005). Mientras que en la línea celular de cáncer de próstata, LNCaP, el tratamiento con E2 o andrógenos, induce la asociación entre el AR y el RE β con Src, resultando en la activación de MAPKs y en la proliferación celular, un mecanismo que puede ser inhibido por antiestrógenos y antiandrógenos (Migliaccio et al., 2000).

En el año 2003, el grupo de *Beato M y col*, definieron los dominios de interacción entre el RP y el RE α (Figura 1.4; Ballare et al., 2003). En ensayos de inmunoprecipitación y doble-híbrido, encontraron dos dominios en el extremo N-terminal del RP necesarios en la interacción con el RE α para la eficiente activación de la cascada c-Src/MAPKs por Pg. Estos dominios en el RP se denominaron ERID-I y ERID-II (*ER-interacting domain I and II*), y aunque están presentes en ambas isoformas del RP, y ambas serían capaces de interactuar con el RE α , sólo el RP_B activa la vía de c-Src/MAPK por asociación con RE α en presencia de progestágenos, en este modelo (Migliaccio et al., 1998). Sugiriendo que en el contexto del RP_A, uno o ambos dominios ERID, no estarían disponibles para interactuar con el RE α (Ballare et al., 2003). Además, teniendo en cuenta que el RP_A es principalmente nuclear (Lim et al., 1999), esto evitaría su asociación en el citoplasma celular con el RE α . Los mismos autores determinaron que el dominio HBD en el RE α , sería el que media la asociación con el RP en respuesta a progestágenos (Ballare et al., 2003). Además, estudiaron un dominio rico en prolinas, ubicado entre ambos ERID en el RP (Figura 1.5), involucrado en la interacción con el dominio SH3 de c-Src. Esta secuencia rica en prolinas, es independiente de la asociación entre el RP y el RE α en la activación de MAPK por progestágenos. Demostraron además, la importancia del RE α en este mecanismo, dado que en su ausencia o en presencia de antiestrógenos, se bloquea la activación de la vía de MAPK por progestágenos (Ballare et al., 2003; Migliaccio et al.,

1998). Por lo tanto, se postuló que la Pg unida a RP_B, induce la asociación con el RE α libre de ligando (vía dominios ERID-I y II en el RP_B, y HBD en el RE α), lo cual resulta en la interacción entre RE α y c-Src y en la consecuente activación de MAPK. Más recientemente, se pudo discriminar entre los genes regulados por el RP, que eran dependientes de los dominios ERID y de la interacción con el RE α . Entre estos, están el gen de ciclina D1 (Ccd1), Cdkn1a, Hsd11b2 y Myc. Mientras que dentro de los genes regulados por progestágenos que no dependen de la interacción con el RE α , se encuentran Birc3, Fos, Dusp1 y Jun (Quiles et al., 2009).

Otro mecanismo propuesto para la activación de MAPK de forma no genómica por progestágenos, es mediante una unión directa entre el dominio rico en prolinas en el RP_B (Figura 1.4) y el dominio SH3 de c-Src, independientemente de la presencia del RE α . En células T47D, el tratamiento con el progestágeno, induce la asociación entre RP_B y c-Src, llevando a la activación de la vía c-Src/Ras/MAPK, en un mecanismo independiente de la actividad transcripcional del RP y de la Ser294 (Boonyaratanakornkit et al., 2001; Boonyaratanakornkit and Edwards, 2004; Edwards et al., 2002). Nuevamente, aunque el RP_A y el RP_B poseen idénticos dominios de interacción con c-Src, el RP_A no fue capaz de mediar la activación de MAPK por progestágenos. En este modelo, el incremento en la expresión de ciclina D1, cuyo gen carece de elementos de respuesta a progestágenos consenso, y la consecuente inducción del ciclo celular, es dependiente de la activación de c-Src/MAPK por RP de forma no genómica. Mientras que la expresión de genes con secuencias PRE (como el gen de Sgk, *serum and glucocorticoid regulated kinase*), no se vio afectada por mutaciones en el RP que bloqueen su asociación no genómica con c-Src (Boonyaratanakornkit et al., 2007).

Por otro lado, se describió que los progestágenos son capaces de activar las vías de señalización de PI3K/Akt y de *Janus-tyrosine kinase* (JAK)/STAT, en un mecanismo dependiente de c-Src en células tumorales mamarias, lo cual correlaciona con proliferación celular (Proietti et al., 2005; Saitoh et al., 2005).

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 c-Src (Hammes and Levin, 2007); lo que denota la necesidad de una cuidadosa extrapolación entre los datos previos en células humanas y en células de ratón.

La situación respecto a la regulación del gen de ciclina D1 por progestágenos es confusa. Dado que el promotor de *Ccnd1* no posee secuencias PRE, se sugirió fuertemente que el RP no necesitaría de su acción nuclear para inducir la expresión del gen. Y dada la activación de la vía de c-Src/MAPK por progestágenos, esto llevaría a la activación de *Ccnd1* por otros factores de transcripción (Saitoh et al., 2005; Skildum et al., 2005; Boonyaratanakornkit et al., 2007). Una situación análoga se describió para la regulación de mismo gen por E2, dado que también carece de secuencias ERE y depende de la activación de MAPKs y Akt. Sin embargo, se demostró el reclutamiento del $RE\alpha$, junto con c-Fos y c-Jun, a secuencias promotoras de gen de *Ccnd1* en presencia de E2 (Cicatiello et al., 2004; Eeckhoute et al., 2006). Finalmente, resultados actuales demuestran la necesidad del DBD del RP en la regulación del gen de ciclina por progestágenos, además de su acción citoplasmática. Los mismos autores, detectan al RP en secuencias promotoras del gen en ensayos de Chip (*Chromatin immunoprecipitation assays*), luego del tratamiento hormonal. Las mismas secuencias en las cuales se detectó al $RE\alpha$, y que además poseen sitios de unión para Sp1, Oct1, NF κ B (Eeckhoute et al., 2006; Quiles et al., 2009). Por otro lado, la inhibición en la interacción entre RP_B - $RE\alpha$, no activa la expresión de *Ccnd1*, pero tampoco inhibe la asociación del RP_B al promotor. Demostrando también la necesidad de las vías citoplasmáticas en la acción transcripcional del RP (Quiles et al., 2009). Finalmente, se demostró, un *loop* autócrino, por el cual la Pg induce vía la asociación entre RP y Sp1, la expresión de EGFR y Wnt1, lo que conlleva a un aumento en la activación de MAPKs y ciclina D1, y la consecuente proliferación celular (Faivre and Lange, 2007).

En cuanto a las acciones extra nucleares generadas por E2, éstas se han observado en varios tejidos y líneas celulares. Los primeros efectos rápidos inducidos por E2 fueron reportados sobre rata ovariectomizadas, donde la hormona inducía un aumento de AMPc en el útero (Szego and Davis, 1967). Luego se identificaron sitios específicos de unión a E2 en la membrana celular (Pietras and Szego, 1977).

Tanto en células MCF-7 como T47D, el E2 ejerce acciones proliferativas, y el tratamiento con esta hormona aumenta rápidamente la activación de c-Src, Ras y de las MAPKs. Se demostró por ensayos de inmunoprecipitación que el E2 induce la interacción entre el $RE\alpha$ y c-Src, lo cual aumenta la actividad de c-Src, un mecanismo inhibido por el antiestrógeno ICI (Migliaccio et al., 1996). Además, se observó que el E2 puede inducir

proliferación de células MCF-7 a través de la vía PI3K/Akt, y un inhibidor de c-Src, previene la activación de esta vía. E2, promueve la formación de un complejo ternario compuesto por el RE α , c-Src y la subunidad reguladora de PI3K, p85 (Castoria et al., 2001). Akt posee un dominio rico en prolinas, capaz de interactuar con el dominio SH3 de c-Src. Esta interacción está implicada en la fosforilación en tirosina de Akt y su activación (Jiang and Qiu, 2003).

V. Estroma tumoral

Más del 60% de los tumores mamarios expresan receptores hormonales, los cuales constituyen uno de los blancos más efectivos en la terapia. Sin embargo, con el tiempo los tumores desarrollan mecanismos de resistencia a las terapias endocrinas (Normanno et al., 2005; Tonetti and Jordan, 1997). Conocer los mecanismos que gobiernan el crecimiento de estos tumores, permitirá desarrollar agentes terapéuticos nuevos o implementar los existentes en forma más eficiente.

La membrana basal es imprescindible para la diferenciación, mantenimiento y funcionalidad de la estructura tubular de la glándula mamaria; separa el epitelio del estroma y permite (y modula) el pasaje de distintas señales en ambos sentidos. La adhesión de la célula epitelial a la membrana confiere además, como parte de la diferenciación terminal, señales direccionales que dan sentido a los conceptos de basolateral y apical. Se demostró que sólo las células estromales sintetizan las proteínas más importantes de la matriz extracelular que constituyen la membrana basal de la glándula mamaria normal del ratón (Keely et al., 1995); sin embargo, este concepto está en permanente revisión.

En los últimos años, surgieron propuestas alternativas a la teoría de las mutaciones somáticas para explicar cómo se forman los tumores (Hanahan and Weinberg, 2000). La teoría de la carcinogénesis “de la organización tisular” (Soto and Sonnenschein, 2004; Soto and Sonnenschein, 2005), propone que el cáncer no es una problemática de células aisladas, sino que es una problemática en donde se pierde la *conversación* entre las células epiteliales y las células de soporte o estromales del tejido. La teoría propone al estroma como blanco de la carcinogénesis. Hay dos estudios que son claves en la literatura: uno es el de *Barcellos-Hoff* en Berkeley (Barcellos-Hoff and Ravani, 2000), en el cual demuestran que si se irradia el animal al que se le han extirpado previamente las células

epiteliales mamarias, y luego se transplantan en el panículo adiposo células no irradiadas, se desarrollan carcinomas mamarios. El otro es el estudio del grupo de *Sonnenschein* en Boston que es muy similar en diseño, pero utilizan un carcinógeno químico, en lugar de irradiación (Maffini et al., 2004). Ambos estudios han abierto una gran polémica sobre el papel del estroma tumoral en el cáncer.

El estroma tumoral, también denominado microambiente tumoral, es un tejido heterogéneo que se compone de diferentes poblaciones celulares, como por ejemplo: fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, adipocitos, células del sistema inmune, inmersas en la matriz extracelular (Micke and Ostman, 2005; Radisky and Radisky, 2007). Las interacciones que se dan entre las diferentes poblaciones celulares, regulando vías de señalización endócrinas, parácrinas, y las que tienen que ver con la interacción célula-célula y célula-matriz, son muy complejas y se encuentran en constante estudio. En la Figura 1.7 se muestran algunas de estas interacciones.

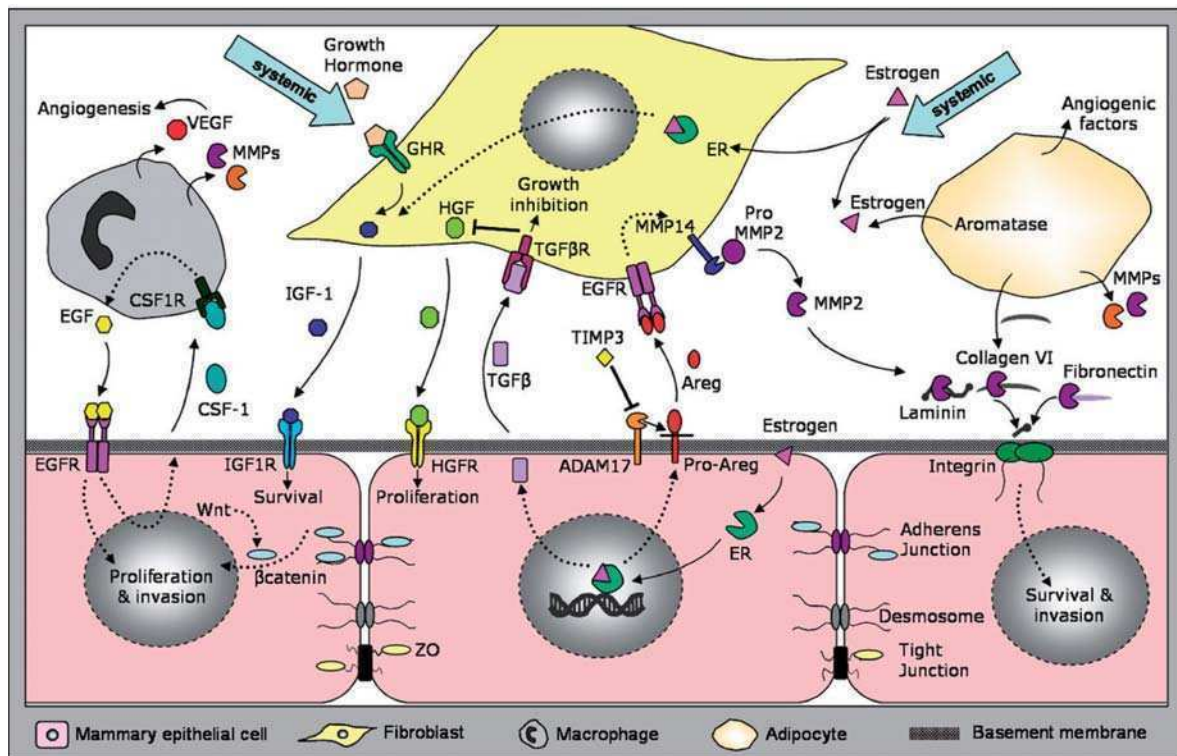


Figura 1.7. Esquema de las interacciones célula-célula y célula-matriz, entre el parénquima y el microambiente tumoral. Tomado de Radisky and Radisky, 2007.

Los fibroblastos son el principal componente del tejido conectivo, embebidos dentro de la matriz extracelular, y siendo los mayores responsables de su síntesis, acompañan el crecimiento tumoral. Se han denominado *carcinoma associated fibroblasts*, (*CAF*; Orimo et al., 2005; Orimo and Weinberg, 2006), y están involucrados en la secreción de metaloproteasas, factores de crecimiento (como IGF-1, *insulin-like growth factor 1*; HGF, *hepatocyte growth factor*; FGF-2, *fibroblast growth factor 2*) y citoquinas (como SDF-1, *stromal derived factor 1*; IL-6, *interleukin 6*; CXCL-14, *chemokine C-X-C ligand 14*); que actúan promoviendo el crecimiento tumoral y la invasión (Studebaker et al., 2008; Ma et al., 2009; Giulianelli et al., 2008a). Además, son responsables de estimular la angiogénesis tumoral, liberando factores como el VEGF (Kalluri and Zeisberg, 2006). La mayor parte de ellos expresa actina de músculo liso por lo que se los ha llamado también miofibroblastos o fibroblastos activados. Son reclutados por las células epiteliales tumorales vía la acción de factores como el TGF β (*Transforming growth factor-beta*) o el PDGF (*platelet-derived growth factor*; Micke and Ostman, 2005; Anderberg et al., 2009). Además, se descubrió que los *CAFs* expresan la enzima aromatasa y son capaces de producir E2 de forma local en el tumor, activando los RE en las células epiteliales y estimulando el crecimiento tumoral. Ésto, sumado a la posibilidad de que los RE sean activados por vías de señalización intracelulares asociadas a receptores de membrana y factores de crecimiento, establece una conexión entre el estroma tumoral, la acción de receptores hormonales y la resistencia a tratamientos convencionales (Santen et al., 1997; Santner et al., 1997; Yamaguchi, 2007; Yamaguchi et al., 2005; Yamaguchi and Hayashi, 2009).

Otro componente del estroma tumoral, son las células migratorias del sistema inmune, como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos, que son reclutados durante el desarrollo y progresión tumoral, por citoquinas a menudo producidas por las células epiteliales, como por ejemplo el CSF-1 (*colony stimulating factor 1*; Radisky and Radisky, 2007; Lin and Pollard, 2004). Se ha observado la existencia de un *loop* parácrino entre macrófagos, sintetizando EGF, el cual actúa sobre células tumorales induciendo proliferación y síntesis de CSF-1 (Goswami et al., 2005). Además, los macrófagos son capaces de producir metaloproteasas, cuya acción favorecería la capacidad invasiva de las células epiteliales (Gouon-Evans et al., 2000), y VEGF estimulando así la angiogénesis tumoral (Radisky and Radisky, 2007).

Los adipocitos son el tipo celular más abundante del estroma en la glándula mamaria, y el menos estudiado en cuanto a su interacción con el epitelio. Se sabe que estas células son capaces de sintetizar hormonas, citoquinas y factores de crecimiento. Tienen la capacidad de metabolizar andrógenos a estrógenos vía la acción de la aromatasa, teniendo un efecto parácrino sobre células epiteliales respondedoras a E2 (Celis et al., 2005). Además, son capaces de producir IL-6, promoviendo la migración e invasión de células tumorales (Walter et al., 2009).

Tal es la importancia del microambiente tumoral en el cáncer, que se han desarrollado numerosas estrategias terapéuticas que tienen como blanco de acción diferentes factores producidos por las células estromales. Por ejemplo, se ha buscado inhibir la angiogénesis bloqueando la acción del VEGF, entre otras estrategias (Chometon and Jendrosseck, 2009; Joyce, 2005; Micke and Ostman, 2005).

V. *Microarrays* de ADN y cancer de mama

Desde la aparición de los *microarrays* de ADN (*DNA microarrays*; Schena et al., 1995), el cáncer de mama ha sido probablemente uno de los más intensamente estudiados. Mediante esta técnica, es posible medir la expresión génica de miles de genes a la vez en un tejido o en una condición particular (Cheang et al., 2008). Los primeros estudios utilizaron líneas celulares humanas derivadas de tumores mamarios, con las cuales pudieron identificar un patrón de expresión génica específica de estas líneas (Ross et al., 2000; Perou et al., 1999), y de su capacidad invasiva (Zajchowski et al., 2001). El primer estudio importante realizado con muestras tumorales derivadas de pacientes, se realizó en el año 2000, donde se obtuvo una clasificación biológica de los tumores mamarios sobre la base de un patrón de expresión génica distintivo entre cada uno (Perou et al., 2000). Posteriormente, se validó esta clasificación molecular de los tumores, y se los correlacionó con la sobrevida de los pacientes dentro de cada grupo, realizando un avance muy importante en el conocimiento clínico y molecular de estos nuevos subtipos de carcinomas mamarios (Sorlie et al., 2001). Cinco subtipos de carcinomas surgieron de estos análisis: 1) *Luminal A* y *B*, caracterizados por expresar $RE\alpha$, GATA3, queratina 8 y 18, entre otros marcadores, estando el B caracterizado también por expresar *ERBB2* y estar asociado a

una peor sobrevida. 2) *ERBB2+*, que como su nombre lo indica, expresa altos niveles del receptor ERBB2, además de ser RE α -. 3) *Basal-like* (o triple negativo), que junto con el *ERBB2+* son los de peor pronóstico, se caracterizan por expresar queratina 5/17, laminina, integrina β 4, y ser negativos para RE α , RP, y ERBB2. Por ultimo, 4) *Normal breast-like*, caracterizado por expresar genes específicos de tejido adiposo y otras células no epiteliales (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). Sin embargo, aparecieron diferentes cuestionamientos acerca de la utilidad práctica de esta subdivisión en cuanto a su valor como pronóstico de la enfermedad (Miller and Liu, 2007). Otros grupos han avanzado en la identificación de un grupo de genes (*signatures*), más que en la identificación de un subtipo tumoral, que pudiese predecir la recurrencia de la enfermedad en pacientes en estadios tempranos de la misma (t Veer et al., 2002; Wang et al., 2005). Trabajando con tumores primarios de pacientes que no recibieron terapia adyuvante sistémica, cada grupo identificó y validó un set de genes capaces de predecir la recurrencia de la enfermedad a 5 años. El grupo de genes identificado por *van't Verr y col* (también conocido como el *Amsterdam signature*), consistió en 70 genes, mientras que el identificado por *Wang y col* (conocido como el *Rotterdam signature*), fue de 76 genes. En cada caso, el poder pronóstico fue independiente y superior a factores de riesgo convencionales (como tamaño tumoral, grado histológico, o edad de la paciente), y superior en comparación a métodos clásicos utilizados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de EEUU, en predecir que paciente debería o no, recibir terapia adyuvante (t Veer et al., 2002; Mook et al., 2009). Este *microarray* de 70 genes desarrollado en Holanda, se lo conoce como *Mammaprint*.

Dada la importancia actual del estroma tumoral en la inducción y promoción del cáncer de mama, los ensayos de *microarrays* de ADN constituyen una poderosa herramienta para monitorear simultáneamente cientos de posibles factores involucrados en la interacción estroma-epitelio tumoral (Hu and Polyak, 2008). Esta estrategia, acoplada a metodologías por las cuales es posible aislar células epiteliales o estromales de un tumor (*Laser Capture Microdissection, LCM*; Lechpammer and Sgroi, 2004; Fuller et al., 2003), permitieron avanzar en el conocimiento de esta interacción. Numerosos trabajos han aparecido donde ponen de manifiesto las diferencias moleculares entre el estroma de un tumor, con el estroma de la mama normal (Singer et al., 2008; Sadlonova et al., 2009), diferencias entre estromas de tumores en diferentes estadios de la enfermedad (Casey et

al., 2009; Ma et al., 2009), o incluso, estudios donde utilizan los perfiles de expresión génica en el estroma como valor pronóstico de la enfermedad (Finak et al., 2008).

VI. Modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios por progestágenos

En nuestro laboratorio se desarrolló un modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios murinos por administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/c, con una incidencia actuarial del 76% y una latencia media de 52 semanas (Lanari et al., 1986a; Lanari et al., 1986b; Lanari et al., 2009). Estos tumores son en su mayoría de origen ductal con capacidad de dar metástasis en pulmón y nódulos linfáticos (Lanari et al., 1989). Poseen inicialmente, un comportamiento progestágeno-dependiente u hormono-dependiente (HD) con altos niveles de expresión de receptores de estrógenos (RE α y RE β) y de progesterona (RP), y bajos o no detectables para prolactina y EGF (Molinolo et al., 1987). Expresan ERBB2 (Elizalde et al., 2000; Elizalde et al., 2001), mientras que el FGF-2 (Giulianelli et al., 2008a) y el TNF α (Rivas et al., 2008) estimulan el crecimiento de este tumor *in vivo*, en ausencia de MPA. El E2 y los antiprogestágenos (Kordon et al., 1991) inhiben el crecimiento tumoral progestágeno dependiente.

Los tumores se mantienen por pasajes singeneicos en ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c en presencia del progestágeno. Asimismo, se lograron seleccionar por presión selectiva en ratones sin tratar con el MPA, variantes progestágeno-independientes u hormono-independientes (HI) que conservan altos sus niveles de expresión del RE y del RP. La Figura 1.8 representa esquemáticamente la obtención de las líneas tumorales HD y HI a partir de tumores ductales inducidos por MPA.

En menor proporción, el MPA induce también carcinomas del tipo lobulillar que expresan bajos niveles de RE y RP y mayores de EGFR 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).

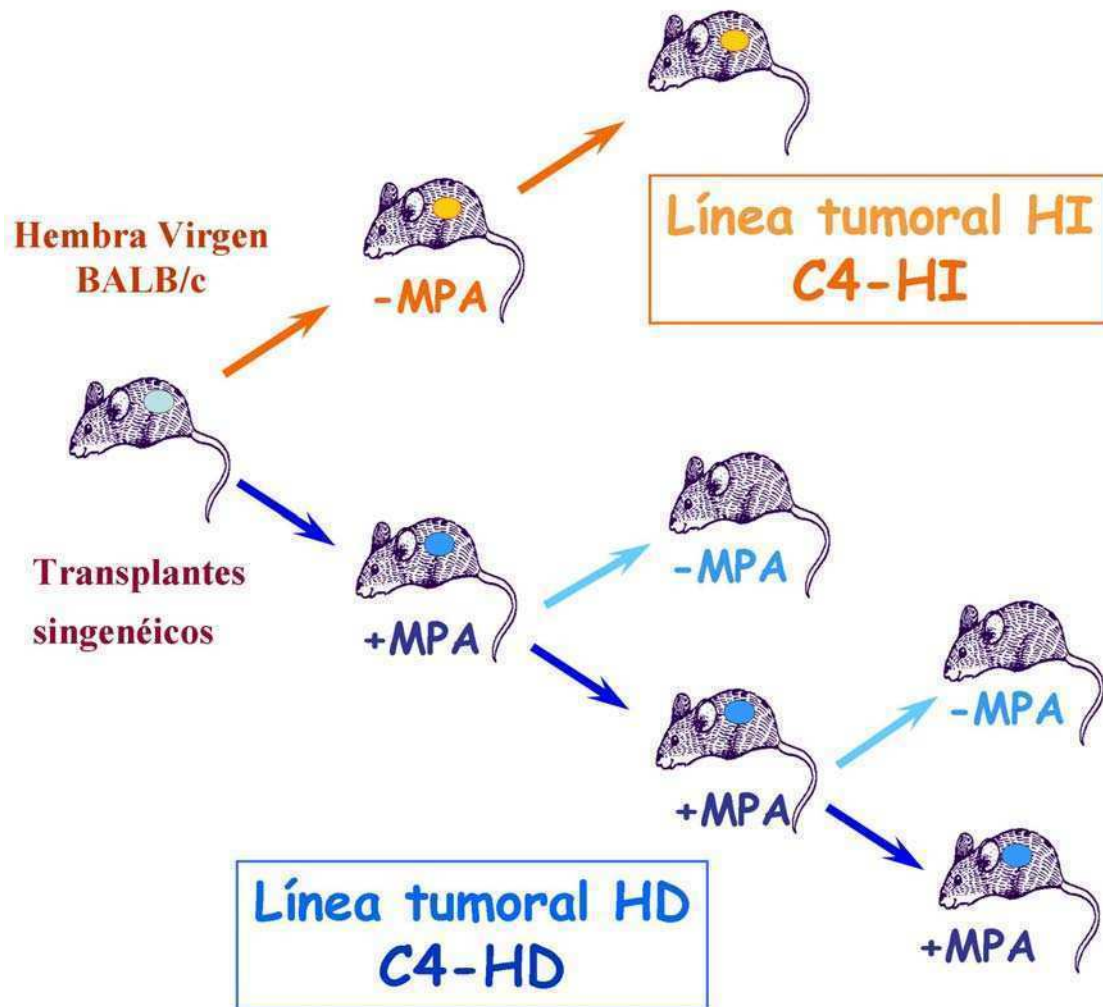


Figura 1.8. Obtención de líneas tumorales hormono-dependientes (HD) e independientes (HI). Se transplanta el tumor primario a dos ratones hembras BALB/c tratados con MPA (depósito de 20 mg sc, contralateral al trasplante tumoral) y a dos ratones sin tratar. Los tumores ductales HD crecen sólo en los tratados con MPA durante los dos a tres primeros meses de seguimiento. Cuando el tumor alcanza un tamaño aproximado de 10-15 mm de diámetro, se transplanta a otros dos ratones tratados, o no, con MPA y así sucesivamente controlando la hormono-dependencia, es decir que el tumor no crezca durante dos meses en los ratones sin tratar. Para seleccionar una variante HI, se espera hasta que empiece a crecer un tumor en los animales sin tratar. Luego se lo transplanta a animales en ausencia de MPA, y así sucesivamente. Dentro de las variantes HD y HI, en esta tesis se utilizaron los tumores de la familia C4, es decir, C4-HD y C4-HI respectivamente.

En los primeros experimentos, luego de un período de latencia de 4 a 12 meses se establecieron diversas líneas tumorales. Algunas de ellas, definidas como HD, 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 1.9.A).

Eventualmente surgieron variantes tumorales HI que crecían tanto en presencia como en ausencia de la hormona (Kordon et al., 1990; Lanari et al., 1989; Molinolo et al., 1987). Estas variantes conservan altos niveles de RE y RP (Figura 1.9.C). Los tumores HI crecen en forma similar en animales tratados con MPA, no tratados, ovariectomizados y con operación simulada (Figura 1.9.B).

Recientemente, los tumores HI se han subdividido en respondedores o no respondedores (o resistentes - HIR). Esta subdivisión se basó en la capacidad de inhibir su crecimiento tumoral en respuesta a antiprogéstágenos (RU 486 y ZK 211) y E2 (Helguero et al., 2003; Wargon et al., 2008). Estos tratamientos endócrinos son capaces de inhibir el crecimiento tumoral tanto HD como HI (Montecchia et al., 1999; Simian et al., 2006; Figura 1.10.A).

Las células epiteliales HD purificadas de cultivos primarios son estimuladas con Pg o MPA, e inhibidas con E2 o con antiprogéstágenos (Figura 1.10.B; Dran et al., 1995). FGFs, HRG o TNF α estimulan su crecimiento (Balana et al., 1999; Lamb et al., 1999), mientras que el EGF, IGF-I e IGF-II no tienen efecto estimulador cuando se los administra solos (Elizalde et al., 1998; Molinolo et al., 1998), sin embargo, producen una potenciación de la estimulación inducida por MPA. TGF β 1, 2 y 3 ejercen todos efectos inhibitorios de la proliferación celular (Viegas et al., 1999). A pesar de que *in vivo* ambas variantes tumorales, HD y HI, son muy diferentes en cuanto a la dependencia por el MPA (Figura 1.9.A y B), *in vitro*, las células epiteliales derivadas de los mismos tumores, tienen el mismo requerimiento de hormonas y de factores de crecimiento para crecer (Giulianelli et al., 2008a). Es decir, ambos cultivos primarios son estimulados por MPA, y esta estimulación es inhibida por RU 486 y E2 (Figura 1.10.B). Postulamos que en los tumores HI, factores estromales podrían estar activando a los RP. En una línea de trabajo que venimos desarrollando desde hace varios años en nuestro laboratorio, demostramos que el FGF-1 y el 2 (*fibroblast growth factor* 1 y 2) regulan la proliferación de células HD en forma similar al MPA, demostrando así un *cross talk* entre la vía del FGF y del RP (Giulianelli et al., 2008a; Lamb et al., 1999). Los FGFs, son factores de crecimiento involucrados en angiogénesis, cicatrización de heridas (Schultz and Wysocki, 2009) y en el desarrollo embrionario (Bottcher and Niehrs, 2005). Son proteínas secretadas al medio extracelular, que ejercen su acción por unión a receptores específicos con actividad tirosina-quinasa en la membrana (FGFR). Observamos que el co-cultivo de fibroblastos con células epiteliales tumorales HI, indujo una fuerte estimulación de la proliferación

celular y que el FGF-2 secretado por los fibroblastos estromales podría ser uno de los factores que activan a los RP (Giulianelli et al., 2008a).

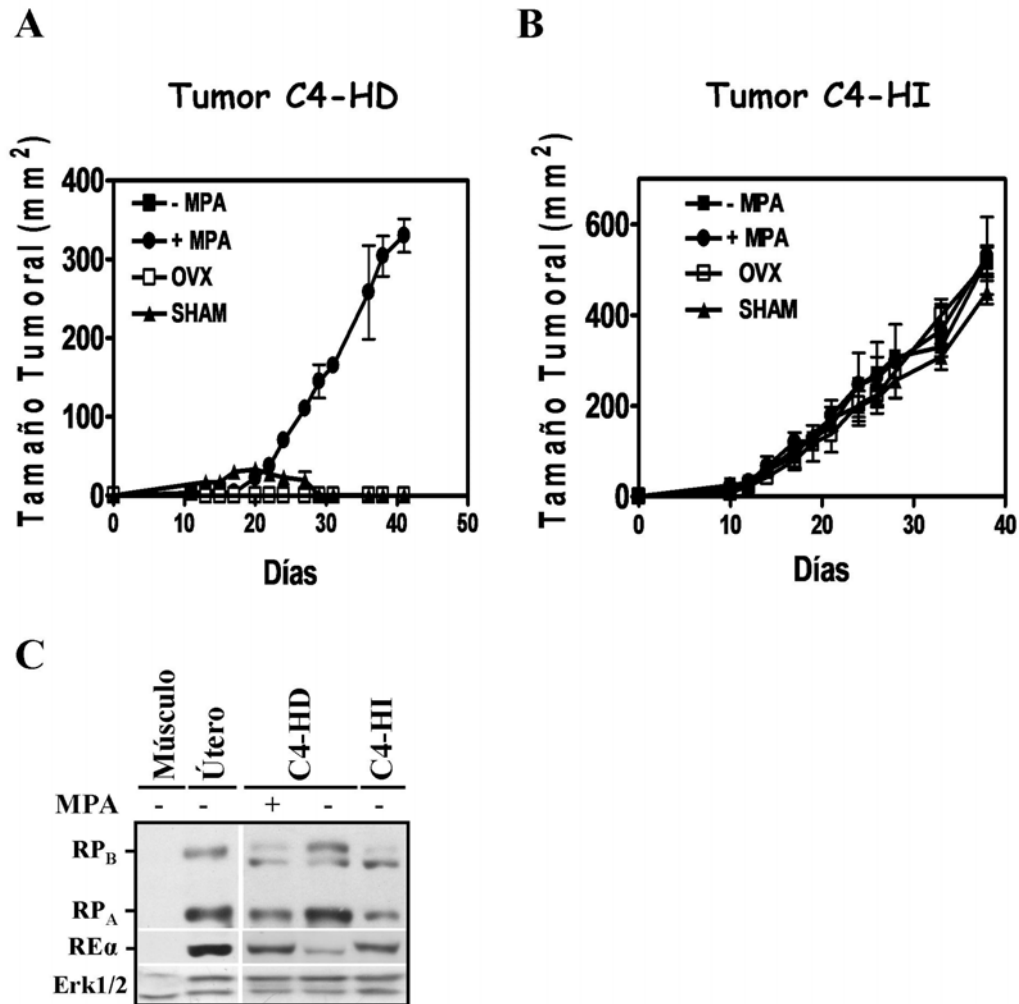


Figura 1.9. Crecimiento de adenocarcinomas mamarios murinos *in vivo*. Los tumores se transplantaron con trócar en el flanco inguinal derecho de animales ovariectomizados (OVX), con operación simulada (SHAM), inoculados sc en el flanco inguinal izquierdo con un depósito de MPA (20 mg/ratón, +MPA) y controles (-MPA). El tamaño se midió cada 2-5 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: A) hormono-dependiente, C4-HD; B) hormono-independiente, C4-HI. Tomado de (Helguero et al., 2003). C) Expresión del RP y de RE α *in vivo*. Tumores C4-HD creciendo con MPA, o cuando el progestágeno fue eliminado 48 hs previo al sacrificio del animal, y tumor C4-HI. Útero: extracto de útero, utilizado como control positivo de receptores hormonales. Músculo: extracto de musculo, utilizado como control negativo para la expresión del RP y del RE α . Se utilizó Erk1/2 como control de carga.

En este modelo, el RP juega un papel esencial en el crecimiento tumoral. Los tumores de crecimiento HI respondedores al tratamiento endocrino, tienen el mismo patrón de expresión de isoformas del RP que los tumores HD, excepto que en los primeros el MPA regula principalmente la isoforma B del 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., 2003), siendo el RP_A el que se encuentra expresado en menor cantidad respecto al RP_B (Wargon et al., 2008). La importancia de este receptor en el crecimiento tumoral fue determinada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* con nucleótidos antisentido para el RP (asRP). Esta estrategia redujo los niveles de expresión del RP, causando una inhibición en la proliferación celular *in vitro*, y una inhibición el crecimiento tumoral HI *in vivo* (Lamb et al., 2005).

En los tumores respondedores de este modelo, la relación RP_A/RP_B es similar a la observada en el útero y glándula mamaria normal del ratón, siendo mayor que uno (Helguero et al., 2003).

La regresión tumoral inducida por RU 486 y E2, es acompañada de citostasis, apoptosis de células epiteliales e incremento en proteínas regulatorias del ciclo celular como p21, p27 y p53, llevando a una disminución del parénquima, a un aumento del estroma tumoral y a una remodelación en el patrón de expresión de laminina y colágeno IV (Vanzulli et al., 2002; Simian et al., 2006), o a la diferenciación celular (Wargon et al., 2008). Recientemente, utilizamos agonistas selectivos para el $RE\alpha$ y el $RE\beta$, con el fin de identificar qué receptor estaba involucrado en la inhibición en el crecimiento tumoral mediado por E2. *In vitro*, E2, PPT (agonista selectivo del $RE\alpha$) y DPN (agonista selectivo del $RE\beta$) inhiben la proliferación mediada por MPA de células epiteliales C4-HI, observando una disminución en la expresión del $RE\alpha$ y en ciclina D1, y un incremento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax. Mientras que *in vivo*, E2 y PPT son muy similares en inducir regresión tumoral, observando una disminución en la expresión del $RE\alpha$ y un incremento en la participación de la vía intrínseca de la apoptosis (aumento de Bax y caspasa 9 activa, y disminución de Bcl-xl y Bcl-2). Mientras que con el DPN, se observó un efecto inhibitorio transiente en el crecimiento tumoral, acompañado por un aumento en la expresión de Bax y Aif (Soldati et al., 2009).

Además, como se explicó previamente, la apoptosis inducida por E2 está relacionada a la sobreexpresión de $PKC\alpha$ en ciertos tipos celulares (Zhang et al., 2009).

En este modelo, también vemos una elevada expresión de PKC α en tumores respondedores al tratamiento con E2 (tumores C4-HI), en comparación a aquellos no respondedores o resistentes (tumores C4-2-HI, resultados no publicados).

El estudio citogenético de los tumores de este modelo demostró que los tumores HD presentan generalmente un número de cromosomas cuasi-diploide, mientras que las variantes HI, o mantienen el mismo número (la minoría) o 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., 2005). 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., 2005).

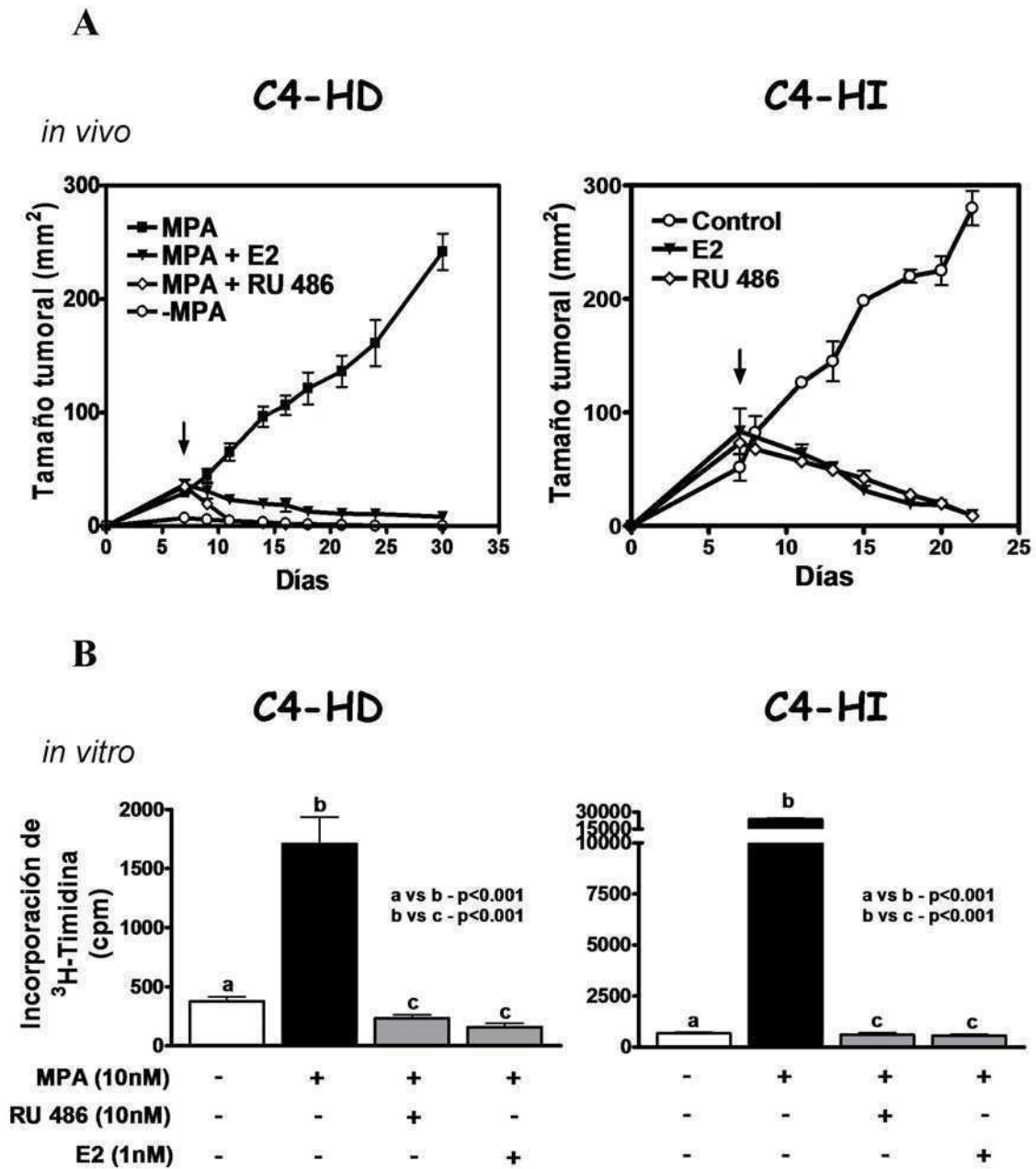


Figura 1.10. Respuesta al tratamiento endócrino de adenocarcinomas mamarios murinos *in vivo* e *in vitro*. A) Tumores C4-HD y C4-HI se transplantaron con trócar, sc en el flanco inguinal derecho de ratones hembras de la cepa BALB/c. Se coinoculó un depósito de MPA (20 mg/ratón) sc en el flanco izquierdo sólo en tumores C4-HD. Se realizaron los controles de dependencia hormonal para el tumor C4-HD, transplantados sin MPA (-MPA). El tratamiento hormonal comenzó cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximado 50 mm² (flecha ↓). RU 486: 12 mg/kg/día, E2: 5 mg (*pellet*). El tamaño tumoral se midió cada 2-5 días con un calibre (largo x ancho). En el gráfico se indica la media del tamaño tumoral ± DS. B) Ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada (³H-timidina) a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI. Las células fueron sembradas en placas de 96 *wells*. Luego del pegado a las mismas, el medio fue reemplazado por 1% SFBch por 24 hs. Las células fueron tratadas por 48 hs con MPA (10 nM), RU 486 (10 nM) y E2 (1 nM), y se cuantificó la timidina incorporada como se detalla en Materiales y Métodos. Análisis estadístico: ANOVA y test de Tukey

Hipótesis

Nuestro Laboratorio se ha focalizado en los últimos años en estudiar el papel jerárquico de los RP en el crecimiento del cáncer de mama basado principalmente en observaciones realizadas en nuestro modelo experimental. En este sentido hemos demostrado que tanto el bloqueo de la expresión génica del RP, así como su inhibición farmacológica usando diferentes inhibidores, pueden inducir la regresión tumoral. Demostramos también, que el estroma cumple un rol fundamental en mantener activado al RP en los tumores de crecimiento hormono-independiente (HI), sugiriendo que el estroma de este tumor es diferente al estroma de un tumor hormono-dependiente (HD).

Por otra parte, ya hemos mencionado el controversial efecto de los estrógenos induciendo regresión tumoral asociada a una disminución significativa en la expresión del RE α . Asimismo, datos previos de nuestro laboratorio y del grupo del Dr. Emanuel Levin, mostraron que el tratamiento con MPA aumenta los niveles del RE (medido por técnicas de unión al ligando) en tumores HD, y que todos los tumores que expresaban RP, también expresaban RE. Todas estas observaciones nos indujeron a pensar que ambos receptores, los RE y los RP, estarían involucrados en el crecimiento tumoral en este modelo experimental.

En este trabajo de tesis nos abocamos a contestar dos grandes interrogantes: por un lado, quisimos estudiar qué rol cumplen los RE α tanto en el crecimiento HD como en el HI, y por otro, estudiar las diferencias en los perfiles de expresión génica entre ambos tumores que nos ayudaran a comprender los mecanismos asociados a la adquisición de la hormono independencia. Cuando iniciamos este trabajo ya era conocido en la literatura el concepto clásico de que los estrógenos inducen la síntesis del RP y además ya se habían publicado los trabajos pioneros de *Migliaccio y col* (1998), sugiriendo que para que la Pg pudiera estimular la proliferación celular en las células T47D, el RP_B tenía que interactuar con el RE α , sin su ligando, y éste a su vez con la quinasa c-Src. Por lo tanto nos planteamos investigar dos hipótesis posibles.

Hipótesis 1: Los RE α pueden activarse en forma ligando independiente en este modelo de cáncer de mama y son la causa de los altos niveles de expresión del RP

observado en los tumores. Por lo tanto al eliminar los RE α , disminuyen los RP, que como dijimos son claves en el crecimiento tumoral.

Hipótesis alternativa: Es necesaria la interacción física entre ambos receptores y al eliminar cualquiera de los dos, se obtiene un efecto inhibitorio.

Los experimentos planteados en esta tesis estuvieron diseñados para determinar cuál hipótesis era válida. Es interesante destacar que como observamos una interacción nuclear entre ambos receptores, en la cual la isoforma A del RP estaría involucrada, y esta interacción no había sido descrita anteriormente, decidimos profundizar en dicha interacción nuclear utilizando también la línea humana T47D.

En la segunda parte de la tesis, trabajamos sobre la hipótesis que ha desarrollado el laboratorio, según la cual, el tumor HI libera señales, que actuando en forma parácrina, le permite reclutar un estroma “activado”. Este estroma, participa a su vez en la secreción de factores parácrinos activando al RP. Realizamos estudios de *microarrays* de ADN de muestras estromales y epiteliales de tumores HD y HI, con el fin de determinar diferencias en los patrones de expresión génica entre ambos compartimentos celulares derivados de cada tipo tumoral. En definitiva nuestra hipótesis contempla que el estroma del tumor HI es diferente al del HD.

A partir de estas hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos.

CAPITULO I

OBJETIVO GENERAL: estudiar la interacción entre el receptor de estrógenos *alfa* (RE α) y el receptor de progesterona (RP), y sus implicancias en la regulación del crecimiento de carcinomas mamarios murinos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Activación del RE α

- I. Estudiar diferencias en la expresión del RE α entre tumores C4-HD y C4-HI, y su regulación por MPA.
- II. Estudiar el estado de activación del RE α y su regulación por MPA en tumores C4-HD y C4-HI, midiendo el estado de fosforilación del receptor y su capacidad de unirse a su secuencia consenso en el ADN.
- III. Investigar el efecto del bloqueo en la expresión del RE α sobre la expresión del RP y sobre el crecimiento tumoral.
- IV. Evaluar la interacción entre RE α y RP, y cómo esta interacción es afectada por hormonas estimuladoras o inhibitorias de la proliferación celular.
- V. Evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en la línea celular de cáncer de mama humano T47D que también expresa RE α y RP.

2) Activación del RP por fibroblastos asociados a carcinoma (CAF)

- I. Estudiar la activación del RP por CAFs provenientes de tumores C4-HD y C4-HI.
- II. Investigar si el RE α está involucrado en la estimulación de la proliferación celular inducida por factores estromales.

CAPITULO II

OBJETIVO GENERAL: estudiar los perfiles de expresión génica, obtenidos por *microarrays* de ADN, a partir de tumores C4-HD y C4-HI, como así también a partir de muestras estromales y epiteliales derivadas de los mismos tumores que puedan explicar el crecimiento y regulación diferencial de ambos tipos tumorales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Investigar mediante *microarrays* de ADN diferencias en el perfil de expresión génica inducido por MPA en tumores C4-HD.
- II. Investigar diferencias en el perfil de expresión génica entre tumores C4-HD y C4-HI.
- III. Analizar genes diferencialmente expresados en el componente estromal de tumores C4-HD y C4-HI.
- IV. Analizar genes diferencialmente expresados en el componente epitelial de tumores C4-HD y C4-HI.
- V. Validar los resultados de los *microarrays* de ADN mediante ensayos de IHQ e IF de genes seleccionados en tumores C4-HD y C4-HI.

PARTE II

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Animales, tumores y líneas celulares

Animales

Se utilizaron ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c de dos meses de edad, provenientes del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales fueron criados en grupos de 5 ratones por jaula con temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$) controlada, bajo un cronograma de doce horas de luz/oscuridad, con agua y comida *ad limitum*, siguiendo las recomendaciones del Manual del Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996).

Tumores

En este trabajo utilizamos carcinomas mamarios murinos inducidos por la administración prolongada de MPA a ratones hembra de la cepa BALB/c y mantenidos por trasplantes singeneicos (Lanari et al., 1986a; Lanari et al., 1989; Lanari et al., 2009; Molinolo et al., 1987). Utilizamos el tumor hormono-dependiente (o progestágeno-dependiente) C4-HD, y el tumor hormono-independiente (o progestágeno-independiente) C4-HI.

Hormonas y antihormonas utilizadas *in vivo*

- Mifepristona (RU 486, Sigma Aldrich): Administrada de forma sc en dosis de 12 mg/kg/día. Se preparó una solución madre de concentración 16.2 mg/0.4 ml de etanol absoluto, y diariamente se preparó la solución de trabajo 1:100 en solución fisiológica (SF), inyectándose 0.6 ml/ratón.
- 17β -estradiol (E2, Sigma Aldrich): 5 mg en *pellets* de silastic implantados de forma sc en la parte dorsal del ratón. Los *pellets* se prepararon pesando la cantidad de hormona necesaria. Por ejemplo, para preparar 10 *pellets* (50 mg) y luego con el peso de un *pellet* que es de aprox. 0.05 g se calculó cuánto debían pesar los 10 *pellets* (0.5 g). A este peso se le resta el peso de la hormona (0.05 g) y se obtiene la cantidad de *silastic* que se debe pesar (0.45 g.).

- ICI 182.780 (ICI o Fulvestrant, Aztrazeneca): a partir de una solución de 50 mg/ml, se administró en forma de depósito sc, 0.1 ml por semana por ratón, lo cual corresponde a 5 mg ICI/semana. Se eligió esta formulación en base al trabajo de *Osborne CK y col.* (Osborne et al., 1995).
- Acetato de Medroxiprogesterona o MPA (Lab. Craveri; Argentina): Administrado como depósito sc de 0.1 ml (20 mg). En los ensayos con el tumor C4-HD en ausencia de MPA, se quitó el depósito 2 días antes de extirpar el tumor.

Tratamientos con antihormonas *in vivo*

Los tratamientos comenzaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 50 mm². Se usaron 5 ratones por grupo. Los tumores se midieron con un calibre cada 2-5 días (largo x ancho) y se graficó el tamaño tumoral (mm²) en función del tiempo.

Pasajes tumorales

El trasplante tumoral se realizó utilizando un trócar en el que se coloca un trozo de tumor de 2-3 mm³ en forma sc en el flanco inguinal derecho del animal. En el caso de los tumores progestágeno-dependientes se agrega también en forma sc 0.1 ml de un depósito de MPA (20 mg: Medrosterona, Lab. Craveri) en el flanco inguinal izquierdo. Como control de hormono-dependencia dejamos siempre un animal por pasaje sin tratar con la hormona.

Líneas celulares

- T47D: línea celular derivada de un tumor de mama humano con metástasis en pulmón, que expresa el RE α y el RP (isoformas A y B; Keydar et al., 1979).
- T47D-YA: línea celular establecida a partir de un clon de la línea T47D negativa para la expresión del RP (T47D-Y), la cual fue transfectada de manera estable con un vector de expresión para la isoforma A del RP (RP_A; Sartorius et al., 1994). En esta tesis fue utilizada como control positivo en los ensayos de EMSA para el RP.

- 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 una línea control de no expresión de receptores hormonales.

II. Cultivo celular: medios y soluciones

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 y se esterilizó por filtración.

Suero Fetal Bovino (SFB) de complementado

SFB (PAA Lab. BIOSER, Argentina) calentado en baño térmico a 56°C durante treinta minutos.

SFB adsorbido con carbón o charcolizado (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. El SN 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

- DMEM/F12
- 5% SFBch
- MPA 10nM

Medio de cultivo para células epiteliales C4-HI

- DMEM/F12
- 10% SFB de complementado

Medio de cultivo para la línea celular LM3

- DMEM/F12
- 10% SFB de complementado

Medio de cultivo para la línea celular T47D

- DMEM/F12
- 10% SFB de complementado

Medio de cultivo para la línea celular T47D-YA

- DMEM/F12
- 10% SFB de complementado
- G418: 1/250 de la solución madre 10 mg/ml (Gibco)
- Insulina

Medio de lavado

- DMEM/F12
- 2% SFB de complementado.

PBS 10X

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
(fosfato dibásico de sodio, dodecahidrato. Anedra) 30,06g
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
(fosfato monobásico de sodio monohidratado. Anedra) 2,56g
 - NaCl (Anedra) 87,6g
- Se llevó a un litro con H_2O . Para trabajar se hace una dilución 1:10 con H_2O .

Solución enzimática utilizada para la digestión tumoral

- Tripsina (Gibco, 1:250) 0,25% p/v

II. Materiales y Métodos

- Colagenasa Tipo II (Gibco) 0,25% p/v
 - Albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich) 0,5% p/v
- Se disolvió en PBS 1X.

Solucion de Tripsina

- Tripsina (Gibco, 1:250) 0,25% p/v

Se disolvió en PBS 1X.

Solucion de Tripsina-EDTA

- Tripsina (Gibco, 1:250) 0,25% p/v
- EDTA (Cicarelli) 0,2 % p/v

Se disolvió en PBS 1X.

Timidita tritiada (utilizada en ensayos de proliferación celular)

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

Líquido de centelleo

- Optiphase 'HISAFE' 3 (PerkinElmer).

Hormonas, antihormonas y factores de crecimiento utilizados en cultivos *in vitro*

- MPA (Sigma Aldrich), 10 nM
- RU 486 (Sigma Aldrich), 10 nM
- ICI 182.780 (Astrazeneca), 0.1 – 0.5 y 1 µM
- 17β-estradiol (Sigma Aldrich), 1 nM
- R5020, 10 nM
- FGF-2, 50 ng/ml. Desarrollado en el Lab. del Dr. Baldi en el IByME.

La adición de las hormonas a los cultivos se realizó a partir de soluciones madre concentradas 1000 a 10000 veces en etanol absoluto. La concentración final de etanol no excedió el 0,1% v/v, y no afectó significativamente el crecimiento ni la morfología celular (Dran et al., 1995).

III. 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 minutos. La suspensión celular obtenida está compuesta principalmente por dos poblaciones, una de estirpe epitelial y otra de estirpe fibroblástica. Para separarlas se utilizó la técnica de *Pandis y col.* con algunas modificaciones (Pandis et al., 1992; Dran et al., 1995). 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 centrifuga junto con 15 ml de medio de lavado y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante (SN) y las células se resuspendieron en medio con 10% SFB. La suspensión se dejó sedimentar durante 20 minutos; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados y del SN se obtiene la fracción fibroblástica. A la fracción enriquecida en células epiteliales se le agregó 15 ml de medio de lavado y se resuspendieron las células. Las decantaciones fueron repetidas cada 20 minutos 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 hs en 10% SFB, y luego se eliminó cuidadosamente el SN. Los cambios de medio se realizaron cada 48 hs, 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.

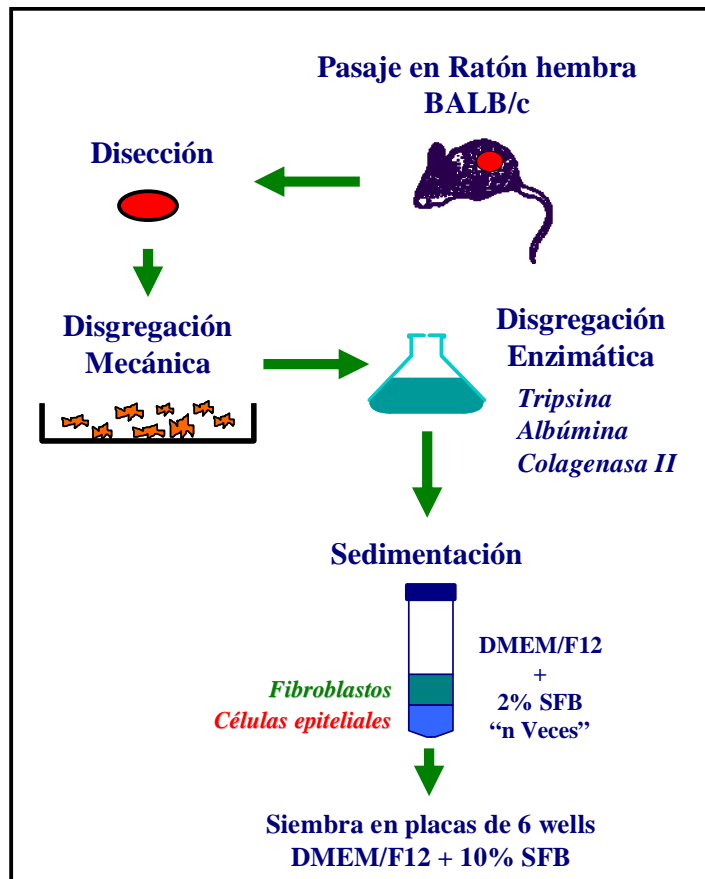


Figura 2.1. Representación esquemática de cultivo de tumores primarios (tomado de la tesis doctoral de C. Lamb).

Para la obtención de cultivos enriquecidos en fibroblastos asociados a carcinoma (*CAFs*), se tomó el SN de la primer decantación y se sembró en placas de 6 *wells* en 10% SFB. Luego de 90 minutos, se observaron las placas al microscopio y se verificó que los *CAFs* estuvieran pegados. Cabe destacar que las células epiteliales no son capaces de adherirse a las placas luego de este tiempo. Con lo cual, se realizó un cambio de medio, agregando medio fresco con 10% SFB. De esta forma solo crecen las células pegadas, *CAFs* en este caso. Los cambios de medio se realizaron cada 48 hs, reemplazándolo por medio fresco con 10% SFB.

Repique de células

Células epiteliales C4-HD y C4-HI

Se lavaron las células con PBS estéril, y se incubaron durante 2-10 minutos a 37°C con la cantidad de tripsina necesaria como para cubrir el fondo de la placa. Una vez que las células se despegaron, se las pasó a un tubo conteniendo 10 ml de medio de cultivo con 10% SFB. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Luego, se descartó el SN y el *pellet* se resuspendió con 10% SFB. Finalmente, se sembraron las células en las placas correspondientes.

Para el caso de las células HD, se las pasó a un medio 5% SFBch con MPA (10 nM), 48 hs luego de repicadas.

CAFs C4-HD y C4-HI

Los cultivos se repicaron luego de alcanzar un 90% de confluencia. Se realizaron lavados con PBS estéril y utilizamos en este caso tripsina-EDTA en lugar de tripsina sola, para levantarlos más rápidamente.

Líneas celulares T47D y T47D-YA

Las células se lavaron con PBS estéril, y se incubaron durante 2-10 minutos a 37°C con la cantidad de tripsina-EDTA necesaria como para cubrir el fondo de la placa. Una vez que las células se despegaron, se las pasó a un tubo conteniendo 10 ml de medio de cultivo con 10% SFB. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Luego, se descartó el SN y el *pellet* se resuspendió con 10% SFB. Finalmente, se sembraron las células en las placas correspondientes en medio 10% SFB.

Ensayos de proliferación celular (Incorporación de ^3H -timidina)

Cultivos primarios de células epiteliales y *CAFs*

Los cultivos enriquecidos en células epiteliales o fibroblásticas se subcultivaron en placas de 96 *wells* y se incubaron durante 24 hs en 10% SFB, para permitir la adhesión. Luego el medio se reemplazó por 1% SFBch durante 24 hs. Las células se incubaron durante 48 horas con las soluciones correspondientes, reemplazándose, a las 24 horas, el 50% del volumen de cada hoyo por medio de prueba fresco. Los ensayos se realizaron por octuplicado. Durante las últimas 18 horas de incubación se aplicó un pulso de 0.4 μCi de ^3H -timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) en cada *well*. Luego los cultivos se tripsinizaron y cosecharon en un cosechador de células, y la radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo líquido beta durante 1 minuto.

Co-cultivos de células epiteliales con *CAFs*

Luego de levantar las células con tripsina, se realizó un recuento celular en cámara de Neubauer. Aproximadamente el mismo número (~2000) de células epiteliales C4-HD, Epi C4-HI, *CAF* C4-HD y *CAF* C4-HI fueron sembradas solas o en las diferentes combinaciones en placas de 96 *wells* en 10% SFB. Luego de 24 hs el medio fue reemplazado por 1% SFBch. Los cultivos estuvieron durante 48 hs en estas condiciones, reemplazándose, a las 24 horas, el 50% del volumen de cada hoyo por medio 1% SFBch fresco. Luego se procedió como en el ítem anterior.

Línea celular T47D

Aproximadamente 20000 células fueron sembradas en placas de 96 *wells* e incubadas durante 24 horas en 10% SFB para permitir la adhesión. Luego el medio se reemplazó por 1% SFBch durante 24 hs. Las células se incubaron durante 48 horas con las soluciones correspondientes, reemplazándose, a las 24 horas, el 50% del volumen de cada hoyo por medio de prueba fresco. Los ensayos se realizaron por octuplicado, y luego se procedió como describimos previamente.

Recuento de células

Las células fueron sembradas en placas de 12 *wells* con 10% SFB y se dejaron adherir durante 48 hs. Luego, el medio fue reemplazado por 1% SFBch por 24 hs. Se incubó con los diferentes tratamientos hormonales durante 6 días, cambiando las soluciones regularmente cada dos días. Al finalizar el experimento se eliminó el medio y las células se despegaron con 1 ml de solución de tripsina. Se contaron las células en 10 μ l de esta suspensión en una cámara de Neubauer. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado y se graficó el número medio de células / ml \pm DS.

Transfecciones

Para ver el efecto del *siRNA* para el RE α de ratón (Santa Cruz Biotech) en los ensayos de expresión de receptores por WB, utilizamos el siguiente protocolo: se prepararon las siguientes soluciones: (a) Lipofectamina 2000 (Invitrogen) 4:100 en Opti-MEM (Gibco), (b) 40 pmol del *siRNA* RE α por *well* de transfección en 100 μ l de Opti-MEM, y (c) 0.5 μ g *pGFP* (vector de expresión para *GFP*) por *well* de transfección en 100 μ l de Opti-MEM. Se incubaron estas soluciones por 5 minutos a temperatura ambiente, para mezclar luego partes iguales de la solución (a) con la (b) y (a) con la (c). Se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente y se utilizaron 200 μ l de cada mezcla (una correspondiente al *siRNA*-Lipo, y otra al control con el *pGFP*-Lipo) por *well* de transfección. Previamente, realizamos cultivos primarios de células epiteliales de tumores C4-HD y C4-HI y se sembraron en placas de 6 *wells* hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Los cultivos se lavaron con medio sin suero y sin antibióticos. Y realizamos la transfección con 200 μ l de cada una de las mezclas descriptas anteriormente más el agregado de 800 μ l de medio sin antibióticos. Luego de 5 hs de transfección a 37°C, se cambió el medio por uno con 10% SFB por 24 hs. Luego las células estuvieron 24 hs en 1% SFBch (condiciones de quiescencia) y se realizaron extractos celulares totales, como describimos mas adelante, para analizar la expresión del RE α y RP por WB.

Para ver el efecto del *siRNA* para el RE α de ratón (Santa Cruz Biotech) en los ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada, se utilizó el

protocolo de Invitrogen para la transfección de *siRNA* usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en placas de 96 *wells*. Brevemente, se prepararon las siguientes soluciones: (a) Lipofectamina 2000 1:100 en Opti-MEM (Gibco), (b) 7.5 pmol del *siRNA* RE α por *well* de transfección en Opti-MEM, y (c) 0.25 μ g *pGFP* (vector de expresión para *GFP*) por *well* de transfección en Opti-MEM. Se incubaron estas soluciones por 5 minutos a temperatura ambiente, para mezclar luego partes iguales de la solución (a) con la (b) y (a) con la (c). Se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente y se utilizaron 50 μ l de cada mezcla (una correspondiente al *siRNA*-Lipo, y otra al control con el *pGFP*-Lipo) por *well* de transfección. Previamente, se tripsinizaron cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI, y se sembraron aproximadamente 5000 células en 100 μ l de volumen final por *well*, en medio completo sin antibióticos. Las células se mantuvieron durante dos días en estas condiciones. Luego se las ayunó con 1% SFBch durante 24 hs, para luego seguir con el protocolo estándar de proliferación celular como se describió anteriormente. Cabe destacar en este caso, que los cultivos fueron estimulados o no con MPA (10 nM).

IV. Extractos tumorales y celulares

Extractos totales de tumor

Buffer TEDG: 20 mM Tris-HCl (Invitrogen) pH 7.4
1.5 mM EDTA (Cicarelli)
0.25 mM dithiothreitol (Sigma)
20 mM Na₂MoO₄ (Merck)
10 % glicerol (Raudo)

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

Los tumores fueron homogenizados con un *polytron*, en una proporción 1:4 tejido:*buffer* TEDG (gr:ml) mas inhibidores de proteasas. El homogenato fue mantenido en hielo durante 20 minutos, y centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. El SN fue

inmediatamente congelado a -70°C hasta utilizarlos en ensayos de WB. Se estimó la concentración de proteínas por el método de *Lowry*.

Extractos nucleares de tumor

Los tejidos se homogeneizaron en *buffer* TEDG (1:4 tejido:*buffer*) + 0.25 M sacarosa (TEDGS) e inhibidores de proteasas, y el homogenato se centrifugó a 3000 rpm, 10 minutos a 4°C . Se recolectó el SN que se centrifugó a 12.000 rpm, 20 a 4°C . El SN resultante es la fracción citosólica. Se resuspendió el *pellet* de 3000 rpm en *buffer* TEDGS + 0.4 M KCl e inhibidores de proteasas, se incubó durante 30 minutos en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C . El SN es la fracción nuclear. Los extractos fueron inmediatamente congelados a -70°C hasta utilizarlos en ensayos de WB. Se estimó la concentración de proteínas por el método de *Lowry*.

Extractos celulares totales

Se realizaron a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI. Los cultivos se lavaron con PBS frío, y las células fueron lisadas con el *buffer* comercial M-PER *mammalian protein extraction reagent* (Thermo Scientific), mas inhibidores de proteasas, según recomendaciones del fabricante. Los extractos fueron inmediatamente congelados a -70°C hasta ser utilizados en ensayos de WB. Se estimó la concentración de proteínas por el método de *Lowry*.

Extractos celulares nucleares

Medios y soluciones:

TEDGS 10%:	Tris	50 mM (pH 7.4)
	EDTA	7.5 mM
	DTT	0.5 mM
	Glicerol	10%
	Sacarosa	0.25 M
Buffer lavado núcleos:	TEDGS 10% + NP-40 0.01%.	

Buffer rotura núcleos: TEDGS 10% + KCl 0.4 M.

TEDGS 30%: *Ídem* TEDGS 10% pero con 30% de glicerol.

Preparación de extractos nucleares

Se realizaron a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI, solas o en co-cultivo con fibroblastos, y a partir de las líneas tumorales de mama humanas T47D y T47D-YA. Los cultivos se lavaron con PBS frío, y las células fueron recolectadas y centrifugadas a 3300 rpm por 10 minutos a 4°C. El *pellet* de células se resuspendió en *buffer* TEDGS 10% en presencia de inhibidores de proteasas (0.5mM PMSF, 0.025mM ZPCK, 0.0025mM TLCK, 0.025 mM TPCK, 0.025mM TAME) en hielo. El homogenato se volvió a centrifugar a 3300 rpm, 10 minutos., 4°C. Como resultado se obtuvo un SN que se volvió a centrifugar a 12000 rpm, 20 minutos, 4°C para luego ser guardado a -70°C. El SN contiene la fracción citosólica. Por otra parte, el *pellet* obtenido luego de centrifugar a 3300 rpm se resuspendió en *buffer* de lavado de núcleos (TEDG 10% + NP-40 0.01%) en presencia de inhibidores de proteasas. Luego de centrifugar a 3300 rpm por 10 minutos a 4°C, el *pellet* conteniendo los núcleos celulares fueron resuspendidos en *buffer* TEDGS + 0.4M KCl más inhibidores de proteasas, que permite la rotura de los núcleos. Se ayudó al disgregado del extracto utilizando una jeringa y se dejó extraer en hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. El SN constituyó el extracto nuclear, y fue diluido 1:2 en TEDGS – 30% glicerol mas inhibidores de proteasas, para reducir la concentración de sales. Se guardaron los extractos a -70°C y se cuantificaron los niveles de proteínas por el método de Lowry.

V. Cuantificación de proteínas: método de *Lowry* (Lowry et al., 1951)

Se realizó una curva patrón de BSA con valores en un rango desde 0-100 µg (por duplicado). Solución 1 (Sc1): CuSO₄ 1 %, tartrato de Na₂K 1 % en buffer Na₂CO₃ 2 % / NaOH 1N.

Se diluyó la muestra 3:100 o 5:100 (según se trató de un extracto tumoral o de células en cultivo respectivamente). De esta dilución se tomaron 100 µl y se agregaron 0.9 ml de Sc1. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó reactivo de Folin (Folin–Ciocalteu, Anedra) diluído a la mitad. Se esperó 30 minutos y se midió absorbancia a una longitud de onda de 750 nm (lector de ELISA). Se estimó la

concentración de proteínas en cada extracto, ingresando el valor de absorbancia a 750 nm en la curva patrón.

VI. Ensayos de inmunoprecipitación (IP)

Anticuerpos utilizados en IP:

Anti-RP: C-19 (polyclonal, Santa Cruz Biotech)

Anti-RE α : MC-20 (policlonal, Santa Cruz Biotech)

Anti- β Actina: I-19 (policlonal, Santa Cruz Biotech)

Se utilizó Proteína A-agarosa (Santa Cruz Biotech) para inmunoprecipitar con anticuerpos policlonales, y Proteína G-agarosa (Santa Cruz Biotech) para anticuerpos monoclonales.

Para cada reacción de IP se utilizó 0.5-1 mg de proteínas, a partir de extractos nucleares de tumor C4-HD, C4-HI o de la línea celular T47D. Se llevó a 200 μ l de volumen final con el *buffer* utilizado en cada caso. Posteriormente, se realizó un preclareado con proteína A o G-agarosa durante 60 minutos en hielo. Luego de centrifugar a 3500 rpm, 5 minutos a 4°C, se recuperó el SN y sobre este se realizó la IP propiamente dicha. Se agregó 4 μ g de anticuerpo anti-RP o anti-RE α por reacción, incubando 16 h a 4°C con agitación. Luego se agregaron 40 μ l de proteína A o G-agarosa por tubo, se incubó en hielo, con ocasional agitación durante 2 hs. Luego de centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C, se lavó (4 veces) el *pellet* con 1 ml de buffer TEDG + inhibidores de proteasas, para luego resuspenderlo en 80 μ l de *Cracking Buffer* 1X. Se utilizaron 20 μ l para la corrida electroforética y WB.

Como control de la técnica, se realizamos las IP sin anticuerpos o con un anticuerpo (anti- β Actina) no relacionado a RP o RE α .

VII. Western blot

- **Acrilamida 30%:**

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

Se agitó durante 30 minutos. La solución se filtró y se guardó a 4°C protegida de la luz.

- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8**

Tris	90.85 gr
H ₂ Od	400 ml

Se llevó a pH con HCl 1:2 y se completó el volúmen hasta 500 ml con H₂Od.

- **Tris-HCl 1.0 M pH 6.8**

Tris	60.57 gr
H ₂ Od	400 ml

Se llevó a pH con HCl 1:2 y se completó el volúmen hasta 500 ml con H₂Od.

- **SDS 10%**

SDS (Gibco BRL)	10 gr
H ₂ Od	100 ml

- **Persulfato de amonio 10% (APS)**

APS (Amersham)	1 gr
H ₂ Od	10 ml

- **PBS pH 7.4**

NaCl (Anedra)	0.8%
KCl (Anedra)	0.02%
Na ₂ HPO ₄ (Anedra)	0.144%
KH ₂ PO ₄ (Anedra)	0.024%
En H ₂ Od.	

- **PBST (PBS-Tween 0.1%)**

PBS	
Tween 20 (Anedra)	0.1%

- **Cracking Buffer o solución de siembra 4X**

SDS (Gibco)	8 %
-------------	-----

II. Materiales y Métodos

β - mercaptoetanol (Sigma) 20 % v/v

Glicerol (Raudó) 40 %

Tris 0.18M pH 6.8 0.25 M

Azul de Bromo Fenol (BPB; Sigma) 0.04 % p/v

Se diluyó 1:4 con cada muestra.

- **Ponceau S**

Red Ponceau (Sigma) 0.5 %

Ácido acético glacial (Merck para análisis) 1 %

- **Buffer de corrida 10X**

Tris (Invitrogen) 30 gr

Glicina (Invitrogen) 144 gr

SDS (Gibco) 10 gr

Se llevó a un litro con H₂O_d y se diluyó 1/10 en H₂O_d antes de usar.

- **Buffer de transferencia**

Buffer de corrida 1X 800 ml

Metanol (Merk, para análisis) 200 ml

- **Marcadores de peso molecular**

Rainbow prestained molecular weight markers (Amersham).

- **Membrana de nitrocelulosa**

Hybond C (0.45 μ m; Amersham).

- **Solución de bloqueo**

Leche descremada 5% en PBST

Anticuerpos primarios:

Monoclonales

Anti-RP: Ab7 (Neomarkers)

Anti-pSer190 RP: Ab11 (Neomarkers)

Anti-pSer294 RP: Ab12 (Neomarkers)
Anti-pSer118 RE α : #2511 (Cell Signaling)
Anti-Tubulina: Ab4 *cocktail* (Neomarkers)
Anti-Akt (#610837, Transduction Lab)

Policlonales

Anti-RP: C-19 (Santa Cruz Biotech)
Anti-pSer294 RP (Abcam)
Anti-RE α : MC-20 (Santa Cruz Biotech)
Anti-pSer167 RE α : #2514 (Cell Signaling)
Anti- β -Actina: I-19 (Santa Cruz Biotech)
Anti-Erk1/2: K-23 (Santa Cruz Biotech)
Anti-Sp1 (Neomarkers)
Anti-RE α : SP1 – RM-9101-S0 (Neomarkers)
Anti-pSer473 Akt: #4060 (Cell Signaling)

Anticuerpos secundarios:

Anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa, *whole antibody* (Amersham).
Anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Vector Labs.).
Anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa, *whole antibody* (Amersham).
Anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Vector Labs.).

- **Sustrato quimioluminiscente:**

A) 4.6 ml de H₂O + 333 μ l Tris pH 8.8 + 50 μ l Luminol + 22 μ l Ac. Cumárico.

B) 4.6 ml de H₂O + 333 μ l Tris pH 8.8 + 3.2 μ l H₂O₂ (Merck)

Se mezclaron las soluciones (A) y (B), y se colocó el resultante sobre las membranas de nitrocelulosa durante 2 minutos aproximadamente, antes de exponer las películas fotográficas.

Luminol (A8511, Sigma Aldrich): 22 mg en 500 μ l de DMSO.

Ac. Cumárico (C9008, Sigma Aldrich): 7.5 mg en 500 μ l de DMSO.

- **Película fotográfica:**

CP BU New (Agfa).

Metodología

Las muestras (50-100 µg de proteínas totales/calle) se separaron en un gel de poliacrilamida discontinuo usando el sistema de *buffers* discontinuos de *Laemmli* (Laemmli, 1970). Se corrió un conjunto de marcadores de peso molecular en cada gel. Las proteínas se disolvieron en solución desnaturalizante (*cracking buffer*) y se hirvieron durante 5 minutos. Se realizó la electroforesis durante 20-30 minutos a 20 mA/gel hasta que la muestra pasó el gel concentrador, y por 90-120 minutos a 25 mA/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 toda la noche en solución de bloqueo. Al terminar el bloqueo, las membranas se lavaron varias veces en PBST y luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante 16 h a 4°C en agitación. Luego de varios lavados en PBST, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa. Y se revelaron las bandas inmunoreactivas con el sustrato quimioluminiscente, que al ser modificado por la peroxidasa del anticuerpo secundario, da una señal quimioluminiscente. Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica. Los geles se cuantificaron utilizando el programa *ImageJ*. Sólo se cuantificó la intensidad de las bandas en los geles donde la proporción de intensidad se mantuvo lineal.

VIII. Ensayos de *mobility gel shift* (EMSA)

Marcación de la Sonda

Elemento respondedor a progestágenos (Roemer et al., 2006; PRE - *DNagency*)

5' gatcc**TGTACA**gga**TGTTCT**agctaca 3' sentido
5' ttagct**AGAACA**tcc**TGTACA**ggatc 3' antisentido

Elemento respondedor a estrógenos (Tremblay et al., 1997; ERE - Genbiotech)

5' ggatcta**GGTCA**ctg**TGACC**ccggatc 3' sentido
5' gatccgg**GGTCA**cag**TGACC**tagatcc 3' antisentido

Elemento respondedor a CREB mutado (CRE - *DNagency*), tiene un cambio de bases en la secuencia consenso "AC" por "TG"

II. Materiales y Métodos

5' agagattgccTGTGGTCAgagagctag 3' sentido
5' ctagctctcTGACCACAggcaatctct 3' antisentido

1. Se desnaturalizó el PRE o el ERE (según corresponda) llevando a 75°C por 5 minutos en baño térmico, dejando que la temperatura descienda lentamente a 37°C.
2. Colocar en hielo:
 - a. H₂O_d estéril 18.3 µl
 - b. *Buffer* T4PNK (New England Biolabs) 2.5 µl
 - c. Sonda renaturalizada (75ng) 2.2 µl
 - d. T4PNK (New England Biolabs) 1 µl
 - e. ATP-γ ³²P (New England Nuclear) 1 µl
3. Se incubó 1h a 37°C.

Frenado de la reacción

Se precipitó la sonda marcada agregando en el tubo de reacción:

- a. EDTA (0.5M; pH 8) estéril 2 µl
- b. Glucógeno 1 µl
- c. H₂O_d estéril 2 µl
- d. NH₄AcO (7M) 15 µl
- e. Etanol absoluto 90 µl

Se incubó durante 40 minutos a -70°C y se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 12000 rpm. En un contador de pozo se contó la emisión del *pellet*. El SN también se contó como control de marcación. Luego, se resuspendió en H₂O_d estéril de manera de obtener entre 30000-50000 cpm/µl.

Hibridización de la sonda marcada con el extracto nuclear

1. El ensayo de EMSA consta de incubar un extracto proteico con la sonda-³²P. Para luego detectar los complejos proteína-sonda-³²P por su movilidad retardada en un gel de poliacrilamida no desnaturizante.

Se agregó en un tubo:

- Extracto nuclear 10-20 µg de proteínas totales
- *Buffer* de hibridización* 6 µl
- Poli dI-dC ** (Sigma) 40 ng/µg de proteína del extracto

- PRE-³²P o ERE-³²P 1 µl (50000 cpm/ensayo)
- Inhibidores de proteasas*** (Sigma) 1X

*El *buffer* de hibridización contiene:

Tris pH 7.4	10 mM
NaCl	50 mM
DTT	5 mM
MgCl ₂	2 mM
BSA	50 ng/ml
Glicerol	10%

Todo disuelto en H₂O_d estéril.

** : Sigma Co. y se resuspende en H₂O_d estéril.

***: Leupeptina: 5 µg/ml
Aprotinina: 5 µg/ml
Pepstatina: 5 µg/ml
Espermina: 0.15 mM
Espermidina: 0.5 mM
PMSF: 0.5 mM

Disueltos en H₂O_d estéril.

Disuelto en etanol absoluto

Se incubó a 4°C por 40 minutos.

Corrida electroforética

1. Preparación del gel 5% no desnaturalizante

a. H ₂ O _d	39.96 ml
b. Archilamida/bisacrilamida (29:1)	7.42 ml
c. TBE 5X*	12 ml
d. APS 10%	0.6 ml
c. TEMED (Amersham)	<u>0.024</u> ml
	60 ml

* Para 0.5 litros de TBE 5X:

- Tris (Invitrogen) 27 g
- Ácido Bórico (H₃BO₃) 12.75 g
- EDTA (0.5M; pH 8) 10 ml

II. Materiales y Métodos

2. Se precorrió el gel sin sembrar 1 h a 10mA por gel (con circulación de agua), en *buffer* de corrida (TBE 0.25X).
3. Se sembraron las muestras y se corrió a 20 mA por gel, por aproximadamente 3 hs.
4. Al finalizar la corrida, se levantó el gel con un papel *whatman*, y se envolvió el gel con un film transparente.
5. Se secó el gel en un secador de geles por 2 h a 80°C.
6. Se expuso el gel en un chasis con placas radiográficas (CP BU New, AGFA) a -70°C durante aproximadamente 24 a 72 horas.
7. Se revelaron los *films* a distintos tiempos buscando la mejor exposición.

Como controles de la técnica, se utilizó un exceso de la sonda fría, produciendo un desplazamiento específico del receptor nuclear de la sonda marcada con ^{32}P . Por otro lado, se empleó una sonda cuya secuencia no está relacionada al pegado del RP ni del RE. Dicha sonda presenta un sitio de unión al factor de transcripción CREB (CRE). Se la utilizó en exceso y no es capaz de desplazar la unión receptor nuclear a su secuencia de pegado consenso correspondiente. Además, se emplearon anticuerpos específicos para RP o RE α (C-19 y MC-20 Santa Cruz Biotech, respectivamente), que utilizados en la reacción de hibridización forman el complejo anticuerpo-receptor nuclear-sonda, produciendo una movilidad retardada o *super shift* de este complejo en el gel.

IX. Inmunohistoquímica

Detección de: RE α (policlonal - MC-20 Santa Cruz Biotech.)

pSer118 RE α (policlonal - #2515 Cell Signaling)

pSer167 RE α (policlonal - #2514 Cell Signaling)

pSer473 Akt (policlonal - #736E11 Cell Signaling)

PDGFC (policlonal - H-125, Santa Cruz Biotech)

RUNX2 (policlonal - Ab 23981, Abcam)

TF (FL-294, policlonal – sc30201, Santa Cruz Biotech)

Anticuerpo Secundario:

Anti-IgG de conejo conjugado a Biotina (realizado en cabra, Vector Labs)

Cortes en parafina

Los tumores se fijaron en formalina 10% en PBS y se incluyeron en parafina según técnicas de rutina. Cortes de 5 μm fueron desparafinados en xileno y se rehidrataron con una serie de alcoholes de graduación decreciente (etanol 100%, etanol 96%, etanol 70%) hasta agua destilada. Se realizó una recaptura de antígenos con una solución de citrato 0.1M en ebullición (con Microondas, durante 4 minutos). Cuando la solución llegó a temperatura ambiente, los cortes se lavaron con abundante H_2O , y la actividad de la peroxidasa endógena se inhibió con H_2O_2 al 10% en H_2O durante 20 minutos. Luego se realizó un bloqueo de los preparados con 10% SFB en PBS durante 60 minutos, y se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos 1/100 en 4% SBF en PBS 16 hs a 4°C. Se lavó con PBS y sucesivamente se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, diluido 1/100 en 4% SFB en PBS. Luego de varios lavados con PBS, los cortes fueron incubados con el complejo ABC, preparado según las indicaciones del fabricante (Vector Labs). Los vidrios se lavaron varias veces con PBS y se revelaron bajo el microscopio con un *kit* de DAKO (K3468), basado en la reacción con 3-3' diaminobenzidina y H_2O_2 . La reacción se detuvo con H_2O destilada y los núcleos se tiñeron con hematoxilina-eosina. Entonces los cortes se deshidrataron en una serie de alcoholes de graduación creciente, xileno y se montaron en medio sintético (DPX, Fluka). Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario en algunos cortes.

X. Inmunofluorescencia (IF)

Detección de: RE α (policlonal - MC-20 Santa Cruz Biotech.)

pSer118 RE α (monoclonal - #2511 Cell Signaling)

pSer167 RE α (policlonal - #2514 Cell Signaling)

pSer104/106 RE α (policlonal - sc-12956, Santa Cruz Biotech)

MMP13 (policlonal - H-230, Santa Cruz)

MMP9 (policlonal hecho en cabra - C-20, Santa Cruz Biotech)

Anticuerpos Secundarios:

Anti IgG de ratón fluoresceinado (FITC, realizado en caballo, Vector Labs)

Anti IgG de conejo fluoresceinado (FITC, realizado en cabra, Vector Labs)

Anti-IgG de cabra fluoresceinado (FITC, realizado en conejo, Zymed)

Cortes en parafina

Los tumores se fijaron en formalina 10% en PBS y se incluyeron en parafina según técnicas de rutina. Cortes de 5 μm fueron desparafinados en xileno y se rehidrataron con una serie de alcoholes de graduación decreciente (etanol 100%, etanol 96%, etanol 70%) hasta agua destilada. Se realizó una recaptura suave de antígenos con una solución de citrato 0.1M en ebullición (con Microondas, durante 1 minutos). Cuando la solución llegó a temperatura ambiente, los cortes se lavaron con abundante H_2O , y luego con PBS. Se bloqueó con SFB en PBS al 10% durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios anti-MMP13 o anti-MMP9 diluidos 1/100 en 4% SFB en PBS durante 16 hs a 4°C. Luego de lavar con abundante PBS se realizó una incubación con el anticuerpo secundario 1:100 en 4% SFB en PBS. Se tiñeron los núcleos con ioduro de propidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 5 minutos, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs). Se observaron los preparados en un microscopio confocal Nikon. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario en algunos cortes.

Cultivos primarios

Las IF se realizaron con células epiteliales C4-HD y C4-HI en cultivo. Las mismas fueron crecidas hasta un 80% de confluencia en *chamber slides* (Lab-Tek, Nunc), y el día anterior a ser utilizadas se cambió el medio de crecimiento por medio con 1% SFBch. Luego de los tratamientos correspondientes, las células se lavaron con PBS frío y fueron fijadas en etanol 70% a -20°C. 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 diluido 1/100 en 4% SFB en PBS durante 16 hs a 4°C. Se lavó con PBS y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario 1:100 en 4% SFB en PBS. Se tiñeron los núcleos con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o ioduro de propidio (IP, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 5 minutos, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs). Se observaron los preparados en un microscopio confocal Nikon.

Ensayo de colocalización nuclear del RP y el RE α por IF, en células epiteliales en cultivo

Detección de: RE α (policlonal - MC-20 Santa Cruz Biotech.)

RE α (monoclonal – M7047 DAKO)

pSer118 RE α (policlonal - #2515 Cell Signaling)

RP (monoclonal – Ab7 Neomarkers)

pSer294 RP (monoclonal – Ab12 Neomarkers)

pSer294 RP (policlonal – Abcam)

Anticuerpos Secundarios:

Anti-IgG de ratón Fluoresceinado (FITC, realizado en caballo, Vector Labs)

Anti-IgG de conejo Texas Red (TX, realizado en cabra, Vector Labs)

Los ensayos de IF, se realizaron a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HD, y a partir de las líneas celulares T47D y LM3 (estas últimas utilizadas como control negativo de la técnica). Las mismas fueron crecidas hasta un 60-80% de confluencia en *chamber slides* (Lab-Tek, Nunc), y fueron ayunadas por 48 hs en 1% SFBch. Luego de los tratamientos correspondientes, las células se lavaron con PBS frío y fueron fijadas en etanol 70% a -20°C por 30 minutos. Se lavó luego con PBS y se bloqueó con SFB en PBS al 10% durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se incubó con los dos anticuerpos primarios juntos (anti-RP y anti-RE α , uno monoclonal y otro policlonal) diluidos 1/100 en 4% SFB en PBS durante 16 hs a 4°C. Se lavó con PBS y se incubó durante 1 h con dos anticuerpos secundarios juntos (anti-ratón FITC y anti-conejo TX) 1:100 en 4% SFB en PBS. Se tiñeron los núcleos con DAPI (1 μ g/ml) durante 5 minutos, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs). Se observaron los preparados en un microscopio confocal Nikon.

Ensayo de colocalización nuclear del RP y el RE α por IF, a partir de tumores creciendo *in vivo*

Detección de: RE α (policlonal - MC-20 Santa Cruz Biotech.)

RP (monoclonal – Ab7 Neomarkers)

Anticuerpos Secundarios:

Anti-IgG de ratón Fluoresceinado (FITC, realizado en caballo, Vector Labs)

Anti-IgG de conejo Texas Red (TX, realizado en cabra, Vector Labs)

Las IF se realizaron a partir de cortes de crióstato de aproximadamente 18 μ m de los tumores C4-HD y C4-HI (no se muestra en esta tesis). Los cortes se fijaron en formalina (10% de formaldehído en PBS) durante 20 minutos. Se lavaron luego con PBS 1X y se bloqueó con SFB en PBS al 10% durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se incubó con el anticuerpo primario anti-RP (Ab7) diluido 1/100 en 4% SFB en PBS durante 16 hs a 4°C. Se lavó con PBS y se incubó durante 2 h con el otro anticuerpo primario anti-RE α (MC-20) en 4% SFB en PBS. Luego de lavar con abundante PBS se realizó una incubación con los dos anticuerpos secundarios juntos (anti-ratón FITC y anti-conejo TX) 1:100 en 4% SFB en PBS. Se tiñeron los núcleos con DAPI (1 μ g/ml) durante 5 minutos, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs). Se observaron los preparados en un microscopio confocal Nikon.

Incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) por IF

Detección de: BrdU (monoclonal, Roche)

Citoqueratina (CK, policlonal. Pan-CK, Dako)

Anticuerpos Secundarios:

Anti-IgG de ratón Fluoresceinado (FITC, realizado en oveja, Roche)

Anti-IgG de conejo Cy3 (realizado en cabra, Zymed)

La identificación de células en proliferación por la técnica de BrdU, se basa en este es un análogo de la timidina y por lo tanto es incorporado al ADN durante la fase de replicación, subsecuentemente se localiza usando un anticuerpo monoclonal específico anti-BrdU. Se utilizaron células epiteliales tumorales provenientes de un cultivo primario las cuales fueron crecidas hasta un 80% de confluencia en *chamber slides* (Lab-Tek, Nunc). Se ayunaron por 24 hs en 1% SFBch, y se realizaron los tratamientos hormonales correspondientes.

Las células fueron tratadas con BrdU (Sigma, 100µg/ml) 6 hs antes de la finalización de los estímulos. Se lavaron las células con PBS, y se fijaron en etanol 70% por 30 minutos a -20°C. Luego de lavar con PBS, se realizó una incubación con HCl 2N 30 minutos – 60 minutos a 37°C. Se lavó abundantemente con PBS, y se bloqueó con 10% SFB en PBS por 1 h. La incubación con el anticuerpo anti-BrdU se realizó en 4% SFB en PBS 16 hs a 4°C. Luego de lavados con PBS, se incubó con un anticuerpo anti-citoqueratina 1/100 durante 1 h a temperatura ambiente en 4% SFB en PBS. Se lavó con PBS y se incubó durante 1 h con dos anticuerpos secundarios juntos (anti-IgG de ratón FITC y anti-IgG de conejo Cy3) 1:100 en 4% SFB en PBS. Se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs). Se observaron los preparados en un microscopio confocal Nikon.

XI. Análisis estadístico

En los experimentos de proliferación celular y recuento de células, para comparar múltiples grupos con el control y entre sí, se uso ANOVA seguido del *test* de *Tukey*. Las diferencias entre medias de dos grupos se evaluaron con una prueba “*t*” de *Student*, utilizando el programa *GraphPad Prism* (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc.).

En las curvas de regresión con ICI, RU 486 y E2 en los experimentos *in vivo*, se calcularon las pendientes de las curvas y se analizó si diferían significativamente entre sí, con el programa *GraphPad Prism* (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc.). Para el tumor C4-HD se analizaron las pendientes de las curvas desde el día de inicio de los tratamientos (día 7) hasta el día 14. Para el tumor C4-HI, se analizó desde el día de inicio de los tratamientos (día 7) hasta la finalización de los mismos.

En los ensayos de WB o EMSA, la intensidad de las bandas se cuantificó usando el software *Image J* (1.345 NIH), sólo se cuantificaron exposiciones no saturadas.

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

XII. Ensayos de *microarrays* de ADN

Se utilizaron las variantes tumorales C4-HD y C4-HI (n=7). Para el caso de los tumores HD, se obtuvieron muestras de los tumores creciendo con MPA (+MPA, depósito sc de 20 mg, n=5), y cuando el progestágeno fue eliminado 48 hs previo al sacrificio del animal (-MPA, n=4).

Procesamiento de los tejidos y *Laser Capture Microdissection (LCM)*

Una vez extirpados, los tumores se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta ser procesados como se describe posteriormente.

Los tejidos utilizados para *LCM*, fueron embebidos en *Tissue Tek (OCT)*, congelados rápidamente y mantenidos a -70°C. Cortes en crióstato de cada tumor (C4-HD n=3, C4-HI n=3), de aproximadamente 8 µm fueron fijados en etanol 70% durante 25 segundos. Luego de lavar los cortes con agua *RNase-free*, se tiñeron con H&E. Finalmente, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (70-100%) por 5 segundos cada uno, xileno (*SAFECLEAR II*), y se dejaron secar al aire. Luego de la tinción, los cortes se visualizaron bajo un microscopio, pudiéndose localizar las células de interés: epitelio y estroma tumoral. Sobre el área de interés de cada corte, se ubicó un *CapSure LCM Cap* (Arcturus. Mountain View, CA, USA), y poblaciones enriquecidas en células epiteliales o estromales fueron obtenidas de cortes consecutivos de cada tumor, empleando el sistema de *LCM Arturus PixCell IIe* (Arcturus, Mountain View, CA, USA) de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Aproximadamente 4000 pulsos del *laser* fueron utilizados para purificar las diferentes poblaciones celulares de cada muestra tumoral, y múltiples *LCM-caps* conteniendo las células aisladas de cada muestra, fueron mantenidos en hielo seco e inmediatamente procesadas para extracción de *RNA* total.

Extracción de *RNA* total y amplificación lineal

Para la realización de los *microarrays*, es necesario partir de *RNA* total de cada muestra experimental, y en el ensayo propiamente dicho, cada muestra se co-hibrida en el *microarray*, con *RNA* proveniente de una muestra de referencia. Como cada muestra experimental se co-hibrida con la misma muestra de referencia, esto permite luego comparar los perfiles de expresión génica de las muestras experimentales entre si. En la Figura 2.2, se esquematiza brevemente el procedimiento llevado a cabo.

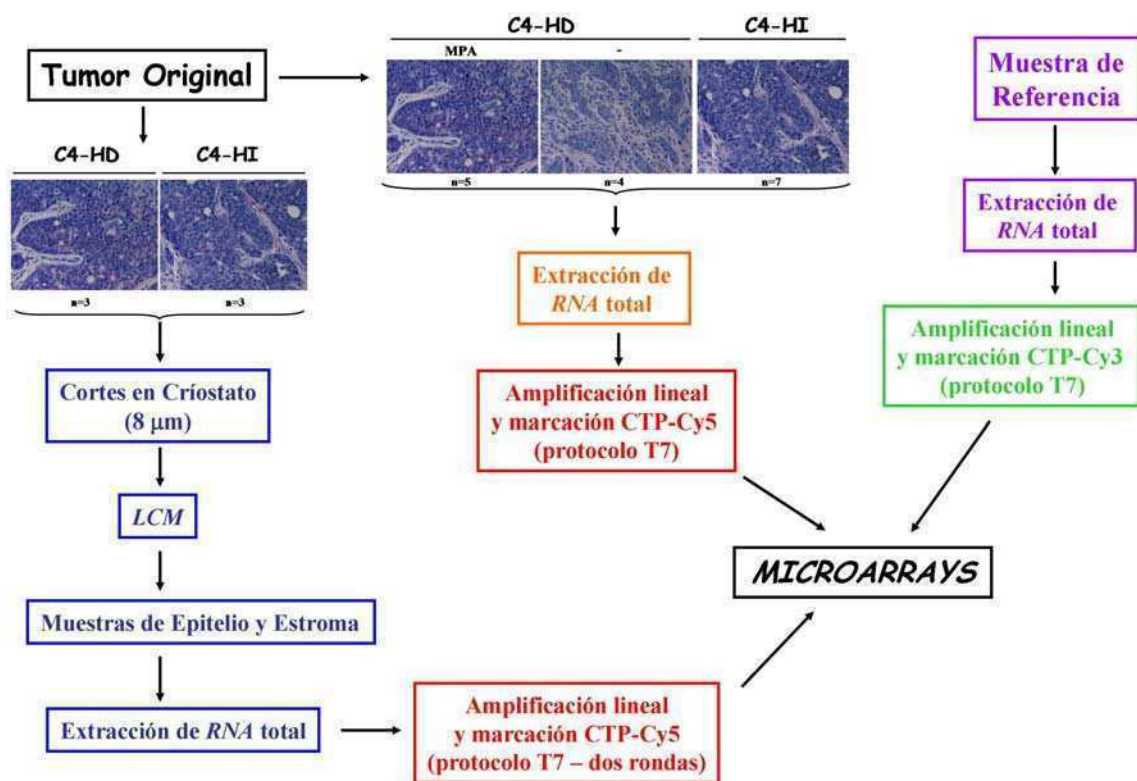


Figura 2.2. Esquema del procedimiento general llevado a cabo en los ensayos de *microarrays*.

Se purificó *RNA* total de cada muestra tumoral y de la muestra de referencia, que en nuestro caso fue *RNA* de igual número de embriones machos y hembras de 1 día - C57Bl6/J y 129 (Herschkowitz et al., 2007), utilizando el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen Inc., CA, USA) de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Este *RNA* total (2.5 μg), fue

convertido a *cDNA*, amplificado y marcado con un nucleótido conjugado a cianina-5 (CTP-Cy5, PerkinElmer) para las muestras tumorales, o cianina-3 (CTP-Cy3, PerkinElmer) para la muestra de referencia usando el *Low RNA Input Amplification kit* (Agilent) basado en la utilización de un oligo-dT *primer* llevando el promotor para la *RNA* polimerasa T7 (Davanloo et al., 1984), y una transcriptasa reversa (Van Gelder et al., 1990). El *RNA* amplificado (*aRNA*) y marcado con cada fluoróforo, fue purificado utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen Inc., CA, USA).

Para las muestras de tejido obtenidas por *LCM*, varias *LCM-caps* correspondiente al mismo tipo de compartimento tumoral (epitelial o estromal) y proveniente del mismo tumor, fueron agrupadas en un único tubo de reacción conteniendo 200 μ l de buffer desnaturalizante GITC (5.25 M de isotiocianato de guanidina, 50 mM Tris-HCl pH 6.4, 20 mM EDTA, 1% Triton X-100) y 1.6 μ l de β -mercaptoetanol, durante 2 minutos. La extracción de *RNA* total se realizó según el método de extracción con Isotiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (*Stratagene RNA microisolation kit*, Stratagene, La Jolla, CA; Chomczynski and Sacchi, 1987; Hansen and Braman, 1993; Ohyama et al., 2000).

El *RNA* total purificado, fue sometido a dos rondas de amplificación, por transcripción *in vitro*, mediado por la *RNA* polimerasa T7. En la primera ronda, se utilizó un protocolo basado en el método que utiliza un oligo-dT *primer* llevando el promotor para la *RNA* polimerasa T7, y una transcriptasa reversa (*MessageAmp II aRNA amplification Kit* Ambion; Van Gelder et al., 1990). Esta última, convierte el *RNA* en *cDNA*, y en presencia de la polimerasa T7, se realiza la transcripción *in vitro*. En la segunda ronda de amplificación, se tomaron 0.25 μ g del *aRNA* resultante de la primera ronda, y incorporó el nucleótido CTP conjugado a cianina-5 (CTP-Cy5) a la reacción de transcripción *in vitro* (*Low RNA Input Amplification kit*. Agilent). El *RNA* amplificado y marcado, fue purificado utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen Inc., CA, USA).

Hibridizaciones sobre los *microarrays* de ADN y análisis de datos

Dos microgramos de *aRNA-Cy5* de cada muestra experimental amplificada, fue co-hibridada con 2 μ g de *aRNA-Cy3* correspondiente a la muestra de referencia sobre los *microarrays* (*Agilent Mouse Oligo Microarrays - G4121A - ~20000 genes*). Luego de una incubación a 60°C por 16 hs en agitación, los *microarrays* fueron lavados con las

siguientes soluciones: 2XSSC/0.005% Triton X-102, y luego con 0.1XSSC, escaneados en un escáner GenePix 4000B (Molecular Devices. MDS, Inc.), y las imágenes analizadas para cada canal (verde o rojo) utilizando el programa GenePix 4.1 (Molecular Devices. MDS, Inc.). Áreas de los *microarrays* con defectos evidentes, fueron manualmente excluidas de posteriores análisis. Todos los datos crudos de las intensidades de fluorescencia para cada canal en cada hibridización, fueron subidas a la base de datos para *microarrays* de la Universidad de Carolina del Norte (UNC - UMD, <https://genome.unc.edu/>), donde se elimina el *background* y se normaliza la intensidad de fluorescencia para ajustar ambos canales (*Lowess normalization*; Butte, 2002; Herschkowitz et al., 2007; Quackenbush, 2002). Se seleccionaron aquellos genes que tuvieran una intensidad de fluorescencia normalizada de 30 unidades en ambos canales, y se calculó el $\text{Log}_2 \text{Cy5/Cy3}$ para cada gen. Solo aquellos genes que presentaron valores de fluorescencia en el 70% o más de las muestras analizadas, fueron incluidos en análisis posteriores, y se centraron por medianas (Butte, 2002). Para encontrar genes con diferencias significativas en su expresión entre las muestras experimentales, utilizamos el programa *Significance Analysis of Microarrays* (SAM; Tusher et al., 2001), con un *false discovery rate* (porcentaje de genes identificados por azar), $FDR < 5\%$ (Troester et al., 2004), disponible en <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>. Las muestras experimentales fueron agrupadas entre sí de acuerdo a la similitud en los perfiles de expresión génica (*Hierarchical Clustering Analysis*) empleando el programa *Cluster v2.12* (Eisen et al., 1998), disponible en <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. Para esto, utilizamos la lista de genes con diferencias significativas en su expresión obtenidas por SAM, y los resultados se visualizaron con el programa *JavaTreeView v1.0.8* (Eisen and Brown, 1999), disponible en <http://jtreeview.sourceforge.net/>.

Con el fin de identificar términos ontológicos enriquecidos asociados a un patrón génico diferencial, utilizamos el programa *Expression Analysis Systematic Explorer* (EASE; Hosack et al., 2003), disponible en <http://www.geneontology.org/GO.tools.microarray.shtml>. EASE, asigna genes de interés dentro de categorías funcionales en la base de datos de términos ontológicos (*Gene Ontology*), donde se agrupan los genes en grupos funcionales. Utiliza el *test* estadístico de *Fisher* para determinar la probabilidad de observar un número determinado de genes dentro de una lista de interés, *versus* el número de genes en cada categoría en el *microarray* (Joshi et al., 2006; Bhati et al., 2008).

PARTE III

RESULTADOS

CAPITULO I

I. Fosforilación y activación del receptor de estrógenos *alfa*.

A. Nivel de expresión y fosforilación del RE α en tumores C4-HD y C4-HI *in vivo*.

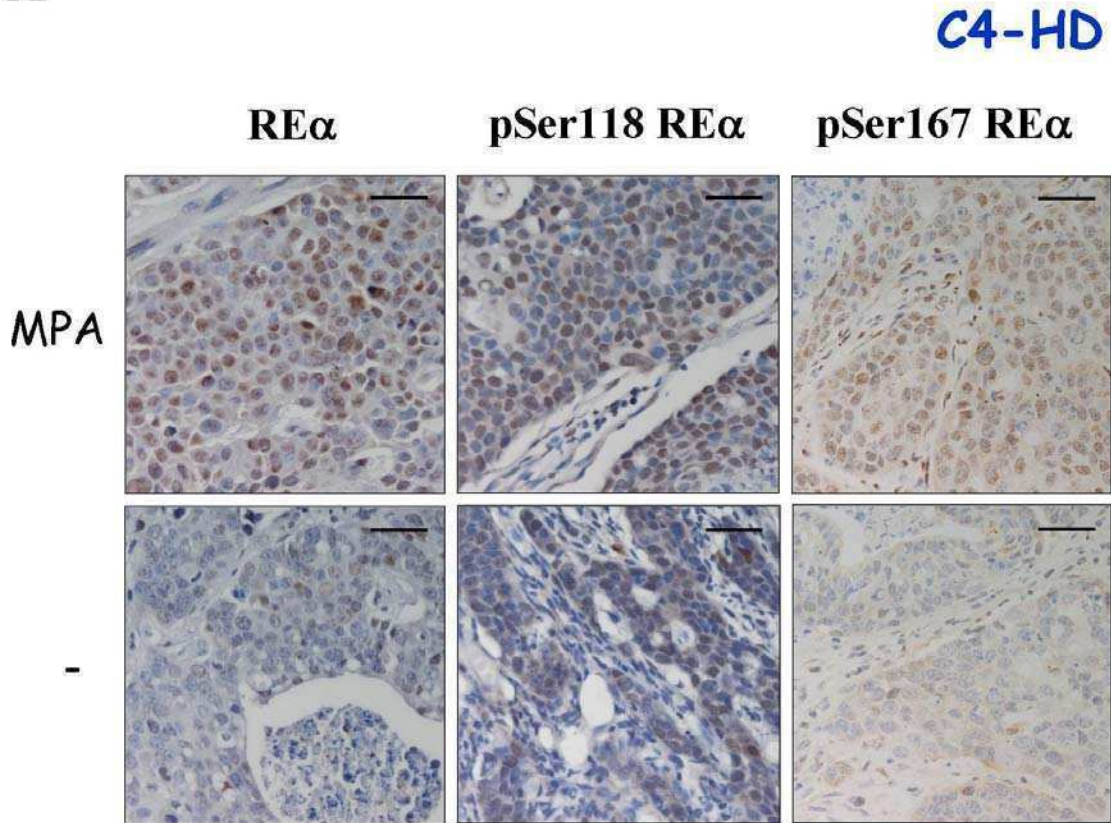
El RE α posee múltiples sitios de fosforilación en su secuencia primaria (Lannigan, 2003). Un RE α capaz de sufrir este tipo de modificación post traduccional, está asociado a un receptor activo y funcional. Para conocer el estado de fosforilación basal del RE α en tumores hormono-dependientes e independientes creciendo *in vivo*, se realizaron cortes en parafina e IHQ de los tumores C4-HD y C4-HI con anticuerpos específicos para el receptor total y sus sitios fosforilados. Para estudiar la expresión del RE α , se utilizó un anticuerpo policlonal (MC-20, Santa Cruz Biotech) que reconoce el dominio C-terminal del receptor de origen murino. Como puede observarse en las Figuras 3.1.A y 3.2.A, ambas variantes tumorales expresan altos niveles del RE α , esta marcación es nuclear y específica del epitelio tumoral, dado que no se observa marcación en las células estromales. Por otro lado, quisimos analizar si la expresión del RE α se ve influenciada por la presencia o no de MPA. Para esto, obtuvimos tumores C4-HD creciendo con MPA, o cuando el progestágeno fue eliminado 48 hs previo al sacrificio. Elegimos 48 hs porque sabemos que a ese tiempo ya no se observan efectos mediados por MPA, sino más bien, comienzan a mostrarse signos de regresión tumoral y aumento de células apoptóticas (Simian et al., 2006). De esta manera, observamos que en presencia de MPA, hay un incremento significativo en los niveles de expresión del RE α (Figura 3.1.A y B). Mientras que en el tumor C4-HI, no se observaron diferencias significativas cuando este tumor está creciendo en presencia de MPA (48 hs) o en ausencia del progestágeno (Figura 3.2.A y B).

Para estudiar los niveles de fosforilación del RE α se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen la fosfo-serina 118 RE α (pSer118 RE α) y la fosfo-serina 167 RE α (pSer167 RE α). Si bien estos anticuerpos están dirigidos al receptor humano, cruzan con el de ratón (Vilgelm et al., 2006; Miyagawa et al., 2004). En ambos tumores, C4-HD creciendo con MPA y en el C4-HI, se observó inmunomarcación nuclear en células

III. Resultados

epiteliales para el RE α fosforilado en las serinas 167 y 118 (Figuras 3.1.A y 3.2.A). Cuando analizamos el rol de MPA en la fosforilación del RE α *in vivo*, demostramos que el progestágeno induce fosforilación del receptor en tumores C4-HD, en los residuos serina analizados (Figura 3.1.A y B). Mientras que en el tumor C4-HI, el RE α estaría constitutivamente fosforilado (Figura 3.2.A y B).

A



B

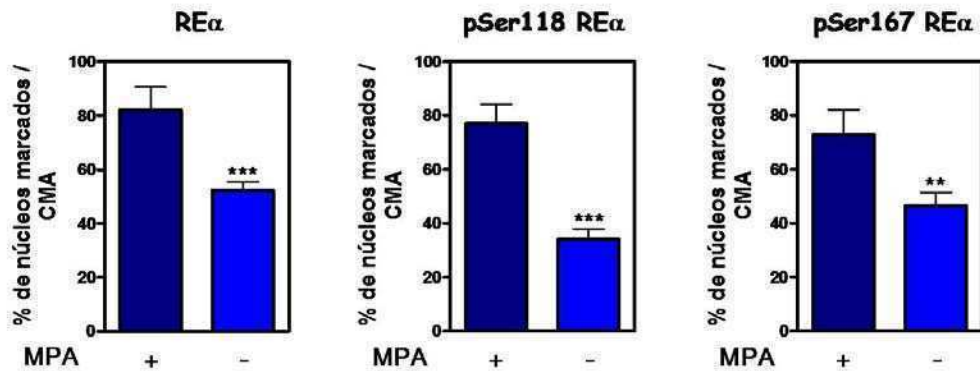
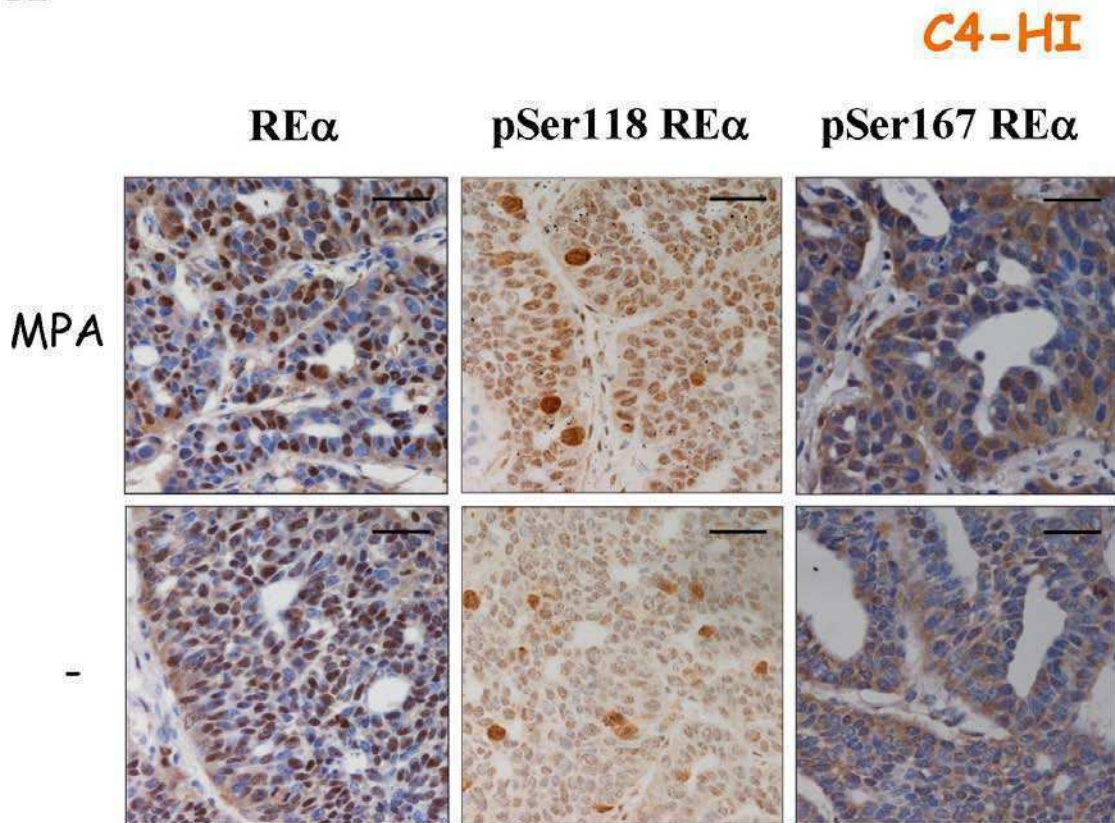


Figura 3.1. Nivel de fosforilación del RE α en tumores C4-HD *in vivo*. A) IHQ de cortes en parafina de tumores C4-HD creciendo con MPA (depósito sc de 20 mg), o cuando la hormona fue retirada 48 hs previo al sacrificio de los animales. Se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen la pSer118 RE α , pSer167 RE α , y el RE α total. Barra: 50 μ m. B) Cuantificación de células epiteliales con tinción nuclear positiva para el RE α y los residuos serina analizados en tumores C4-HD, en presencia o no del MPA. Se analizaron 10 campos a 1000X/vidrio en un microscópio de campo claro. En el gráfico se indica la media \pm DS. Análisis estadístico, “t” test de Student, *** p<0.001, ** p<0.01. CMA: campo de mayor aumento.

A



B

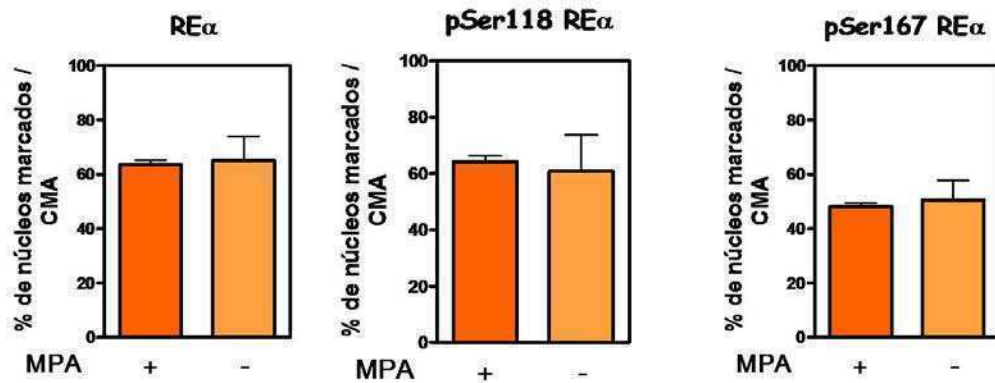


Figura 3.2. Nivel de fosforilación del RE α en tumores C4-HI *in vivo*. A) IHQ de cortes en parafina de tumores C4-HI creciendo en presencia (48 hs de tratamiento) o no del MPA (depósito de 20 mg). Se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen la pSer118 RE α , pSer167 RE α , y el RE α total. Barra: 50 μ m. B) Cuantificación de células epiteliales con tinción nuclear positiva para el RE α y los residuos serina analizados en tumores C4-HI, en presencia o no del MPA. Se analizaron 10 campos a 1000X/vidrio en un microscópio de campo claro. CMA: campo de mayor aumento.

B. Nivel de fosforilación basal del RE α en cultivo primario de células epiteliales tumorales.

Para evaluar el estado de fosforilación del RE α en células epiteliales *in vitro*, se realizaron cultivos primarios de células epiteliales (Epi) tumorales obtenidas por sedimentación diferencial a partir de tumores C4-HD y C4-HI. Como se demostró en la Figura 1.10.B, ambos cultivos primarios responden de manera similar a estímulos proliferativos como inhibitorios. Es decir, que tanto las Epi C4-HD como las Epi C4-HI, necesitan del progestágeno para proliferar en cultivo. Por lo tanto, para conocer el nivel de fosforilación basal del RE α se realizaron experimentos en condiciones de quiescencia. Cuando los cultivos alcanzaron un 50-60% de confluencia, se los mantuvo por 24 hs en 1% SFBch. Las células fueron fijadas y procesadas para IF con anticuerpos específicos para pSer167 RE α , pSer118 RE α , y para las fosfo-serinas 104 y 106 del RE α (pSer104/106 RE α). Como se observa en la Figura 3.3, las células Epi C4-HI mostraron niveles mayores de fosforilación del RE α , que las Epi C4-HD, en las mismas condiciones de cultivo.

Por lo tanto, las Epi C4-HI presentarían un RE α constitutivamente fosforilado. Este estado de fosforilación basal del receptor no sería suficiente para estimular la proliferación celular *in vitro*. Aún necesitan del MPA u otro estímulo proliferativo.

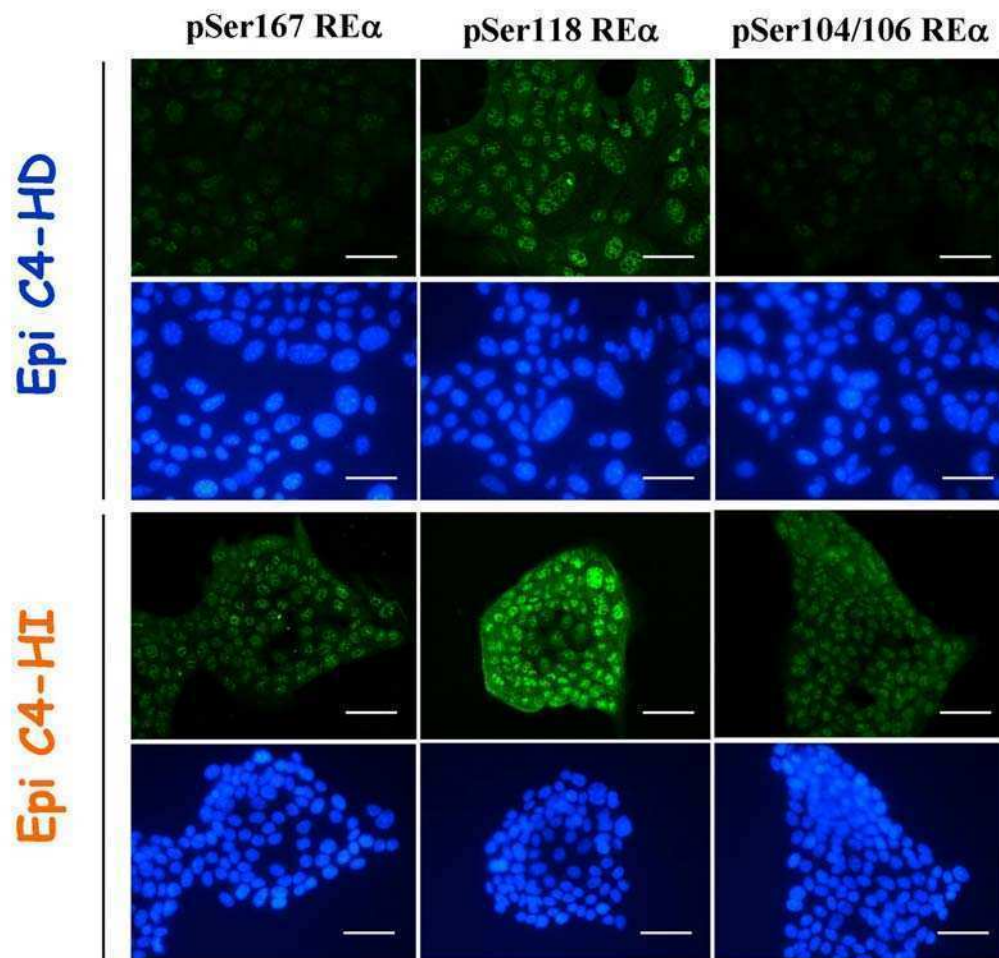


Figura 3.3. Niveles basales de fosforilación del RE α *in vitro*. Cultivos primarios de células epiteliales (Epi) C4-HD y C4-HI fueron crecidas hasta un 50-60% de confluencia y luego mantenidas por 24 hs en 1% SFBch (condición de no proliferación celular). Los cultivos se fijaron y se procesaron para IF y microscopia confocal con anticuerpos primarios específicos para pSer118 RE α , pSer167 RE α , y pSer104/106 RE α (se observan en verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra: 30 μ m.

C. Participación de las vías PI3K/Akt y MEK1/MAPK en la fosforilación del RE α .

Para estudiar con mayor detalle los mecanismos que regulan la fosforilación del RE α , elegimos dos vías paradigmáticas de señalización intracelular como son las de Akt y MAPK. Recientemente, se ha demostrado la íntima relación entre la fosforilación del RE α y la activación de estas dos vías de señalización (Murphy et al., 2009).

Por otro lado, sabemos que la vía de PI3K/Akt está más activa en tumores C4-HI que en tumores C4-HD (Figura 3.4, proyecto de la Dra. Virginia Novaro (Arnoni et al., 2007)). Vimos en un *tissue array*, compuesto de diferentes familias de tumores desarrollados en nuestro laboratorio, por IHQ hay una mayor expresión de pSer473 Akt en tumores C4-HI respecto a tumores C4-HD (Figura 3.4.A). Y el mismo resultado fue corroborado por WB (Figura 3.4.B). Por lo tanto, quisimos evaluar el rol de esta vía de señalización en la fosforilación basal del RE α . Para esto, realizamos cultivos primarios de células epiteliales C4-HI, las cuales fueron incubadas durante 24 hs en 1% SFBch luego de que alcanzaran un 80% de confluencia. Cabe recordar que en estas condiciones de cultivo las células están arrestadas y no proliferan. A posteriori, incubamos las células con inhibidores específicos de las vías de PI3K/Akt y MEK1/MAPK, como son el LY294002 (LY, 10 μ M) y el PD98059 (PD, 10 μ M) respectivamente, durante 24 hs. Los cultivos fueron fijados y analizados para la expresión de pSer167 RE α y RE α total por IF y microscopia confocal. En la Figura 3.5 puede apreciarse que en presencia del inhibidor de la vía PI3K/Akt hay una disminución en los niveles de fosforilación del RE α en el residuo serina 167. Mientras que, por este tratamiento, no se ven alterados los niveles de expresión del receptor. Concluyendo de esta forma que la vía de PI3K/Akt sería responsable de la fosforilación y activación del RE α en células epiteliales C4-HI.

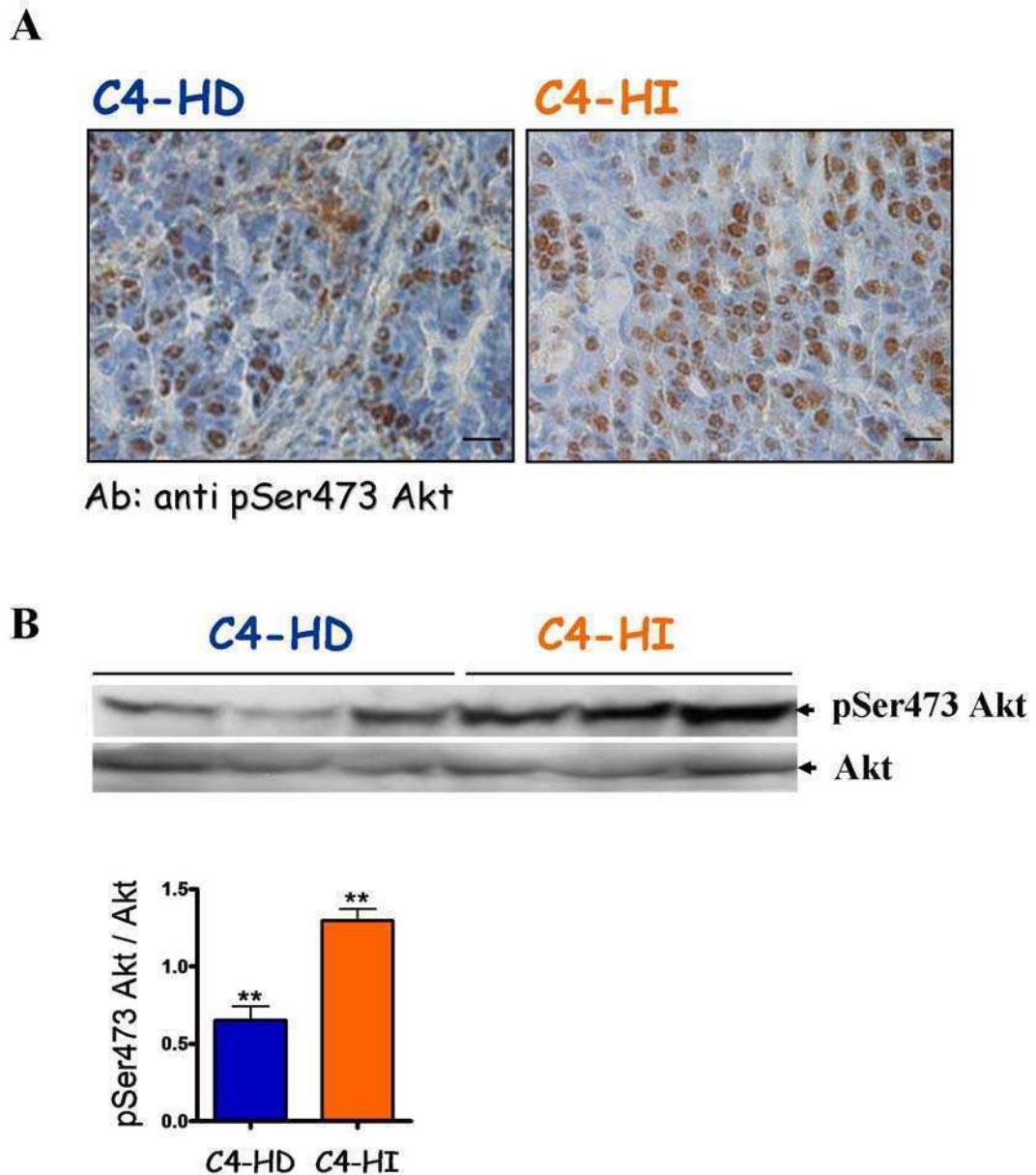


Figura 3.4. Activación de la vía de PI3K/Akt en tumores C4-HD y C4-HI. A) IHQ de cortes en parafina de tumores C4-HD creciendo con MPA (deposito de 20 mg), y C4-HI. Se utilizó un anticuerpo específico que reconoce la pSer473 Akt. Barra: 30 μ m. B) WB a partir de extractos totales de tumores C4-HD creciendo con MPA (n=3) y C4-HI (n=3). Se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen la pSer473 Akt y Akt total (60 kDa). Las bandas se cuantificaron utilizando el programa *ImageJ*, y se graficó la expresión de pSer473 Akt/Akt. Análisis estadístico, “t” test de *Student*, **p<0.01.

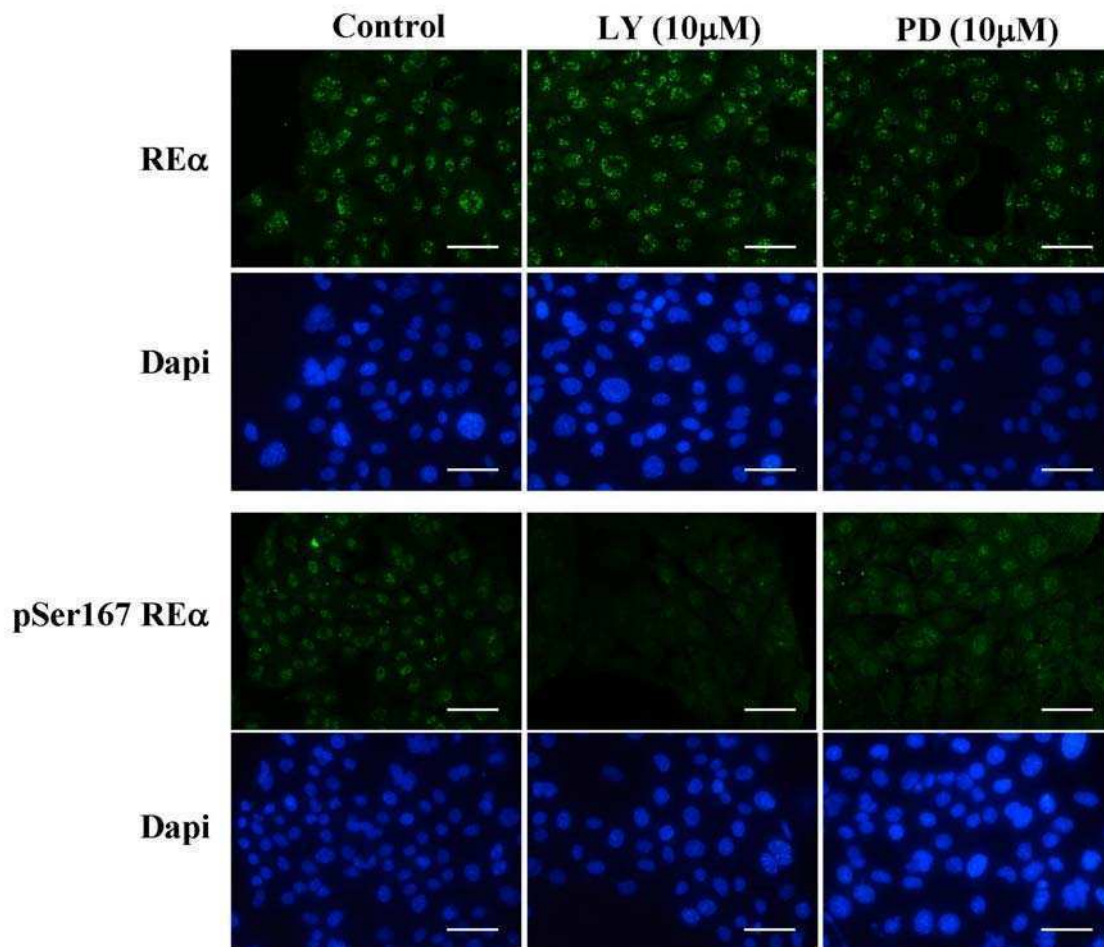


Figura 3.5. Participación de la vía PI3K/Akt en la fosforilación del RE α *in vitro*. Cultivos primarios de células epiteliales C4-HI fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 24 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron tratados con LY294002 (LY, Sigma) 10 μ M, inhibidor de la vía PI3K/Akt, o PD98059 (PD, Sigma) 10 μ M, inhibidor de la vía MEK1/MAPK por 24hs. Se fijaron y procesaron para IF y microscopía confocal con anticuerpos primarios específicos para el RE α y la pSer167 RE α . Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra: 30 μ m.

D. Fosforilación del RE α inducida por MPA.

Utilizando cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI, estudiamos la posible regulación por fosforilación del RE α inducida por MPA, mediante técnicas de WB e IF.

Las células fueron ayunadas por 24 hs en 1% SFBch y tratadas durante 10 y 30 minutos con MPA (10 nM) o E2 (1 nM). El E2 fue nuestro control positivo, dado que está ampliamente descrita la fosforilación y activación del RE α por su ligando natural. Por otro lado, utilizamos estas concentraciones dado que están cercanas al Kd, tanto para el RP como para el RE α , y sabemos que los cultivos primarios responden a ellas (Lamb et al., 2003; Montecchia et al., 1999). Luego de los tratamientos, se realizaron extractos nucleares los cuales fueron analizados por WB. En la Figura 3.6 se muestra el incremento en la fosforilación del RE α inducida por MPA y E2, en células Epi C4-HD. Con ambos tratamientos hormonales se observó un incremento en los niveles de fosforilación del RE α en los residuos Serina 118 y 167, mientras que los niveles del receptor total permanecieron constantes en los tiempos de tratamiento utilizados. Por otro lado, en células Epi C4-HI, confirmamos los resultados obtenidos por IF (Figuras 3.3 y 3.5), que mostraban altos niveles basales de fosforilación del RE α . La participación del MPA en este proceso no es clara, mientras que E2 parece reducir los niveles de fosforilación del receptor en estas células (Figura 3.6), lo cual resulta muy extraño tratándose de su ligando natural.

Habiendo demostrado que el MPA es capaz de regular la fosforilación del RE α *in vivo* e *in vitro*, quisimos averiguar qué vías de señalización estaban involucradas en este proceso. Sabemos que el tratamiento con MPA a tiempos cortos induce activación de las vías de PI3K/Akt (Carnevale et al., 2007), y MEK1/MAPK (Labriola et al., 2003; Carnevale et al., 2007) en células epiteliales C4-HD. Por ello, empleamos inhibidores específicos de ambas vías y estudiamos la fosforilación del RE α mediada por MPA. Realizamos cultivos primarios de células epiteliales C4-HD, y luego de ayunarlas por 24 hs en 1% SFBch, los cultivos fueron incubados con 10 μ M LY294002 (LY), inhibidor de la vía de PI3K/Akt, o 10 μ M PD98059 (PD), inhibidor de la vía MEK1/MAPK por 24 hs en 1% SFBch. Inmediatamente, las células fueron tratadas con 10 nM de MPA en presencia o ausencia de cada uno de los inhibidores por 10 minutos. Un tiempo adecuado al cual MPA es capaz de inducir la fosforilación del RE α (Figura 3.6). Luego de los tratamientos, los cultivos fueron fijados y procesados para IF y microscopía confocal con

anticuerpos específicos para pSer118 RE α y pSer167 RE α . En la Figura 3.7 se observa un incremento en la fosforilación del RE α , en los dos residuos serina estudiados, mediado por MPA. De esta forma además, corroboramos el resultado del WB de la Figura 3.6. Por otro lado, demostramos que las dos vías de señalización estudiadas (PI3K/Akt y MEK1/MAPK), están involucradas en la fosforilación del RE α mediado por MPA, dado que la inhibición específica de ambas vías suprime la fosforilación del receptor por el progestágeno.

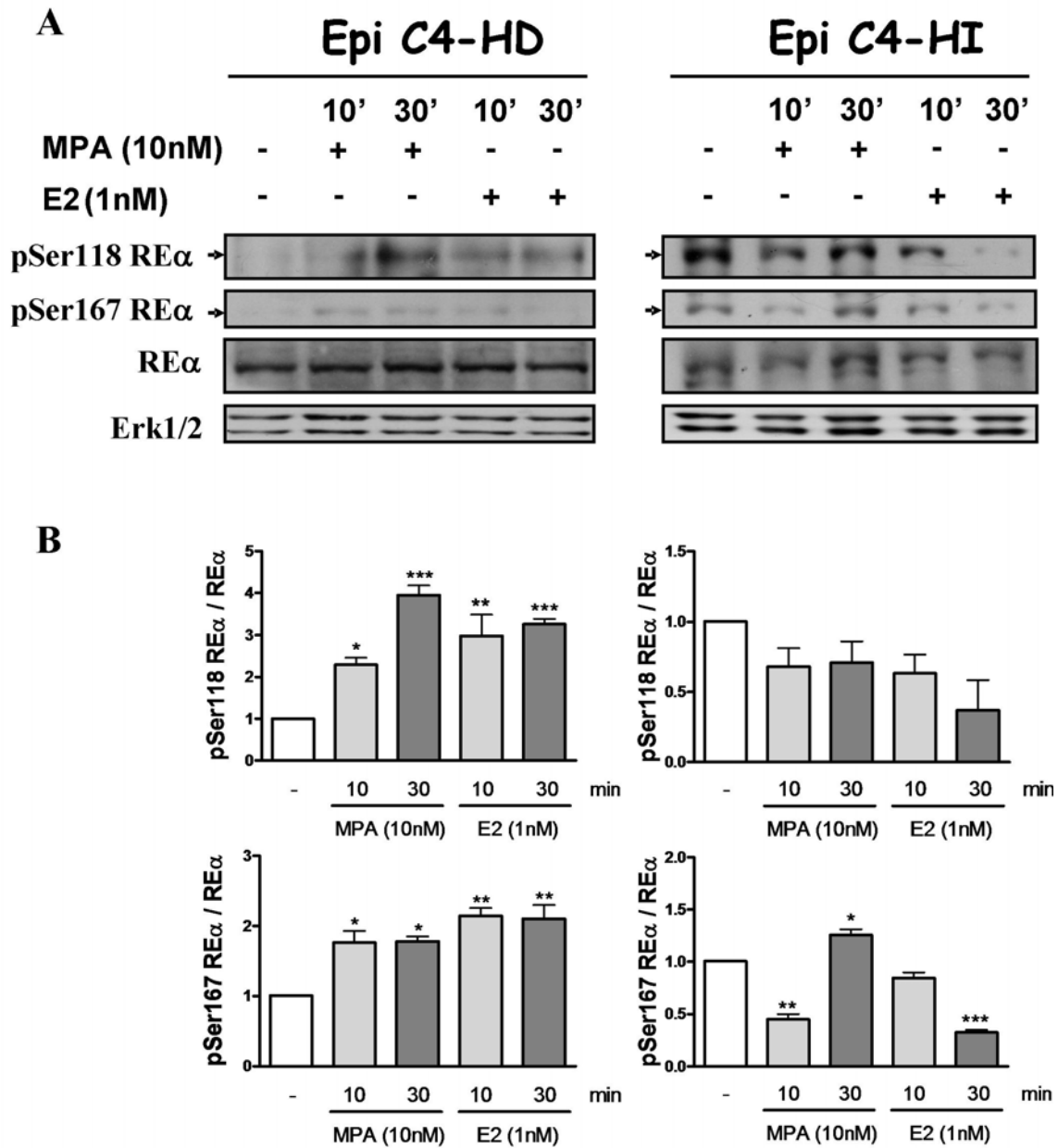


Figura 3.6. Fosforilación del REα inducida por MPA. A) Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 24 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron tratados durante 10 y 30 minutos con MPA (10 nM) o E2 (1 nM). Se obtuvieron extractos nucleares proteicos, como se describe en Materiales y Métodos, y se estudió por WB el estado de fosforilación del REα utilizando anticuerpos específicos para pSer118 REα y pSer167 REα. También se analizó la presencia del REα total. Se utilizó Erk1/2 como control de carga. B) Cuantificación de los gels donde evaluamos la fosforilación del REα. Se analizó el cociente de la expresión entre pREα/REα total. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey, para todos los tratamientos *versus* el Control. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

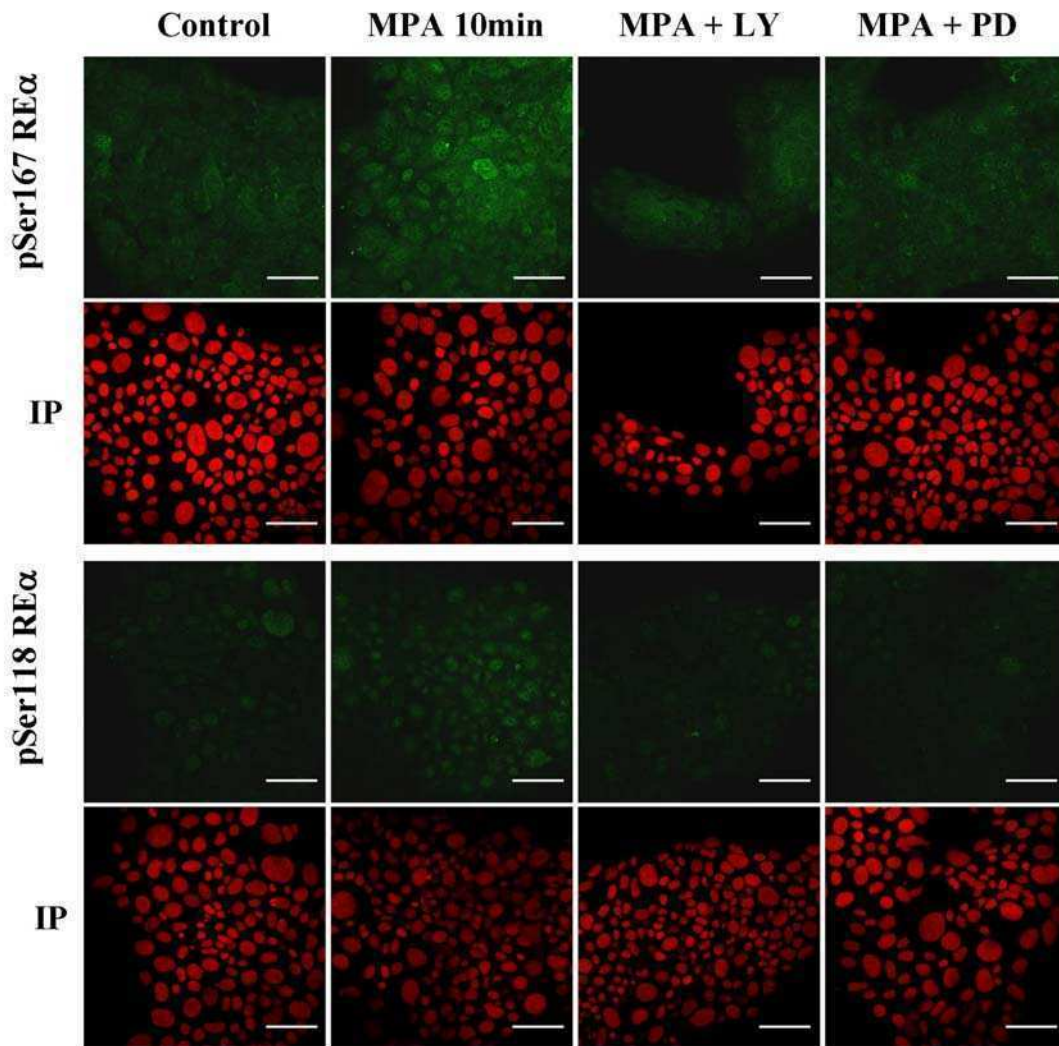


Figura 3.7. Participación de las vías PI3K/Akt y MEK1/MAPK en la fosforilación del RE α inducida por MPA. Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 24 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron pretratados con 10 μ M LY294002 (LY), inhibidor de la vía de PI3K/AKT, o 10 μ M PD98059 (PD), inhibidor de la vía MEK1/MAPK por 24 hs, y luego con MPA (10 nM) por 10 minutos en presencia o no de los inhibidores. Las células fueron fijadas y procesadas para IF y microscopia confocal con anticuerpos primarios específicos para pSer167 RE α y pSer118 RE α (se observan en verde). Los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio (IP, rojo). Barra: 30 μ m.

E. Unión del RE α a su elemento respondedor en el ADN.

Como factor de transcripción inducible por ligando, el RE α es capaz de unirse a sitios específicos (ERE, *estrogen responsive element*) en secuencias promotoras de genes regulados por E2. Este mecanismo de activación transcripcional inducido por ligando, correlaciona con un incremento en la fosforilación del receptor. Por otro lado, el RE α puede sufrir fosforilación y la consecuente activación de forma ligando independiente, pudiendo asociarse directamente a secuencias EREs, o indirectamente a sitios consenso para otros factores de transcripción. De manera tal que podemos tener un RE α activado, induciendo la transcripción de genes determinados, sin haber E2 en el medio.

Ya vimos cómo el MPA es capaz de regular la fosforilación del RE α en células epiteliales C4-HD. En este caso quisimos averiguar si el MPA era además funcional y capaz de regular la unión del RE α a su secuencia consenso en el ADN (ERE). Para esto, realizamos ensayos de *mobility gel shift* (EMSA) a partir de extractos nucleares de cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI, incubados previamente con 10 nM de MPA o 1 nM de E2 por 10 y 30 minutos. Como se observa en la Figura 3.8, el tratamiento con MPA por 10 y 30 minutos y con E2 por 30 minutos, incrementan la unión del RE α al ERE en células Epi C4-HD. Sin embargo, en células Epi C4-HI, el RE α ya se encontraría activado, previamente a los tratamientos, dado que se observan altos niveles de unión al ERE en la situación control. Por otro lado, como controles de la técnica y para corroborar la especificidad de las bandas, empleamos un exceso de ERE frío, el cual desplaza la unión del RE α al ERE-³²P. En este caso no se observan bandas. Además, utilizamos un oligonucleótido a cuya secuencia el RE α no puede unirse (PRE). En este caso, un exceso de PRE no desplaza la unión específica del RE α al ERE-³²P, y se observan bandas. Si hubiese desplazado, significaría que el RE α se estaría uniendo al PRE, directa o indirectamente, y la utilización de este oligo no sería adecuada como control de la técnica. Por último, agregamos al ensayo de EMSA el control con un anticuerpo anti-RE α . Si bien en este caso no se observa un *super shift*, producto de la formación del complejo anticuerpo-RE α -ERE-³²P, se visualiza una reducción en los niveles de pegado del RE α al ERE. Es probable que la incubación del extracto nuclear con el anticuerpo anti-RE α , impida por cuestiones estéricas (Tyulmenkov and Klinge, 2000), la correcta unión del RE α a su secuencia consenso.

De esta manera, concluimos que el MPA es capaz de inducir fosforilación y activación del RE α en células epiteliales C4-HD, mientras que el receptor se encontraría basalmente fosforilado y con la capacidad de unirse a secuencias específicas en el ADN, en células epiteliales C4-HI.

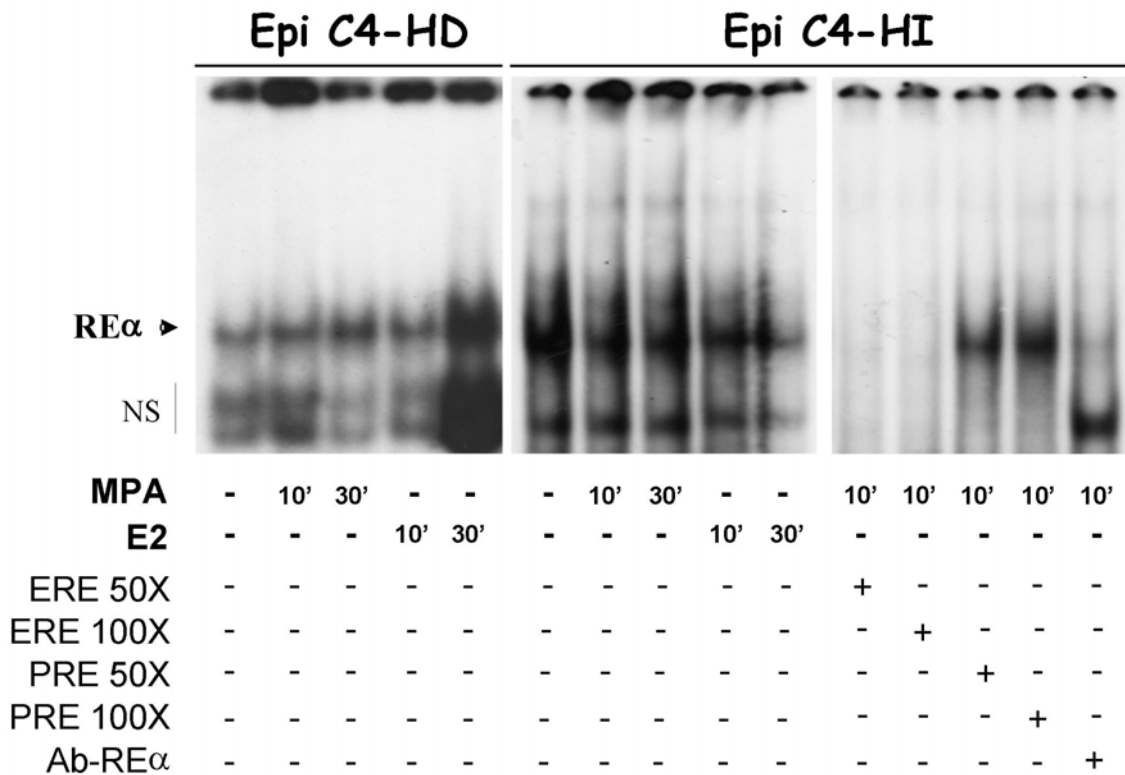


Figura 3.8. MPA induce la unión del RE α a su elemento respondedor en el ADN (ERE). Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 24 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron tratados durante 10 y 30 minutos con MPA (10 nM) o E2 (1 nM). Se realizaron extractos nucleares proteicos, como se describe en Materiales y Métodos, y se estudió por ensayos EMSA la capacidad del RE α de unirse al ERE. Como controles del ensayo, se utilizó un exceso de ERE frío (no radiactivo), un exceso de un oligonucleótido al cual el RE α no es capaz de unirse (PRE), y un anticuerpo anti-RE α (Ab-RE α). NS: bandas no específicas, dado que desaparecen con un exceso del ERE o PRE.

II. Participación del RE α en la proliferación celular inducida por MPA y en la expresión del RP.

En este modelo, tanto los estrógenos como también los antiprogéstágenos (RU 486, ZK 299, ZK 211) han demostrado ser inhibitorios del crecimiento tumoral en ambas variantes tumorales, C4-HD (Kordon et al., 1991) y C4-HI (Montecchia et al., 1999; Wargon et al., 2008). Curiosamente, el tamoxifeno también mostró efectos inhibitorios tanto *in vivo* como *in vitro* en el crecimiento del tumor C4-HD, mientras que el mismo efecto fue observado con el antiestrógeno puro Fulvestrant en experimentos *in vitro* con células epiteliales C4-HD (Lamb et al., 2003). Estos resultados sugieren que el RE α sería tan necesario como el RP para mantener el crecimiento tumoral en este modelo. Una hipótesis plausible es que el RE α estaría involucrado en la respuesta proliferativa mediada por MPA, o en el crecimiento autónomo ya que la expresión del RP sería totalmente dependiente de la presencia de RE α .

A. Rol del RE α en los niveles de expresión del RP.

Para investigar si la expresión del RP es totalmente dependiente de la presencia del RE α en este modelo, empleamos dos estrategias. Por un lado, evaluar el efecto del antiestrógeno puro ICI sobre la expresión del RP, y por otro lado, evitar la expresión del RE α induciendo la degradación de su *mRNA*. Dado que está ampliamente aceptado el rol del RE α en la regulación del RP en diferentes modelos, empleamos el antiestrógeno puro ICI, el cual tiene la capacidad de unirse al RE α , bloquear su actividad transcripcional e inducir su degradación vía la maquinaria de ubiquitinación y proteosoma (Robertson et al., 2001; Wijayaratne and McDonnell, 2001; Marsaud et al., 2003). Para la segunda estrategia, empleamos un *siRNA* específico contra el *mRNA* del RE α con el fin de evitar su expresión y evaluar cómo esto afecta al RP.

En ensayos de *binding* a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HD, demostramos que el E2 incrementa los niveles del RP (Lamb et al., 2003). Resultados similares se obtuvieron con células epiteliales C4-HI por WB (Soldati et al., 2009), indicando que la expresión del RP puede ser regulada por el RE α unido al E2 en este

modelo tumoral. Para evaluar el efecto del ICI sobre la expresión del RP, realizamos cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI, y luego de 24 hs de ayuno en 1% SFBch las células fueron incubadas por 6, 12 y 24 hs con 1 μ M de ICI. Utilizamos esa concentración de ICI dado que sabemos que es capaz de inhibir la proliferación MPA-dependiente de células epiteliales C4-HD *in vitro* (Lamb et al., 2003), y tiene un 10% menos de afinidad que el E2 por el RE α (Wakeling et al., 1991). Se realizaron extractos celulares totales y analizamos la expresión del RE α , la pSer190 RP y el RP total, por WB. Como se observa en la Figura 3.9, luego de 6 hs de tratamiento con ICI, hay una reducción significativa en los niveles de expresión del RE α en ambos cultivos celulares, Epi C4-HD ($p < 0.001$; Figura 3.9.A) y Epi C4-HI ($p < 0.001$; Figura 3.9.A), lo mismo fue observado luego de 60 minutos de incubación con el ICI y el E2, indicando que ambos compuestos reducen los niveles del RE α (no se muestra).

En cuanto al tratamiento con el ICI, detectamos expresión del RP en ambos cultivos primarios en los tiempos analizados, sin cambios significativos.

Para la segunda estrategia, utilizamos un *siRNA* contra el *mRNA* del RE α y evaluamos la expresión de este receptor como así también del RP. Los cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI se transfectaron de forma transiente con este *siRNA*, como se describe en Materiales y Métodos. Analizamos por WB a partir de extractos celulares totales, la expresión del RE α y del RP. En la Figura 3.9.B se muestran los geles respectivos. Como puede observarse, el *siRNA* reduce significativamente los niveles de expresión del RE α en ambos cultivos primarios (Epi HD ~40% $p < 0.001$; Epi HI ~60% $p < 0.001$). Y en cuanto al RP, si bien observamos una leve reducción en su expresión, del 10% en Epi HD y del 20% en Epi HI, esta disminución resultó significativa (Epi HD $p < 0.05$; Epi HI $p < 0.001$).

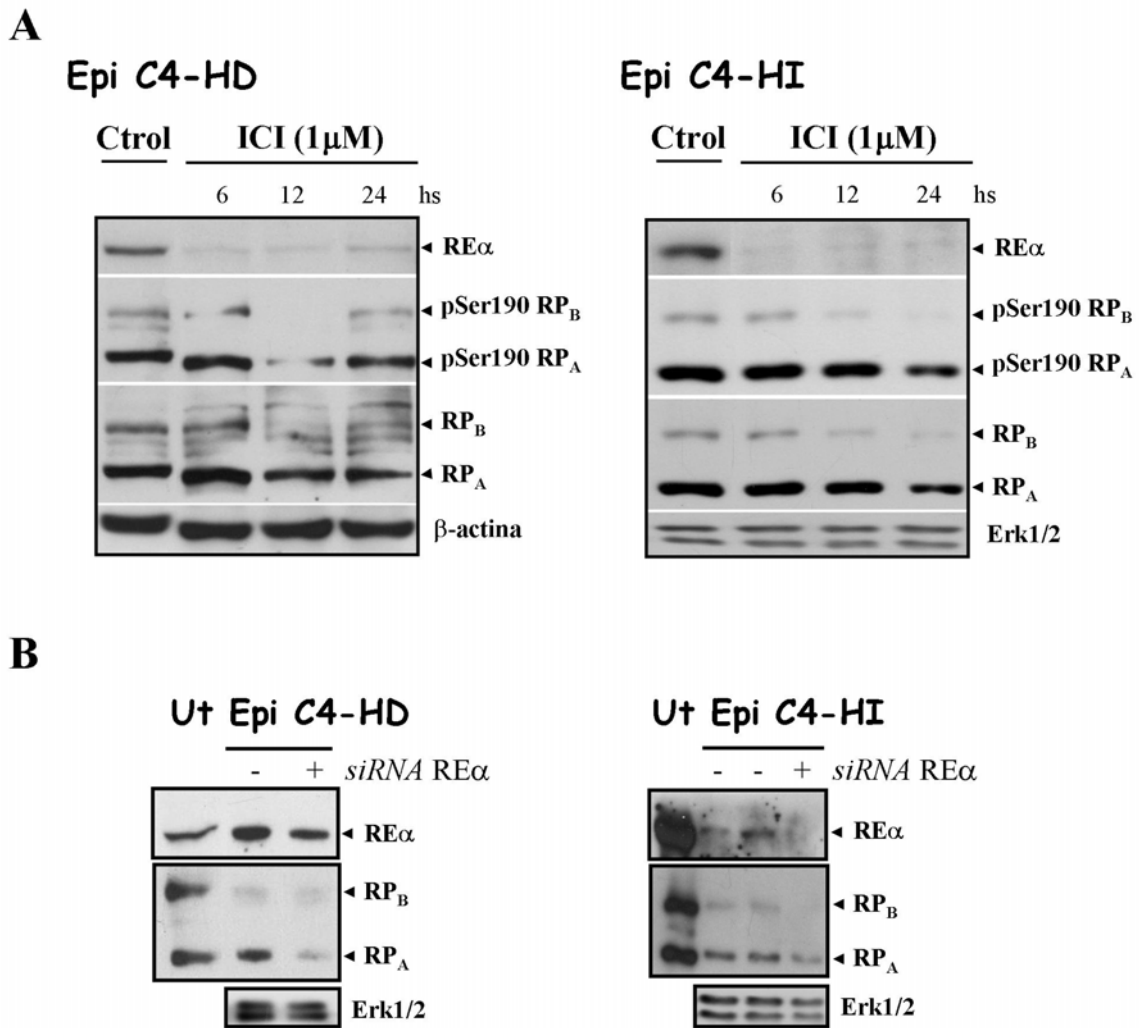


Figura 3.9. Nivel de expresión del RP y del RE α en células epiteliales C4-HD y C4-HI por tratamiento con ICI o el *siRNA*-RE α . A) Cultivos primarios de células epiteliales HD y HI fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 24 hs en 1% SFBch. Las células fueron incubadas ICI 182780 (ICI, 1 μ M), por 6, 12 y 24 hs respectivamente. Al finalizar el tratamiento, se realizaron extractos celulares totales y se evaluó la presencia del RP, de la pSer190 RP y del RE α por WB. β -actina y Erk1/2 fueron utilizadas como control de carga. B) Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI fueron transfectados de forma transiente con un *siRNA* para el RE α o con un vector de expresión para *GFP*, como se explica en Materiales y Métodos. Los cultivos fueron lisados, y se realizaron extractos protéicos totales los cuales fueron analizados por WB. Se evaluó la expresión de RE α y del RP. Se utilizó Erk1/2 como control de carga. Ut: extracto de útero (control positivo de receptores hormonales).

B. Rol del RE α en la proliferación celular mediada por MPA.

Previamente demostramos que el tratamiento con ICI, E2 o el *siRNA* para RE α , inducen una reducción en los niveles de expresión del RE α . Sin embargo, el RP está presente en los tiempos de incubación analizados. Es decir que estaría disponible para ejercer un efecto proliferativo mediado por MPA. Para investigar si los progestágenos pueden estimular la proliferación en estas condiciones experimentales, realizamos ensayos de proliferación por incorporación de timidina tritiada a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI, con el fin de evaluar el efecto de la reducción en la expresión del RE α sobre la proliferación celular inducida por MPA. Sabemos que el E2 y el RU 486 son inhibitorios del efecto proliferativo mediado por MPA en este modelo (Figura 1.10). Además, se demostró que el ICI es inhibitorio en cultivos primarios de células Epi C4-HD (Lamb et al., 2003). Por lo tanto, quisimos evaluar el efecto de este antiestrógeno puro sobre la proliferación celular comparando entre células epiteliales C4-HD y C4-HI. Como puede observarse en la Figura 3.10.A, el ICI, inhibió la proliferación celular inducida por MPA en ambos cultivos primarios, C4-HD y C4-HI, siendo este último, más resistente a la inhibición. Necesitamos una concentración de 0.5 μ M en los cultivos C4-HI, en comparación a la de 0.1 μ M del ICI en los cultivos C4-HD, para tener una inhibición significativa de la proliferación celular. Estos resultados sugieren que los RE son necesarios para la estimulación de la proliferación celular inducida por MPA o que la cantidad de RP no es suficiente para gatillar una respuesta proliferativa. Para descartar esta última posibilidad decidimos encarar experimentos a más corto plazo en los cuales ya sabemos por los estudios anteriores, que los RP no han disminuido.

En ensayos de incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) en cultivos primarios de células epiteliales C4-HD luego de 6 hs de co-tratamiento con MPA (10 nM) e ICI (1 μ M), se demostró una reducción en la proliferación comparada con la inducida por el progestágeno solo (Figura 3.10.B). Cabe destacar en este caso, que el BrdU fue agregado al inicio del tratamiento hormonal (6 hs), un tiempo en el cual los niveles del RP son similares al control (Figura 3.9.A). Demostramos así, que la inhibición en la proliferación celular mediada por MPA, no se debe a una ausencia de RP.

Los resultados de proliferación celular por incorporación de 3 H-timidina y BrdU, fueron corroborados por recuento de células, como se muestra en la Figura 3.10.C. En este caso, los cultivos primarios fueron sembrados en placas de 6 *wells*, y luego de 24 hs en 1%

SFBch fueron incubados con MPA (10 nM), RU 486 (10 nM), E2 (1 nM) e ICI (1 μ M) y las combinaciones que se muestran en la Figura 3.11.C, por 6 días. Los resultados muestran una concordancia con los ensayos de incorporación de ^3H -timidina, en cuanto que el MPA aumenta el número de células en ambos cultivos primarios, C4-HD y C4-HI, mientras que el ICI, al igual que el RU 486 y el E2, inhiben significativamente este aumento.

En la Figura 3.11, se muestran los ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada luego de transfectar los cultivos C4-HD y C4-HI con el *siRNA* para el RE α . En la Figura 3.9, habíamos mostrado una disminución del RE α con una disminución parcial del RP por efecto del *siRNA*. Como vemos, el bloqueo en la expresión del RE α , inhibe la proliferación celular inducida por MPA en ambos cultivos primarios C4-HD y C4-HI. La inhibición no es completa en concordancia con la disminución parcial de ambos receptores.

De los resultados presentados aquí, se desprende como conclusión, la necesidad de un RE α presente y no unido a ligando, en la respuesta proliferativa mediada por MPA.

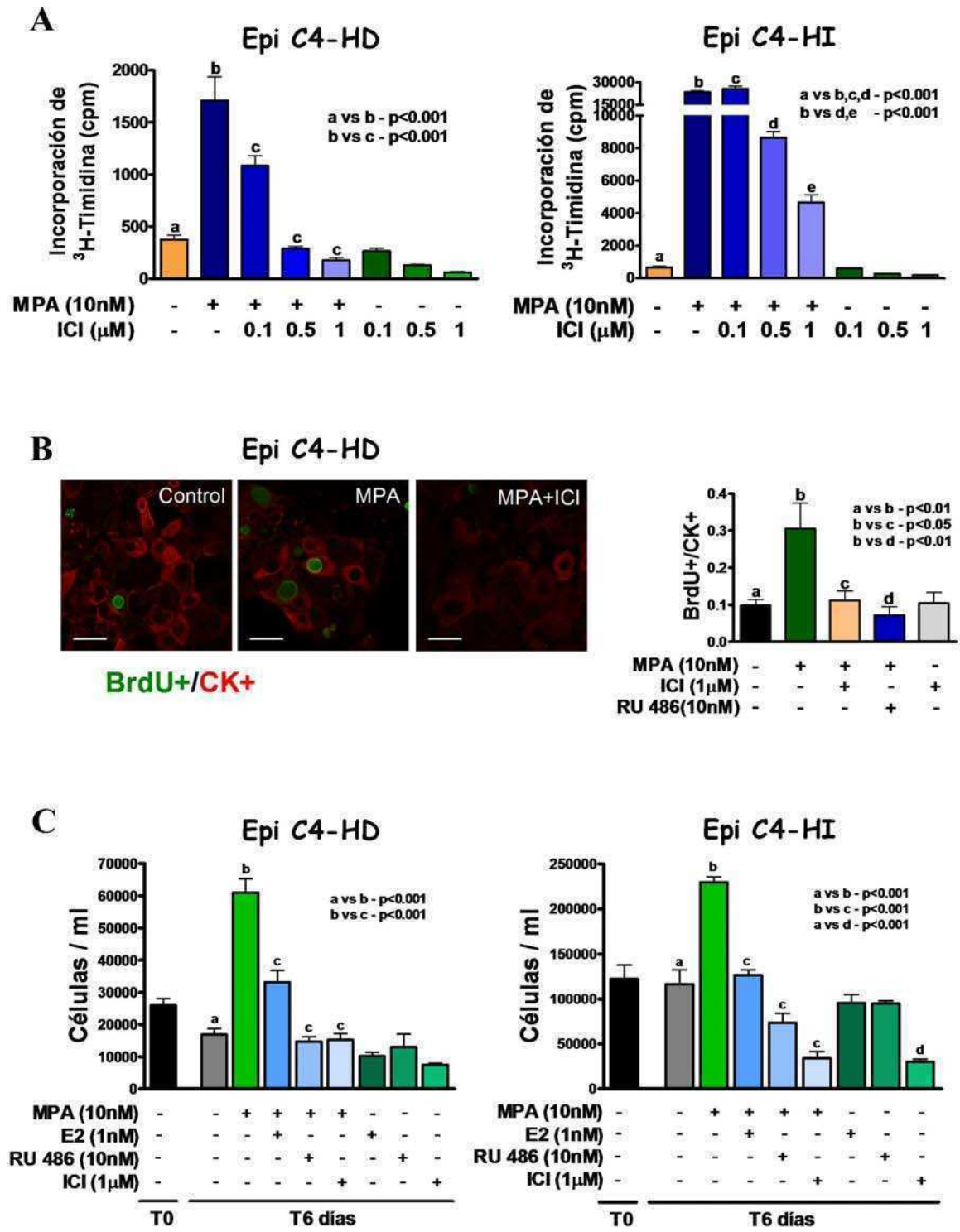


Figura 3.10. ICI 182780 (ICI) inhibe la proliferación celular inducida por MPA. *Continúa.*

Figura 3.10. *Continuación.* Se realizaron cultivos primarios de células epiteliales a partir de tumores C4-HD y C4-HI, los cuales fueron repicados una vez alcanzado el 80% de confluencia, y utilizados para: A) Ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada (^3H -timidina). Las células fueron sembradas en placas de 96 *wells*. Luego del pegado a las mismas, el medio fue reemplazado por 1% SFBch por 24 hs. Las células fueron tratadas por 48 hs con MPA (10 nM) o ICI (0.1, 0.5 y 1 μM), y se cuantificó la timidina incorporada como se detalla en Materiales y Métodos. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey. B) Izquierda, proliferación celular por incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). Células epiteliales C4-HD fueron sembradas en *chamber slides*, arrestadas por 24 hs en 1% SFBch e incubadas con MPA (10 nM), ICI (1 μM) o RU 486 (10 nM) y las combinaciones por 6 hs. El BrdU (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fue agregado al inicio del tratamiento hormonal. Las células fueron fijadas y analizadas por IF como se describe en Materiales y Métodos. Células positivas para BrdU (BrdU+) se muestran en verde. Células epiteliales citokeratina positivas (CK+), en rojo. Derecha, cuantificación de células BrdU+/CK+. Barra: 30 μm . Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey. C) Recuento celular. Células epiteliales C4-HD o C4-HI fueron sembradas en placas de 6 *wells*, procesadas como se describe en (A), e incubadas por 6 días (T6) con MPA (10 nM), E2 (1 nM), RU 486 (10 nM) o ICI (1 μM), y las combinaciones que se muestran, por triplicado. El medio de cultivo fue renovado cada 2 días. Las células se tripsinizaron y se contaron en cámara de Neubauer al día del inicio de los tratamientos (T0) y al finalizar el experimento (T6). Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey.

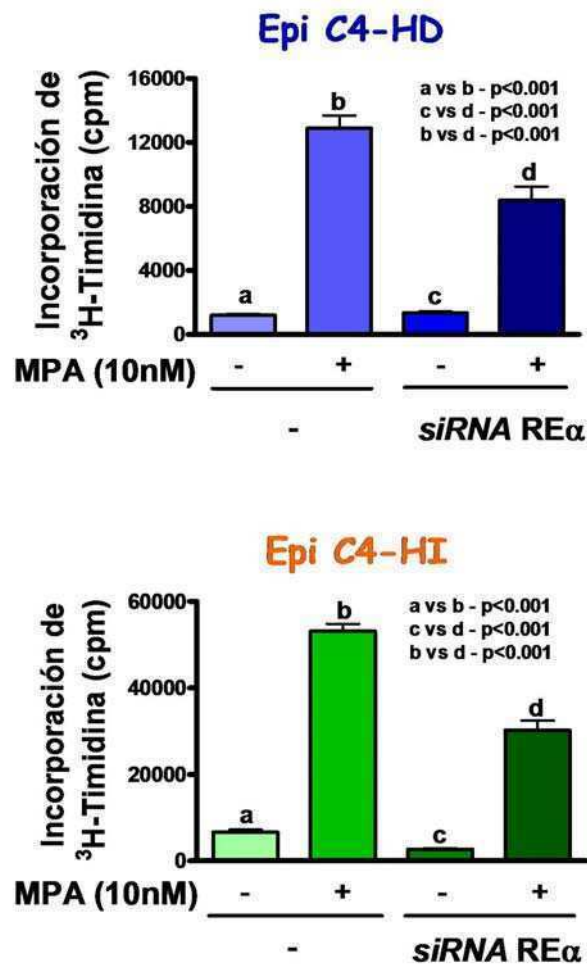


Figura 3.11. El bloqueo en la expresión del RE α inhibe la proliferación celular inducida por MPA. Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI fueron transfectados de forma transiente con un *siRNA* para el RE α o con un vector de expresión para *GFP*, como se explica en Materiales y Métodos. Los cultivos fueron analizados en ensayos de proliferación celular por incorporación de ³H-timidina luego de ser estimuladas o no con MPA (10 nM) por 48 hs. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey.

C. Efecto del ICI en el crecimiento tumoral hormono-dependiente e independiente, *in vivo*.

Luego de haber demostrado que el ICI inhibe la proliferación celular medida por MPA en cultivos primarios de células epiteliales tumorales, y que además reduce los niveles de expresión del RE α , quisimos evaluar su efecto sobre tumores HD y HI *in vivo*. Para esto, utilizamos tumores C4-HD creciendo en presencia de MPA y tumores C4-HI. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 50 mm², comenzaron los tratamientos, que constaron de: E2 (un *pellet* de 5 mg; sc), ICI (5 mg/semana; sc), y RU 486 (12 mg/kg/día; sc), los controles sin tratar se inocularon con solución fisiológica. Se registró el tamaño tumoral cada 2 – 5 días, midiendo ancho x largo y se graficaron las curvas que se muestran en la Figura 3.12. El ICI induce una completa regresión del tumor C4-HD creciendo en presencia de MPA (análisis de las pendientes de las curvas Control vs ICI p<0.001); mientras que sólo inhibe el crecimiento tumoral de la variante C4-HI (análisis de las pendientes de las curvas Control vs ICI p<0.001). En este caso, se puede observar como el E2 o el RU 486 son más eficientes en la inhibición del crecimiento tumoral HI, respecto al ICI (análisis de las pendientes de las curvas E2 vs ICI p<0.001, RU 486 vs ICI p<0.001).

Estos experimentos *in vivo* son coherentes con los resultados obtenidos *in vitro*, en cuanto a que el tumor C4-HI es menos sensible al tratamiento con ICI que la variante tumoral C4-HD.

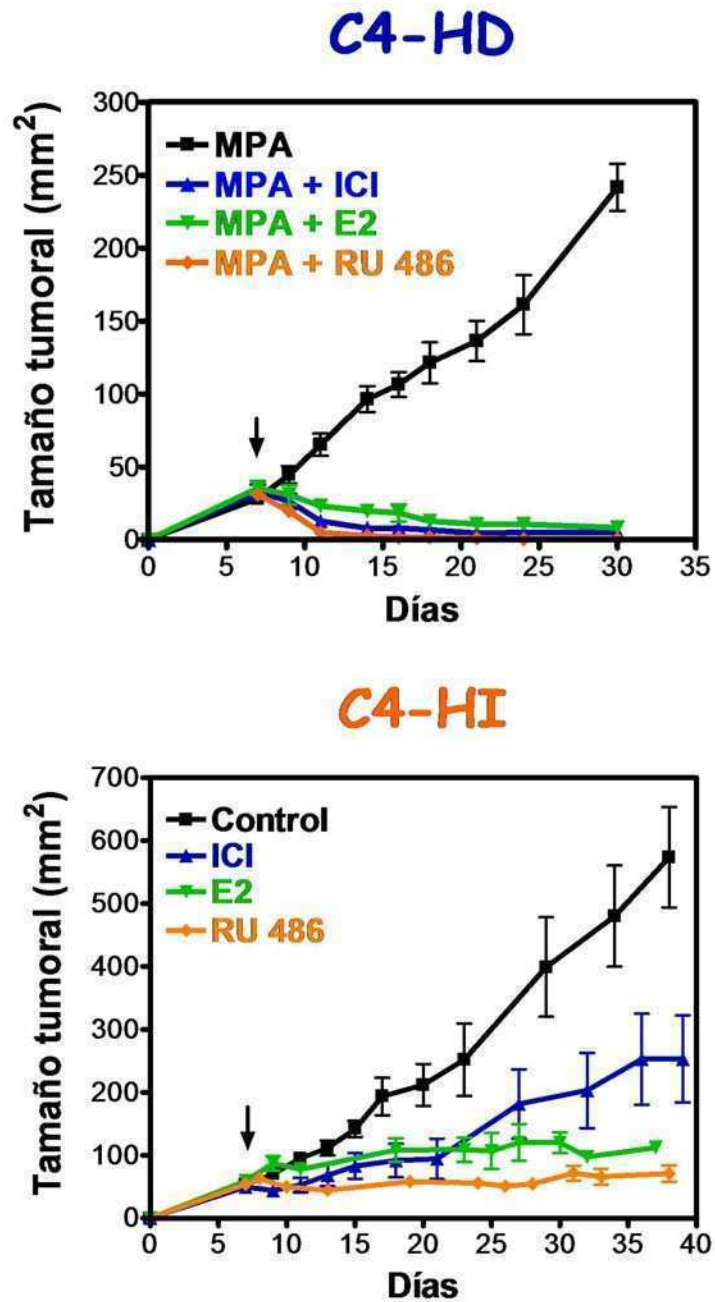


Figura 3.12. El ICI (ICI 182780) induce regresión del crecimiento tumoral HD (C4-HD) e inhibe el crecimiento tumoral HI (C4-HI). Los tumores se transplantaron de forma sc en el flanco inguinal derecho de ratones hembras de la cepa BALB/c. Se co-inoculó un depósito de MPA (20 mg/ratón) sc en el flanco izquierdo sólo para los tumores C4-HD. El tratamiento hormonal comenzó cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 50 mm² (flecha ↓). RU 486: 12 mg/kg/día, E2: 5 mg (*pellet*), ICI: 5 mg/semana. Se utilizaron 5 ratones por tratamiento. El tamaño se midió cada 2-5 días con un calibre (largo x ancho). En el gráfico se indica la media del tamaño tumoral ± DS.

III. Interacción entre receptores de estrógenos *alfa* y receptores de progesterona.

Como se explicó en la Introducción de esta tesis, está descrito una interacción física entre RP y RE α a nivel citoplasmático como mecanismo no genómico de activación de MAPKs por progestágenos (Dressing et al., 2009; Migliaccio et al., 1998) en líneas tumorales humanas T47D. Los dominios del RP y del RE α humanos, que participan de esta interacción se encuentran perfectamente mapeados (Ballare et al., 2003). Por otro lado, hay indicios que indicarían que ambos receptores podrían coexistir en una región acotada del promotor del gen de ciclina D1 cuando células T47D son estimuladas con estrógenos o progestágenos (Cicatiello et al., 2004; Eeckhoutte et al., 2006; Quiles et al., 2009). Teniendo en cuenta además, que la presencia del RE α no unido a ligando es necesaria en la proliferación inducida por MPA en nuestro modelo de tumores mamarios, nos propusimos investigar la interacción entre el RP y el RE α .

A. Interacción nuclear entre RP y RE α en tumores C4-HD y C4-HI *in vivo*.

Para analizar la posible interacción entre el RP y el RE α en tumores creciendo *in vivo*, utilizamos las variantes tumorales C4-HD y C4-HI. Los tumores fueron transplantados en hembras vírgenes de la cepa BALB/c, con un depósito de MPA (20 mg) sólo cuando se trató del tumor hormono-dependiente. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 80 mm² se sacrificaron los animales. Los tumores se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y luego se los mantuvo a -70°C.

Realizamos ensayos de colocalización de ambos receptores por IF y microscopia confocal, y ensayos de co-inmunoprecipitación (IP). Para los ensayos de colocalización, empleamos cortes de criostato de aproximadamente 18 μ m sobre los cuales se realizó la IF con anticuerpos específicos para el RE α (policlonal, MC-20 Santa Cruz Biotech), y para el RP (monoclonal, Ab7 Neomarkers). Durante el desarrollo de esta tesis, se describió que el anticuerpo Ab7, que reconoce el extremo amino terminal del RP total, es específico para la isoforma A del RP cuando se lo utiliza en ensayos de IF; mientras que por WB, reconoce

ambas isoformas (Aupperlee et al., 2005b). Por lo tanto, cada vez que analicemos la presencia del RP con este anticuerpo por IF, nos estaremos refiriendo a la RP_A. Los cortes fueron analizados por microscopia confocal y como se muestra para el tumor C4-HD en la Figura 3.13.A, se observó marcación nuclear para el RE α (en rojo) y para el RP_A (en verde). Además, se identificaron zonas de colocalización nuclear (en amarillo) por la superposición de ambos canales.

Para confirmar la posible interacción nuclear de ambos receptores, se obtuvieron extractos nucleares de tumores C4-HD y C4-HI, sobre los cuales se inmunoprecipitó con un anticuerpo policlonal anti-RE α (MC-20, Santa Cruz Biotech), o con otro anticuerpo policlonal anti-RP (C-19, Santa Cruz Biotech). Los inmunoprecipitados se analizaron por WB con los mismos anticuerpos utilizados en la IP. Como se observa en la Figura 3.13.B, las reacciones de IP funcionaron, dado que detectamos en el WB las proteínas que habíamos inmunoprecipitado (RP_A: 83 kDa, RP_B: 115 kDa, RE α : 66 kDa). Además, cuando inmunoprecipitamos el RE α detectamos también al RP formando parte de ese complejo. Y viceversa, cuando bajamos el RP detectamos al RE α . A pesar que por IF detectamos interacción entre el RE α y el RP_A, los ensayos de IP demostraron que ambas isoformas del RP participan en dicha interacción. Con lo cual, podemos concluir que el RE α está interactuando con ambas isoformas del RP (RP_A y RP_B) en el núcleo celular de tumores C4-HD y C4-HI.

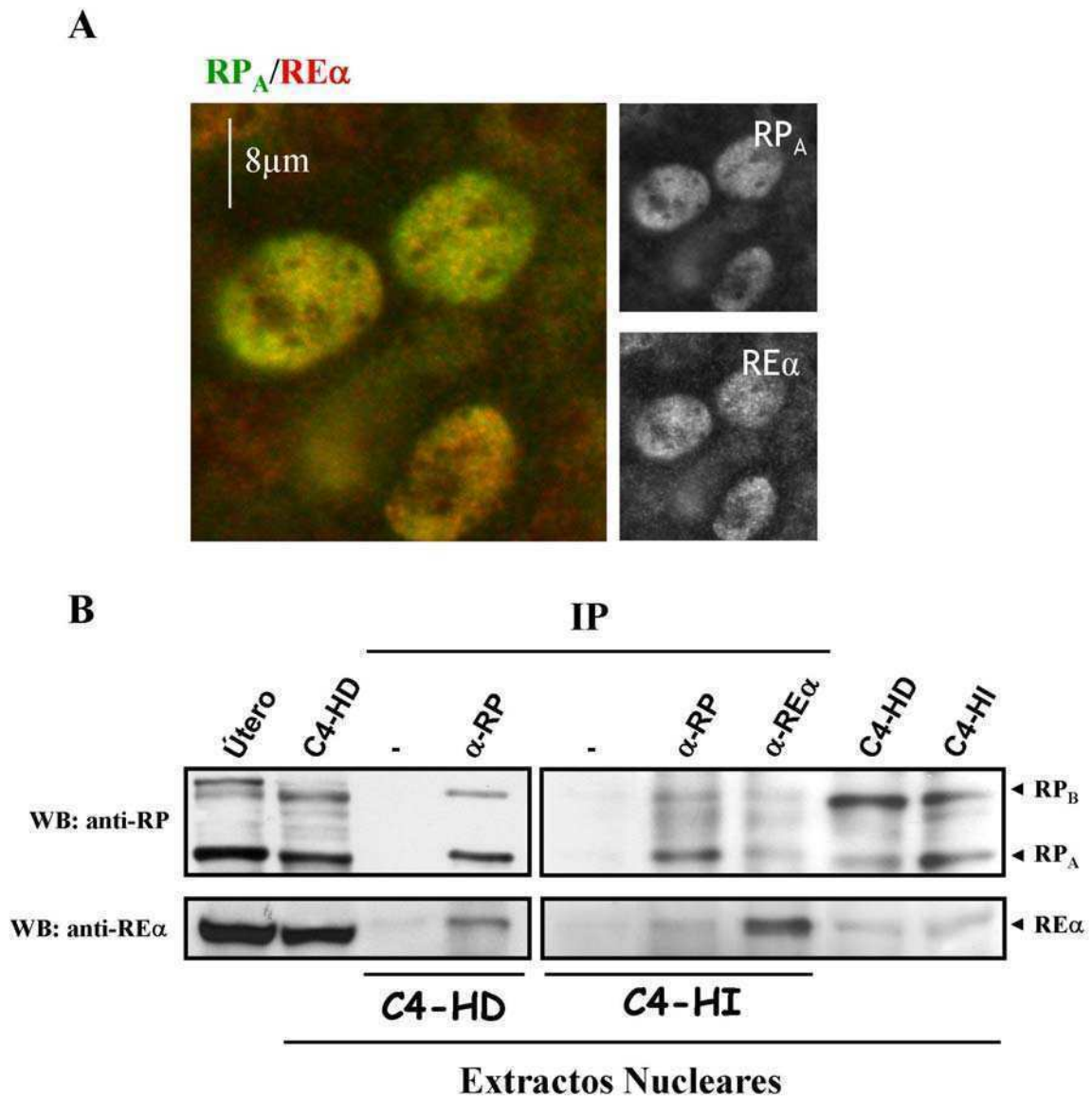


Figura 3.13. Interacción nuclear entre RP y RE α en tumores C4-HD y C4-HI. A) Colocalización nuclear del RP_A (monoclonal, Ab7 – Neomakers, en verde) y el RE α (policlonal, MC-20 - Santa Cruz Biotech, en rojo) evaluada por IF y microscopía confocal a partir de cortes de críostato de un tumor C4-HD creciendo con MPA. B) Ensayos de co-inmunoprecipitación del RP y RE α a partir de extractos nucleares de tumores C4-HD y C4-HI. Se realizaron extractos nucleares de tumor, como se describe en Materiales y Métodos, y se inmunoprecipitó el RP o el RE α . Como control de la técnica, se realizó la IP sin anticuerpo (-), y las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por WB con anticuerpos específicos anti-RP (C-19, Santa Cruz Biotech) y anti-RE α (MC-20, Santa Cruz Biotech). Útero: extracto de útero, control positivo de receptores hormonales.

B. MPA induce colocalización nuclear entre el RP y el RE α .

A partir de este resultado *in vivo*, pasamos a estudiar la interacción entre el RP y el RE α , en cultivos primarios. Un sistema menos complejo que el *in vivo*, y que nos permitió estudiar con más detalle el mecanismo de este proceso y su regulación.

Realizamos cultivos primarios de células epiteliales de tumores C4-HD e investigamos si el MPA ejercía algún cambio a nivel de esta interacción. Luego de alcanzar un 80% de confluencia, los cultivos fueron ayunados por 48 hs en 1% SFBch. Se realizó una incubación con 10 nM de MPA por 5, 10, 30 y 60 minutos. Las células se fijaron, se realizó la IF doble con anticuerpos específicos para el RE α (policlonal, MC-20 Santa Cruz Biotech), y para el RP_A (monoclonal, Ab7 Neomarkers). Los preparados se analizaron por microscopia confocal y los resultados se muestran en la Figura 3.14. Observamos un incremento en la marcación nuclear para el RP_A (en verde) y para el RE α (en rojo) por el tratamiento con MPA. Así mismo, detectamos un incremento en la colocalización nuclear entre ambos receptores por el tratamiento con el progestágeno (Figura 3.14.A). Este incremento en la colocalización resultó significativo, alcanzándose un máximo a los 30 minutos del estímulo con MPA (Figura 3.14.B).

Como control negativo de este ensayo de colocalización, utilizamos a la línea celular LM3 (Bal et al., 1983), que no expresa RE α ni RP. Las células se cultivaron como explicamos en Materiales y Métodos, y la IF se realizó a la par con las células C4-HD utilizando los mismos anticuerpos y reactivos. En la Figura 3.14.C se muestra la IF, y como puede apreciarse, no se detectó marcación con ninguno de los anticuerpos primarios utilizados, en células tratadas o no con el MPA. Además, realizamos otro control negativo donde no incluimos anticuerpos primarios en la IF, sólo para ver el nivel de especificidad de los anticuerpos secundarios. En este caso, tampoco se observó marcación inespecífica, validando los resultados obtenidos en los cultivos de células epiteliales C4-HD.

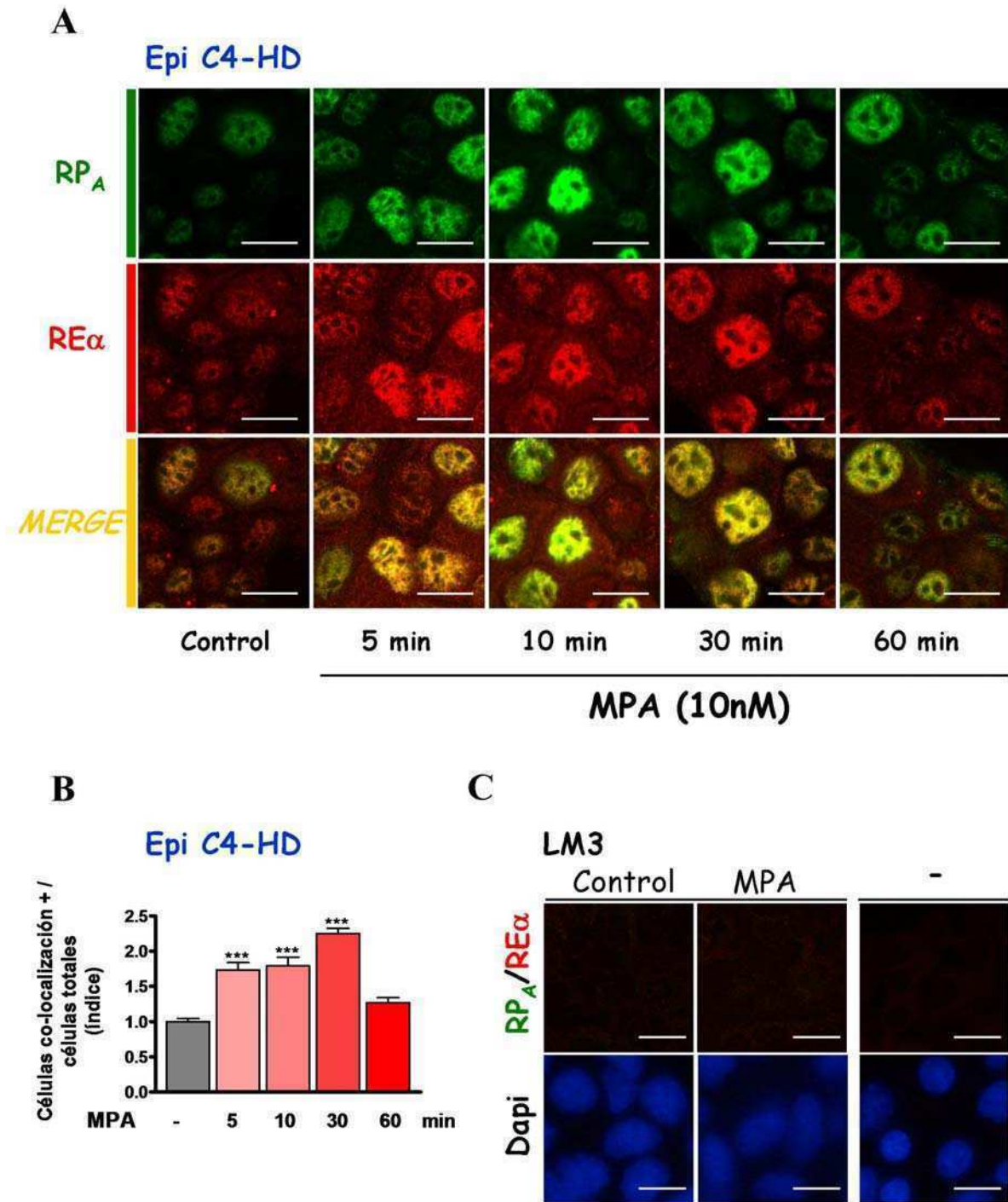


Figura 3.14. MPA induce la co-localización nuclear del RP y el RE α en células epiteliales C4-HD.

A) Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 48 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron incubados con MPA (10 nM) por 5, 10, 30 y 60 minutos. Las células fueron fijadas y procesadas para IF y microscopia confocal con anticuerpos primarios específicos para el RP_A (monoclonal, en verde) y RE α (policlonal, en rojo). *Merge*: superposición de ambos canales. Barra: 30 μ m. B) Cuantificación de células donde se observó colocalización nuclear de ambos receptores (en amarillo).***p<0.001, ANOVA y *test* de Tukey. C) Como control negativo se utilizó la línea LM3 que no expresa RE α ni RP. Los cultivos se incubaron igual que en (A) y con MPA (10 nM) por 10 minutos. Las células se fijaron y fueron procesadas para IF y microscopia confocal con anticuerpos primarios específicos para RP_A (monoclonal, en verde) y RE α (policlonal, en rojo), o sin anticuerpos primarios (*derecha*, α -ratón en verde, y α -conejo en rojo). Se observa la imagen de ambos canales. Los núcleos fueron teñidos con Dapi (azul). Barra: 10 μ m.

C. MPA induce colocalización nuclear entre las formas fosforiladas del RP y el RE α .

Sabemos que el MPA es capaz de inducir fosforilación del RP en el residuo serina 294, en células epiteliales C4-HD (Labriola et al., 2003). Si bien está más estudiada la fosforilación del RP_B en presencia del ligando en este sitio, ambas isoformas son capaces de sufrir esta modificación. Por otro lado, en esta tesis se describió cómo el MPA es capaz además, de inducir la fosforilación del RE α . El siguiente objetivo fue investigar la interacción nuclear entre ambos receptores fosforilados, y la participación del progestágeno en este proceso.

Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD fueron incubadas por 30 minutos con MPA (10 nM), ya que en este tiempo se obtuvo la máxima colocalización, fijadas y procesadas para IF y microscopía confocal con anticuerpos primarios específicos para la pSer294 del RP (policlonal, Abcam) y para el RE α total (monoclonal, Dako). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.15. Como puede observarse, el MPA induce un aumento en la fosforilación en la serina 294 del RP, y esta marcación es nuclear. Además, luego de 30 minutos de incubación con el progestágeno hay un incremento en la localización nuclear del RE α . Cuando superponemos ambos canales, correspondientes a cada inmunomarcación (*Merge*, en amarillo), observamos un aumento significativo en la colocalización nuclear entre la pSer294 RP y el RE α (Figura 3.15.A y B).

Posteriormente, analizamos la interacción entre la pSer294 RP y la pSer118 RE α . Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD fueron incubadas por 15 minutos con MPA (10 nM), fijadas y procesadas para IF y microscopía confocal con anticuerpos primarios específicos para la pSer294 del RP (monoclonal, Neomarkers) y para la pSer118 del RE α (policlonal, Cell Signaling). Como se observa en la Figura 3.16, MPA induce fosforilación del RP (en la serina 294 analizada), y del RE α (en la serina 118). Esta marcación es principalmente nuclear, aunque también se observa en el citosol y en la membrana citoplasmática (para el RP). Además, el tratamiento con el progestágeno induce, de forma significativa, colocalización nuclear entre ambos receptores fosforilados (Figura 3.16.A y B).

Estos resultados, no sólo nos aportan mayor información sobre el mecanismo de dicha interacción entre el RP y el RE α , sino que también validan los resultados obtenidos, dado que observamos el mismo evento con distintos anticuerpos.

Luego quisimos investigar el efecto del tratamiento con estrógenos, RU 486 o antiestrógenos en la interacción nuclear entre el RP y el RE α . Vimos previamente que estos tratamientos inducen una reducción en los niveles totales del RE α y que además inhiben la proliferación celular mediada por MPA. Cuando incubamos células epiteliales de tumores C4-HD con MPA (10 nM) por 30 minutos, aumenta, como ya describimos, la colocalización nuclear entre el RP y el RE α . Curiosamente, la incubación de las células con RU 486 no inhibió la interacción desarrollada en presencia del MPA, indicando un efecto agonista del antiprogéstágeno en este nivel. Este resultado está de acuerdo con que el efecto inhibitorio del RU 486 en la proliferación celular estaría más relacionado con el reclutamiento de represores de la transcripción. Cuando se incuban las células con MPA, conjuntamente con E2 (1 nM) o ICI (1 μ M) durante 30 minutos, observamos una disminución en la colocalización del RP con el RE α (Figura 3.17). En este caso, se realizó la IF doble con anticuerpos específicos para el RE α (policlonal, MC-20 Santa Cruz Biotech), y para el RP_A (monoclonal, Ab7 Neomarkers). De manera tal que cuando el RE α se encuentra unido a ligando, disminuye la colocalización nuclear con el RP_A. Otra observación interesante, es la presencia de RP en la membrana celular detectado con dos anticuerpos diferentes (para la pSer294 RP – Figura 3.16, y para el RP total – Figura 3.17), corroborando así experimentos demostrados por la Dra. MC Bottino (tesis doctoral)

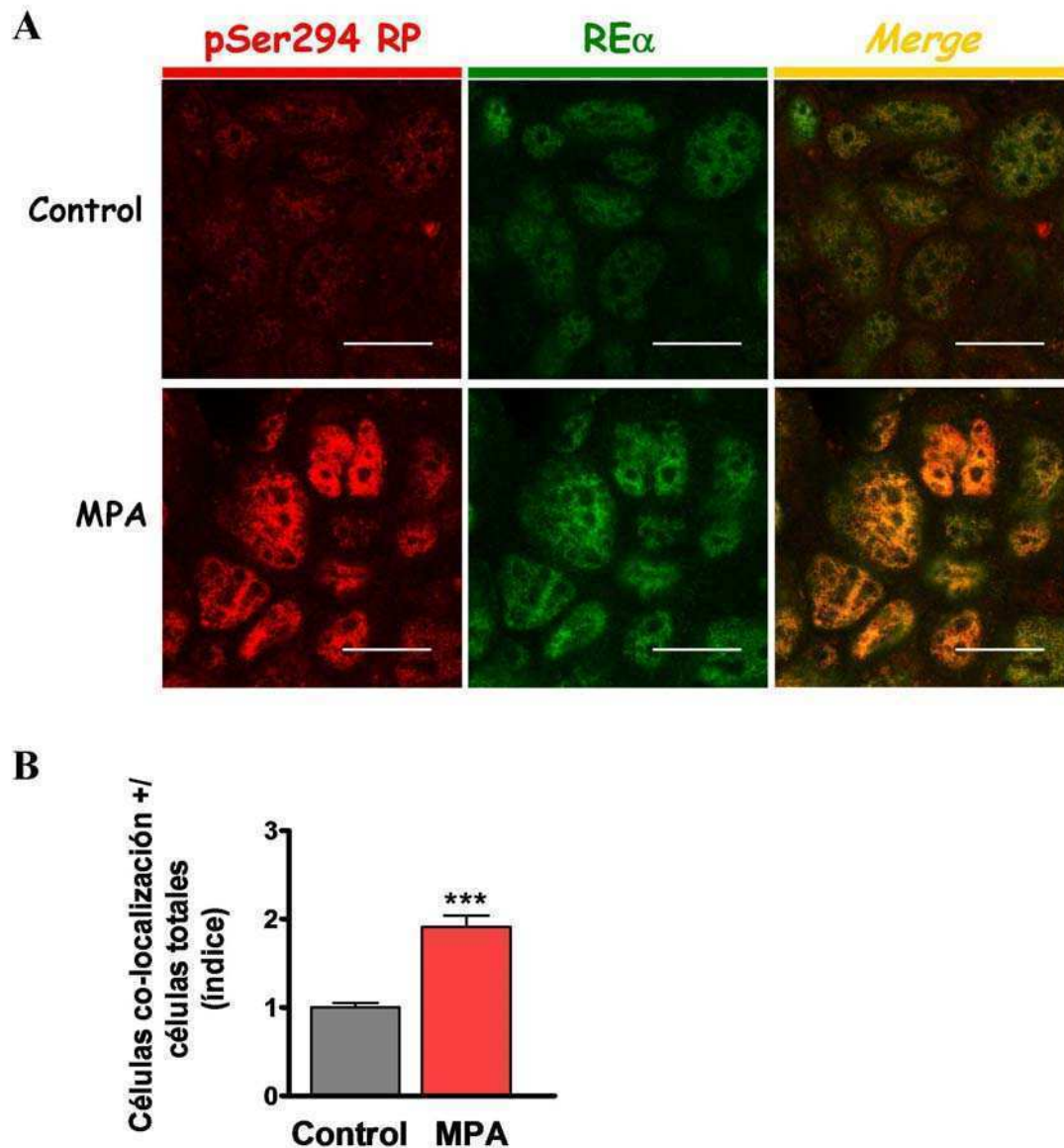


Figura 3.15. MPA induce la colocalización nuclear de la pSer294 del RP y el RE α en células epiteliales C4-HD. A) Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 48 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron incubados con MPA (10nM) por 30 minutos, fijados y procesados para IF y microscopía confocal con anticuerpos primarios específicos para la pSer294 RP (policlonal, en rojo) y el RE α (monoclonal, en verde). *Merge*: superposición de ambos canales. Barra: 10 μ m. B) Cuantificación de células donde se observó colocalización nuclear de ambos receptores (en amarillo).*** $p < 0.001$, “t” *test* de Student.

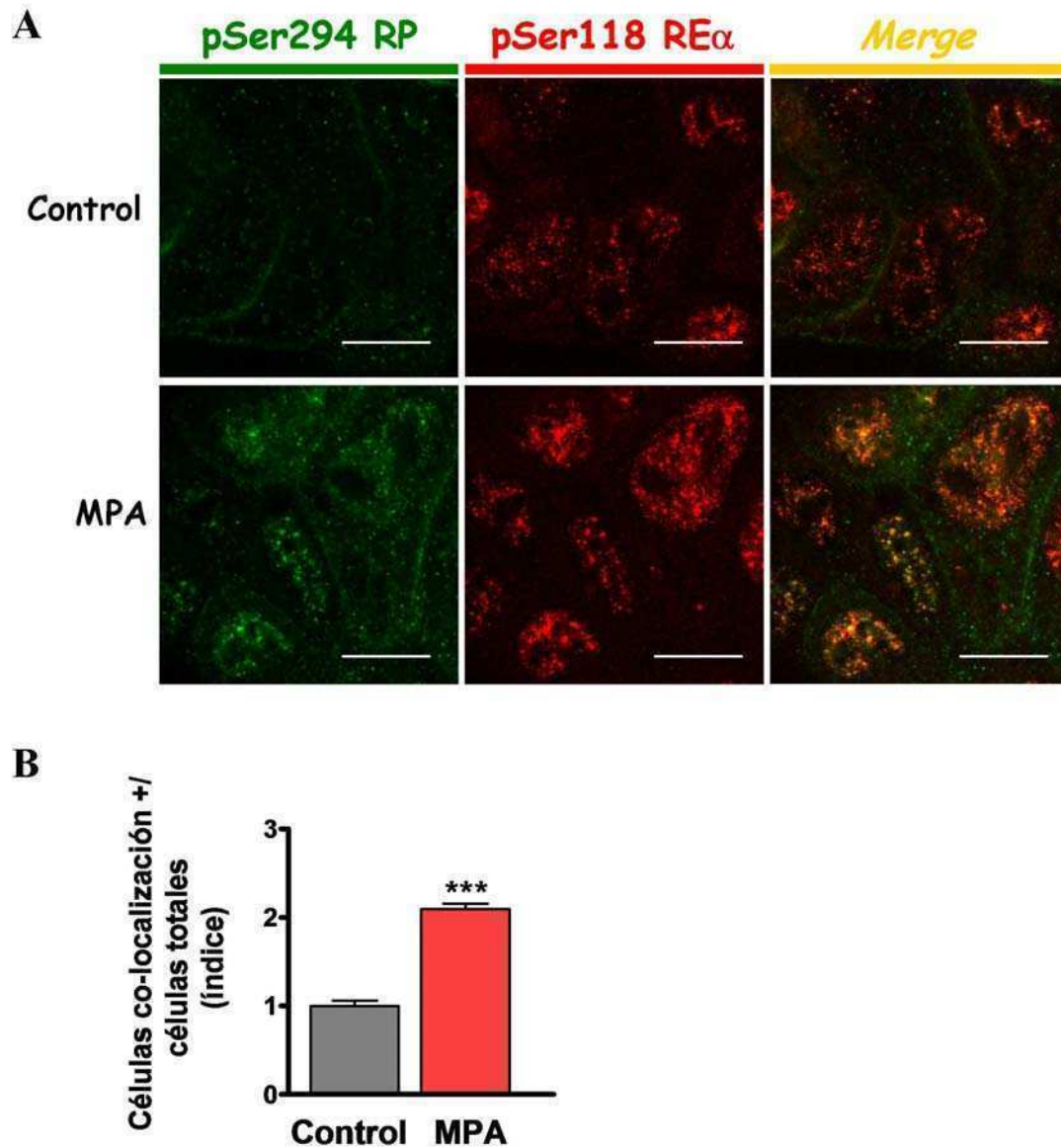


Figura 3.16. MPA induce la colocalización nuclear entre la pSer294 del RP y la pSer118 del RE α en células epiteliales C4-HD. A) Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 48 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron incubados con MPA (10nM) por 15 minutos, fijados y procesados para IF y microscopia confocal con anticuerpos primarios específicos para la pSer294 RP (monoclonal, en verde), y la pSer118 RE α (policlonal, en rojo). *Merge*: superposición de ambos canales. Barra: 10 μ m. B) Cuantificación de células donde se observó colocalización nuclear de ambos receptores (en amarillo).*** $p < 0.001$, “t” test de Student.

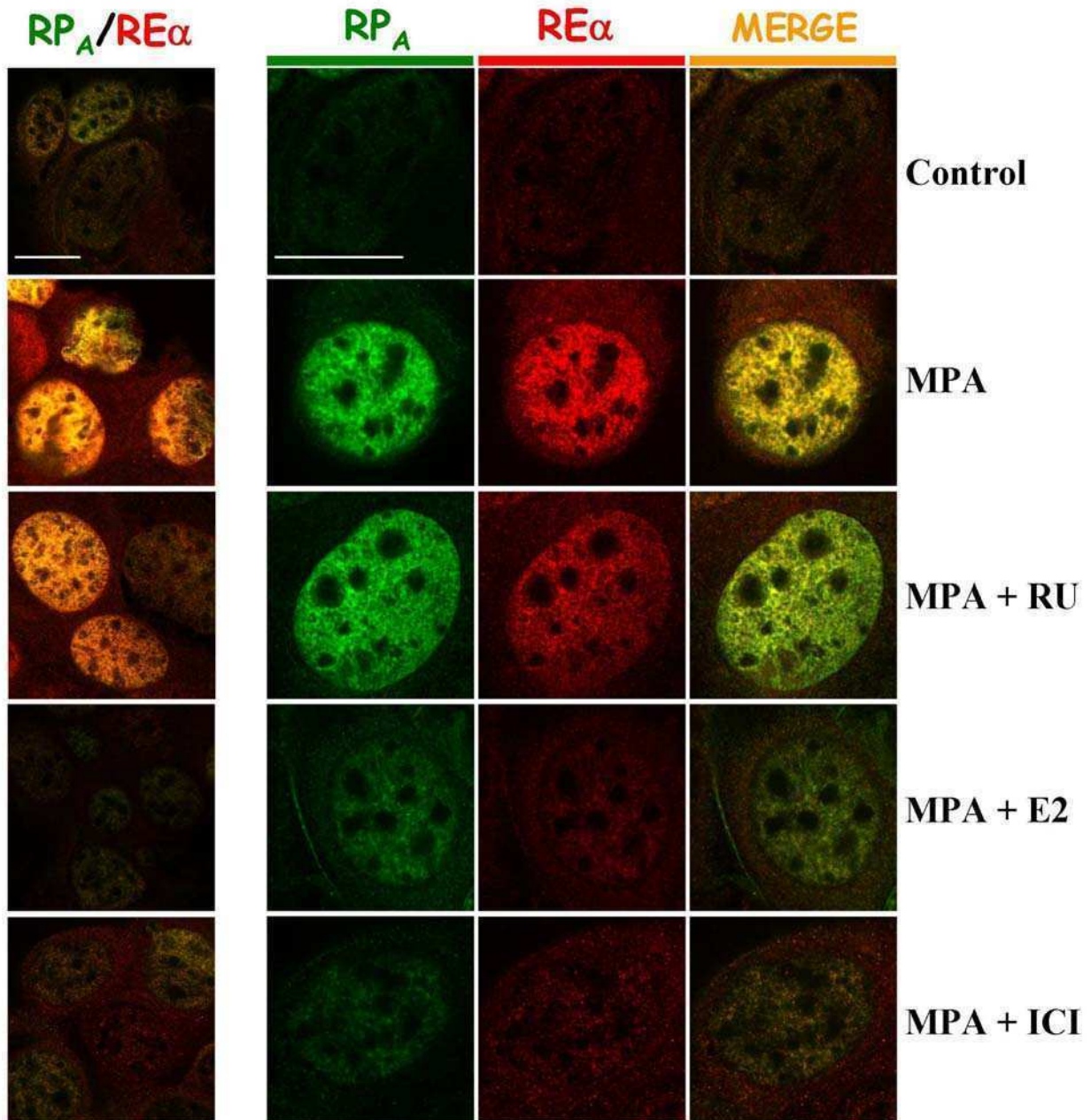


Figura 3.17. Estradiol o ICI 182780 reducen la colocalización nuclear entre el RP y el RE α inducida por MPA en células epiteliales C4-HD. *Izquierda*, cultivos primarios de células epiteliales C4-HD fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 48 hs en 1% SFBch. Los cultivos fueron incubados con MPA (10 nM), MPA + RU 486 (10 nM), MPA + E2 (1 nM) y MPA + ICI (1 μ M) por 30 minutos. Las células fueron fijadas y procesadas para IF y microscopía confocal con anticuerpos primarios específicos para el RP $_A$ (monoclonal, en verde) y el RE α (policlonal, en rojo). Barra: 12 μ m. *Derecha*, se muestra un detalle de la marcación para cada uno de los receptores (canal verde, RP $_A$; canal rojo, RE α), *Merge*: superposición de ambos canales. Barra: 12 μ m.

D. MPA induce colocalización nuclear entre el RP y el RE α en la línea tumoral humana T47D.

Posteriormente, quisimos investigar si los resultados anteriores, en cuanto a la interacción nuclear entre el RP y el RE α , eran reproducibles en la línea tumoral de mama humana T47D. Esta línea expresa receptores de estrógenos y altos niveles del RP. En primer lugar se evaluó la respuesta a hormonas en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para los tumores murinos. Como observamos en la Figura 3.18, su respuesta a MPA (10 nM) es muy similar a la de células epiteliales C4-HD y C4-HI en ensayos de incorporación de timidina tritiada. La gran diferencia en este caso, es que el E2 (1 nM) induce proliferación celular, mientras que su efecto es inhibitorio sobre las células tumorales murinas. En cuanto al efecto observado con el ICI, vemos que inhibe la proliferación celular inducida por MPA (ICI 1 μ M) o E2 (ICI 0.01 y 1 μ M). Además, el RU 486 mostró efectos ya observados por otros (Iwasaki et al., 1999; Labriola et al., 2003). Desarrolló una tendencia a inhibir la estimulación inducida por E2, mientras que inhibió completamente la inducida por MPA, sugiriendo que el RP es clave en el crecimiento de estas células.

Para analizar la interacción entre RP y RE α en esta línea celular, cultivamos las células en *chamber slides* hasta un 80% de confluencia, y luego de ayunarlas por 48 hs en 1% SFBch, fueron incubadas con MPA (10 nM) por 5, 10, 30 y 60 minutos. Se fijaron las células y se procesaron para IF y microscopía confocal con anticuerpos específicos para el RP_A (monoclonal, Ab7 – Neomarkers) y para el RE α (policlonal, MC-20 – Santa Cruz Biotech). Como observamos en la Figura 3.19.A, el tratamiento con el progestágeno induce la colocalización nuclear de ambos receptores. Esto fue cuantificado, y como se muestra en el gráfico de la Figura 3.19.B, dicha colocalización resultó significativa luego de 5 y 10 minutos de tratamiento con el MPA.

Por otro lado, y para validar estos resultados, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos nucleares de la línea tumoral T47D, tratadas o no con 10 nM de MPA por 20 minutos (Figura 3.19.C). En este caso, se inmunoprecipitó con un anticuerpo policlonal anti-RE α (MC-20, Santa Cruz Biotech), o con otro

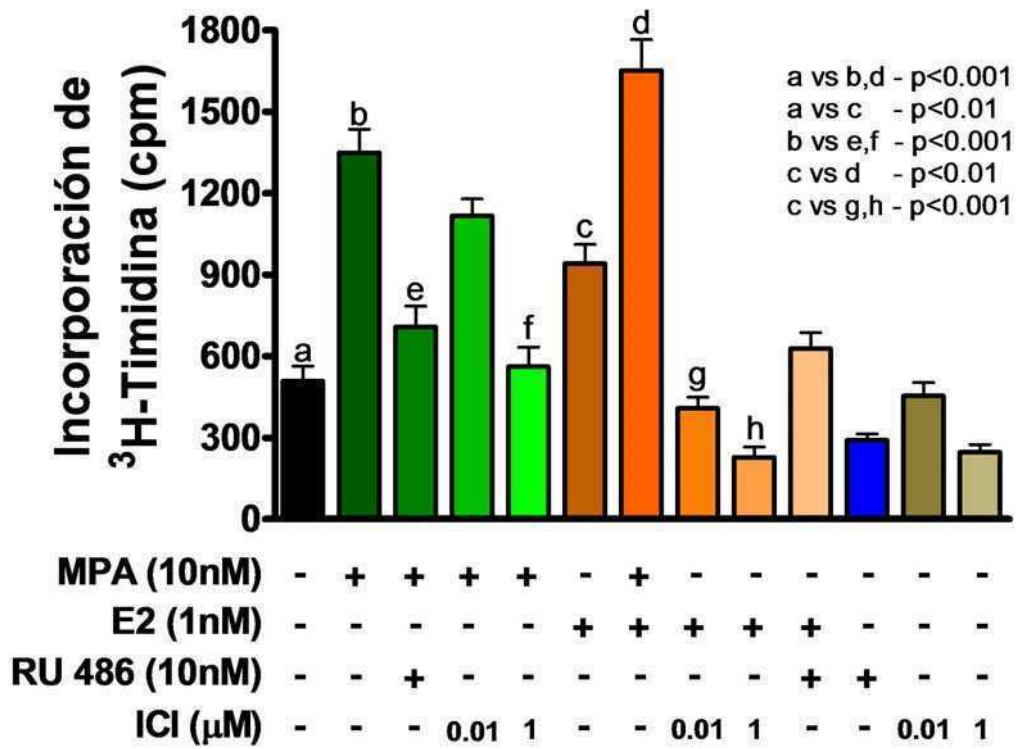


Figura 3.18. Respuesta al tratamiento hormonal de la línea tumoral de mama humana T47D. Las células fueron sembradas en placas de 96 wells, y mantenidas durante 24 hs en 10% SFB. Luego del pegado a las mismas, el medio fue reemplazado por 1% SFBch por 24 hs. Las células fueron tratadas por 48 hs con MPA (10 nM), E2 (1 nM), RU 486 (10 nM) o ICI (0.01 y 1 µM), y se cuantificó la timidina incorporada como se detalla en Materiales y Métodos. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey

anticuerpo policlonal anti-RP (C-19, Santa Cruz Biotech). Los inmunoprecipitados se analizaron por *western blot* con anticuerpos específicos para el RP total (C-19, Santa Cruz Biotech), para la pSer190 RP (Ab11, Noemarkers), para la pSer294 RP (Abcam), y para el RE α (MC-20, Santa Cruz Biotech; y SP1, Neomarkers). Como podemos observar, MPA induce fosforilación del RP en los sitios serina analizados (Ser190 y Ser294) en ambas isoformas del RP. Además, cuando inmunoprecipitamos el RE α detectamos también al RP, total y fosforilado, formando parte de ese complejo. Y viceversa, cuando bajamos el RP detectamos al RE α , con lo cual, podemos concluir que el RE α está interactuando a nivel nuclear con ambas isoformas del RP (RP_A y RP_B) en la línea tumoral humana T47D. En la inmunoprecipitación para el RE α , detectamos un incremento ($p < 0.05$) en el RP fosforilado en la serina 294 mediado por MPA. Este estado de fosforilación del RP sería un indicio de un receptor activo transcripcionalmente.

En la Figura 3.19.D, se muestran los controles realizados para estar seguros que no tenemos proteínas citosólicas en los extractos nucleares utilizados en los ensayos de IP. Como marcador citoplasmático empleamos un anticuerpo anti-Tubulina, y como marcador nuclear, un anticuerpo anti el factor de transcripción Sp1. Como vemos, no detectamos marcación para Tubulina en los extractos nucleares, ni marcación para Sp1 en los extractos citosólicos.

Posteriormente, analizamos la interacción entre el RP fosforilado, inducido por MPA, y el RE α . Para esto, las células fueron crecidas en *chamber slides* hasta un 70-80% de confluencia, y luego de ayunarlas por 48 hs en 1% SFBch, fueron incubadas con MPA (10 nM) durante 10 minutos, se fijaron y se procesaron para IF y microscopía confocal con anticuerpos primarios específicos para la pSer294 del RP (policlonal, Abcam) y para el RE α total (monoclonal, Dako). Como observamos en la Figura 3.20.A, hay un incremento en la fosforilación del RP en el residuo serina 294 luego del tratamiento con el progestágeno, y esta marcación es fundamentalmente nuclear. Por otro lado, también se observa un aumento en la marcación para el RE α , inducido por MPA. Cuando analizamos ambos canales en el microscopio confocal, observamos un incremento en la colocación nuclear entre ambos receptores por efecto del tratamiento con el progestágeno (Figura 3.20.A y B). Como control de la técnica, realizamos la IF en ausencia de los anticuerpos primarios (Figura 3.20.C). En este caso, sólo observamos una marcación basal correspondiente a los anticuerpos secundarios.

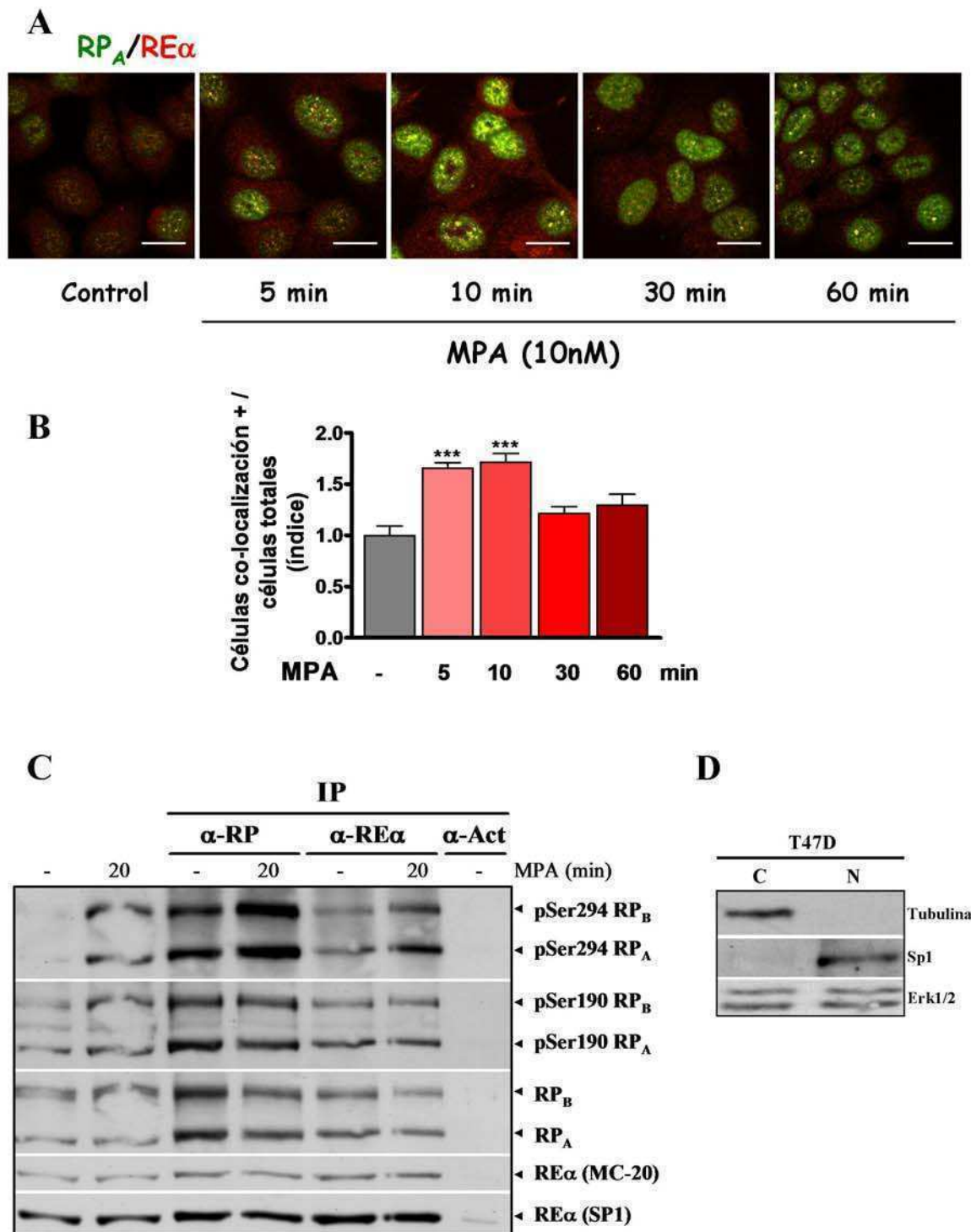


Figura 3.19. Interacción nuclear entre el RP y el RE α en células tumorales de mama humana T47D. *Continúa.*

Figura 3.19. *Continuación.* A) MPA induce la colocalización nuclear de ambos receptores. Las células fueron crecidas hasta un 80% de confluencia y luego ayunadas por 48 hs en 1% SFBch. Luego de 5, 10, 30, y 60 minutos de incubación con MPA (10 nM), los cultivos fueron fijados y procesados para IF y microscopía confocal con anticuerpos primarios específicos para el RP_A (monoclonal, en verde) y el RE α (policlonal, en rojo). B) Cuantificación de células donde se observó colocalización nuclear de ambos receptores (en amarillo).*** $p < 0.001$, ANOVA y *test* de Tukey. C) Ensayos de co-inmunoprecipitación (IP) del RP y el RE α a partir de extractos nucleares de células tumorales humanas T47D. Las células se trataron como en (A), y luego del ayuno en 1% SFBch, fueron tratadas con MPA (10 nM) por 20 minutos. Se realizaron extractos nucleares como se describe en Materiales y Métodos, y se inmunoprecipitó el RP o el RE α . Como control de la técnica, se realizó la IP con un anticuerpo no relacionado (anti-Actina: α -Act). Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por WB con anticuerpos específicos anti-pSer294 RP, pSer190 RP, RP total, y dos anticuerpos diferentes para el RE α (MC-20; y SP1). D) Control de contaminación citosólica en los extractos nucleares. Se analizaron extractos nucleares (N) y citosólicos (C) de la línea T47D con anticuerpos anti-Tubulina (marcador citoplasmático), y anti-Sp1 (marcador nuclear). Erk1/2 se utilizó como control de carga.

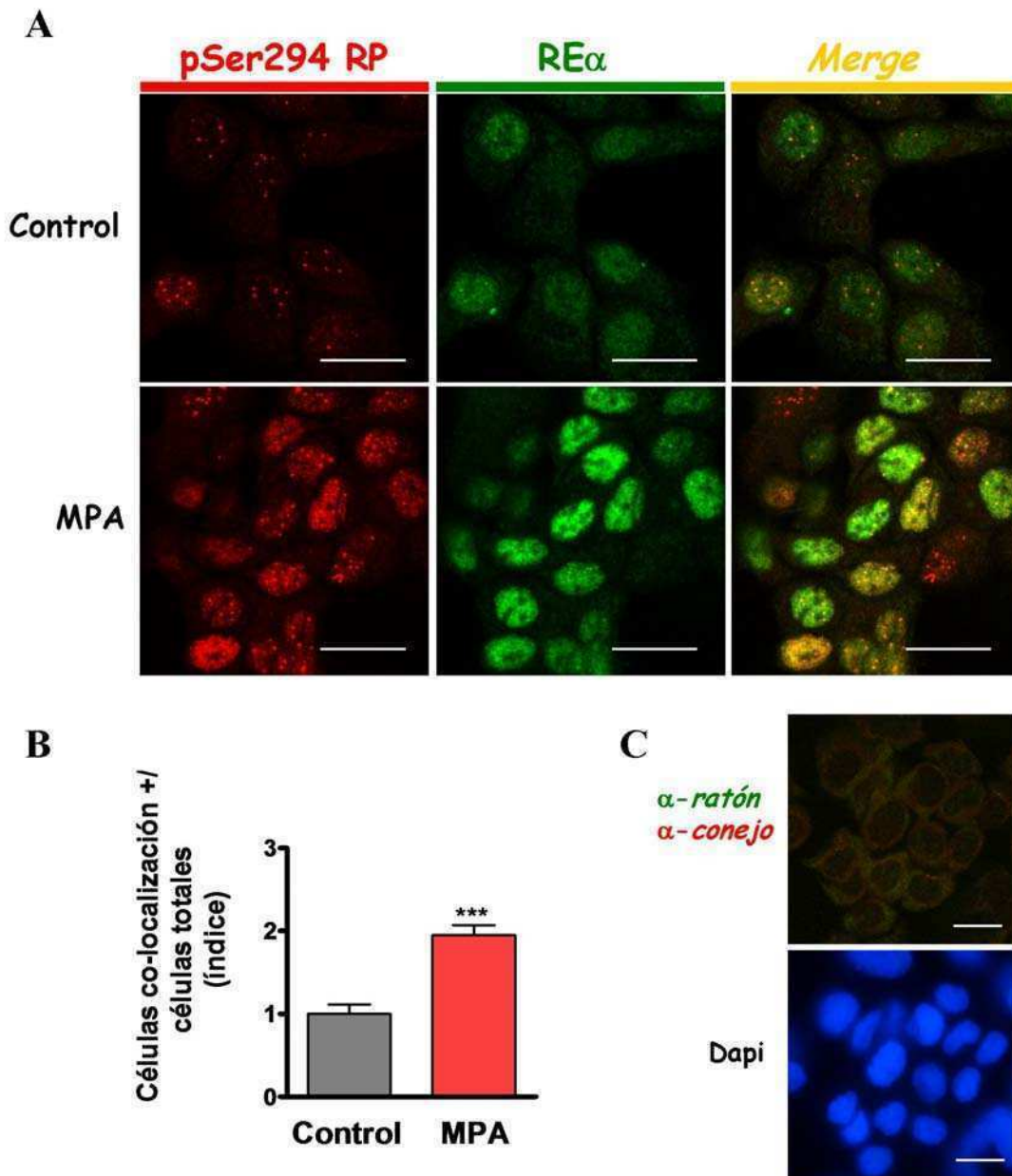


Figura 3.20. MPA induce colocalización nuclear de pSer294 RP y RE α en células tumorales de mama humana T47D. A) MPA induce colocalización nuclear del RP fosforilado y del RE α . Las células fueron crecidas hasta un 70-80% de confluencia y luego ayunadas por 24 hs en 1% SFBCh. Luego de 10 minutos de incubación con MPA (10 nM), los cultivos fueron fijados y procesados para IF y microscopia confocal con anticuerpos primarios específicos para pSer294 RP (policlonal, en rojo) y RE α (monoclonal, en verde). *Merge*: superposición de ambos canales. Barra: 10 μ m. B) Cuantificación de células donde se observó colocalización nuclear de ambos receptores (en amarillo).*** $p < 0.001$, “t” *test* de *Student*. C) Como control negativo de la técnica, las células se fijaron y fueron procesadas para IF y microscopia confocal sin anticuerpos primarios y en presencia de los anticuerpos secundarios (α -ratón en verde, y α -conejo en rojo). Se observa la imagen de ambos canales. Los núcleos fueron teñidos con Dapi (azul). Barra: 10 μ m.

IV. Estroma tumoral y receptores hormonales.

Las células epiteliales de este modelo tumoral, pueden utilizar tanto progestágenos como factores de crecimiento para proliferar. Sin embargo, siempre necesitan tener un RP funcional, ya que el bloqueo del RP induce tanto inhibición en la proliferación celular *in vitro*, como así también, regresión tumoral *in vivo*. Demostramos que los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) estimulan el crecimiento tumoral *in vitro* sobre células epiteliales (Lamb et al., 1999).

En un trabajo publicado durante el desarrollo de esta tesis, demostramos que un componente del estroma tumoral, en particular los fibroblastos asociados a carcinoma (*CAFs*), son capaces de regular el crecimiento tumoral hormono-independiente mediante un *crosstalk* entre el FGF-2 y el RP (Giulianelli et al., 2008a). A partir de cultivos primarios de células epiteliales y *CAFs* provenientes de tumores C4-HD y C4-HI, realizamos co-cultivos entre ambas poblaciones (Figura 3.21.A, Tesis Doctoral Dra. Caroline Lamb). En ensayos de proliferación por incorporación de timidina tritiada, demostramos que los *CAFs* derivados del tumor C4-HI inducen un mayor nivel de proliferación de células epiteliales tumorales (HD o HI), en comparación a los *CAFs* del tumor C4-HD (Figura 3.21.B, Tesis Doctoral Dra. Caroline Lamb). Por otro lado, sabemos que tanto las células Epi C4-HD como las C4-HI, responden a estímulos proliferativos mediados por FGF-2 (Lamb et al., 1999), y que este efecto es inhibido por el antiprogestágeno RU 486 (Figura 3.21.C), indicando un *crosstalk* entre la vía del FGF-2 y del RP. Además, demostramos que los *CAF* C4-HI expresan elevados niveles del FGF-2 en comparación a los *CAF* C4-HD (Giulianelli et al., 2008a). Y en co-cultivo con células epiteliales C4-HI, inducen un incremento en la expresión del RP ($p < 0.01$) y en la fosforilación del receptor en residuos específicos serina 190 ($p < 0.01$) y serina 294 ($p < 0.001$; Figura 3.22.A). Luego estudiamos la capacidad del RP de unirse a su elemento respondedor en el ADN (PRE, *progesterone responsive element*), inducido por los *CAFs*. Utilizamos la línea tumoral humana T47D-YA que sobreexpresa RP_A , para poner a punto la técnica de EMSA para el RP. Como se observa en la Figura 3.22.B, la incubación con el progestágeno R5020, incrementa la unión del RP al PRE. Como controles de la técnica y para corroborar la especificidad de las bandas, empleamos un exceso de PRE frío, el cual desplaza la unión del RP al PRE- ^{32}P . En este caso no se observan bandas. Además, utilizamos un oligonucleótido a cuya secuencia el RP no puede

unirse (CRE). Un exceso de CRE no desplaza la unión específica del RP al PRE-³²P, y se observan bandas. Por último, agregamos al ensayo de EMSA el control con un anticuerpo anti-RP, con el que pudimos observar un desplazamiento (*super shift*) del complejo anticuerpo-RP-PRE-³²P. Cuando estudiamos la capacidad de los CAFs de inducir el pegado del RP al PRE, observamos que cuando las células epiteliales, C4-HD y C4-HI, se encuentran en co-cultivo con los CAF C4-HI, hay un incremento en la unión del RP a su elemento de respuesta en el ADN, en comparación a cuando los cultivos epiteliales se encontraron co-cultivados con CAF C4-HD (Figura 3.22.C).

Habiendo demostrado que los CAF C4-HI expresan altos niveles de FGF-2 (Giulianelli et al., 2008a), y que co-cultivados con células epiteliales activan al RP, evaluamos el efecto en el bloqueo del FGF-2 sobre la capacidad del RP de unirse a su elemento respondedor PRE. Empleamos un anticuerpo policlonal bloqueante contra el FGF-2 (Ab-FGF-2, desarrollado en el laboratorio del Dr. Baldi en el IByME), y evaluamos la actividad del RP por EMSA. Como se muestra en la Figura 3.22.D, luego de tratar por 2 hs con el Ab-FGF-2 a los co-cultivos de Epi C4-HI con CAF C4-HI, observamos una disminución significativa en el pegado del RP al PRE en comparación al co-cultivo sin tratar.

En la Figura 3.22.E, se muestra por WB que los CAFs provenientes de tumores C4-HD o C4-HI, no expresan RE α ni RP. Además, tampoco observamos marcación para E-Caderina, un marcador de células epiteliales. Por lo tanto, los efectos observados son exclusivos de las células epiteliales. Cabe destacar también, que por efecto del co-cultivo con CAF C4-HI, corroboramos el incremento en la expresión del RP por parte de las células epiteliales, ya descripto previamente, y al mismo tiempo, demostramos que los niveles del RE α también aumentan cuando las células epiteliales son cultivadas con CAFs ($p < 0.05$).

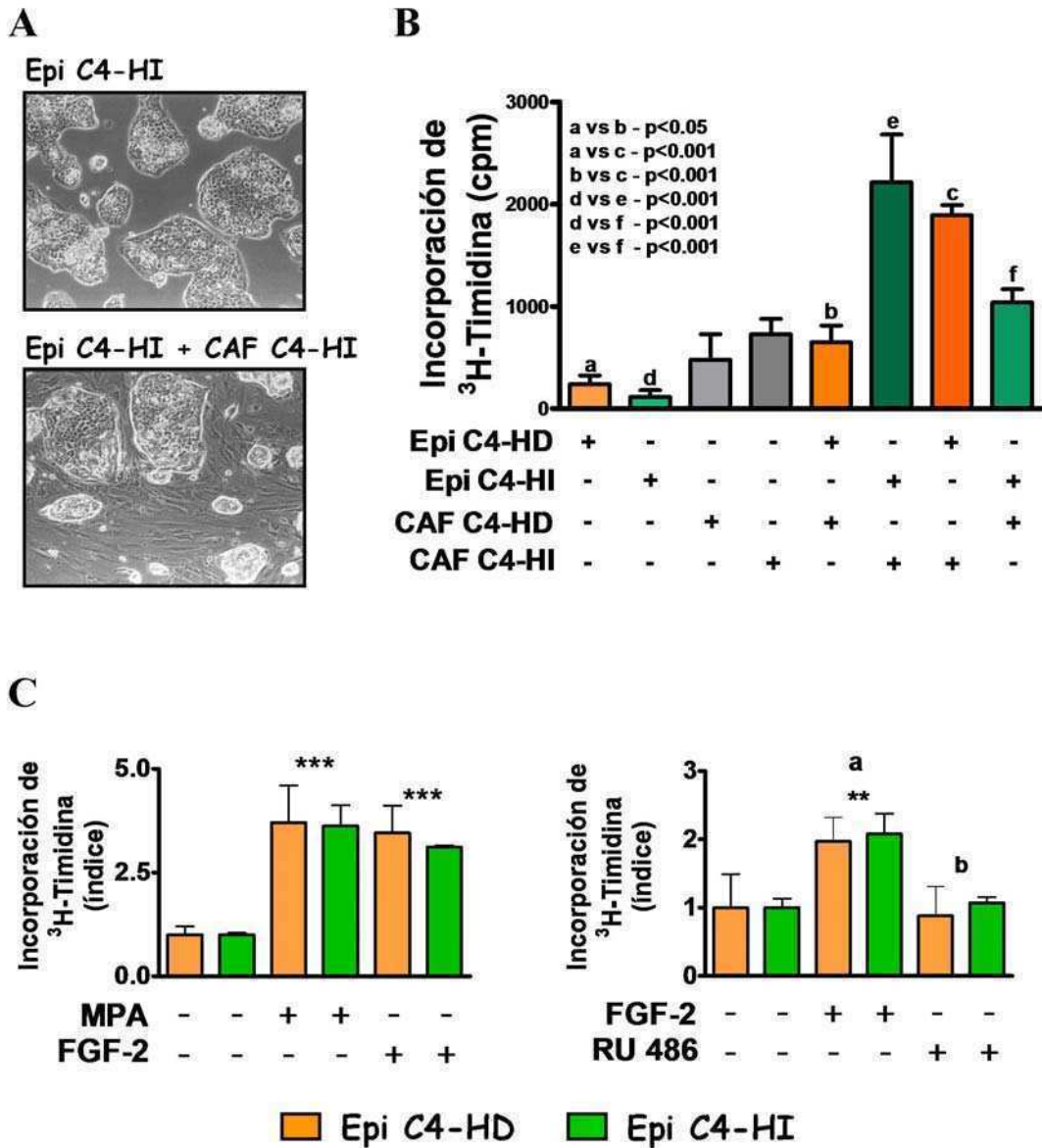


Figura 3.21. Proliferación de células epiteliales mediada por CAFs y FGF-2. A) Microscopía de campo claro (100X) de células Epi C4-HI purificadas o en co-cultivo con CAF C4-HI (tesis Doctoral C. Lamb). B) Ensayos de proliferación celular por incorporación de ³H-timidina. Igual número de células Epi C4-HD, Epi C4-HI, CAF C4-HD y CAF C4-HI fueron sembradas solas o en las diferentes combinaciones en 10% SFB en placas de 96 wells. Luego del pegado a las mismas, el medio fue reemplazado por 1% SFBch por 48 hs. Se cuantificó la timidina incorporada como se detalla en Materiales y Métodos. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey (tesis Doctoral C. Lamb). C) Ensayos de proliferación celular por incorporación de ³H-timidina. Las células fueron sembradas en placas de 96 wells. Luego del pegado a las mismas, el medio fue reemplazado por 1% SFBch por 24 hs. Las células fueron tratadas por 48 hs con MPA (10 nM), FGF-2 (50 ng/ml), y RU 486 (10 nM), y se cuantificó la timidina incorporada como se detalla en Materiales y Métodos. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey, ***p*<0.01, ****p*<0.001, a vs b *p*<0.01.

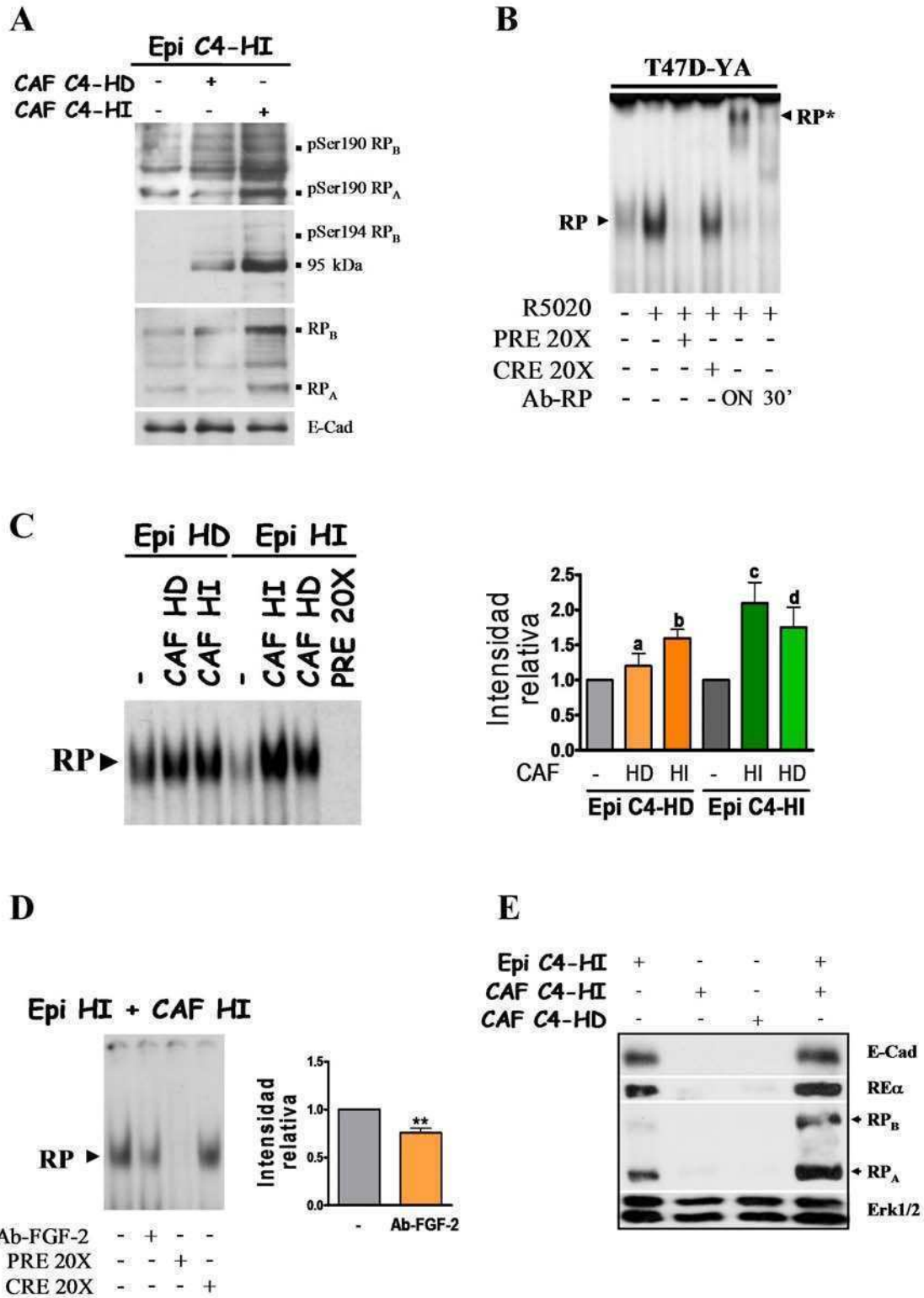


Figura 3.22. Activación del RP mediada por CAFs. *Continúa.*

Figura 3.22. *Continuación.* A) Co-cultivos de Epi C4-HI con CAF C4-HD o CAF C4-HI fueron crecidos hasta confluencia en 10% SFB. Luego de 24 hs en 1% SFBch los cultivos fueron lisados y los extractos proteicos analizados por WB con anticuerpo específicos para RP total, pSer190 RP y pSer294 RP. Los extractos fueron sembrados por igual nivel de expresión de E-Caderina (E-Cad, marcador de células epiteliales). B) Ensayos de EMSA a partir de extractos nucleares de la línea tumoral T47D-YA, que sobreexpresa RP_A. Como controles del ensayo, se utilizó un exceso de PRE frío (no radiactivo), un exceso de un oligonucleótido al cual el RP no es capaz de unirse (CRE), Ab-RP: anticuerpo específico para RP (C-19) utilizado en el ensayo de *super shift* (RP*). ON: 16 hs de incubación. Se cuantificó la intensidad de las bandas y se graficó la relación entre los cultivos mixtos con los cultivos puros, se muestra la Media \pm ES. Análisis estadístico: “t” test de Student, a vs b y c vs d $p < 0.05$. C) Ensayos de EMSA a partir de extractos nucleares de Epi C4-HD y Epi C4-HI solas o co-cultivadas con CAF C4-HD o CAF C4-HI. D) Ensayos de EMSA a partir de extractos nucleares de Epi C4-HI en co-cultivo con CAF C4-HI incubados por 2 hs con un anticuerpo bloqueante para FGF-2 (Ab-FGF-2, 5 $\mu\text{g/ml}$). Se cuantificó la intensidad de las bandas y se graficó la relación entre los cultivos mixtos con los cultivos puros ** $p < 0.01$ “t” test de Student. E) WB de extractos totales a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HI, CAFs C4-HD y C4-HI, y co-cultivos de Epi C4-HI con CAF C4-HI, luego de 24 hs en 1% chSFB. Evaluamos la expresión del RP (C-19), del RE α (MC-20), y de E-Caderina. Erk1/2 fue utilizada como control de carga

Para evaluar la participación del RE α en los efectos proliferativos mediados por los CAFs del estroma tumoral, y por el FGF-2, sobre los cultivos epiteliales, realizamos ensayos de proliferación por incorporación de timidina tritiada en presencia de estrógenos y antiestrógenos. Como vimos previamente, tanto el E2 como el ICI reducen los niveles de expresión del RE α (Figura 3.9), inhiben la proliferación celular inducida por MPA sobre células epiteliales tumorales *in vitro* (Figura 3.10), e inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* (Figura 3.12). Por lo tanto, investigamos sus efectos sobre la proliferación celular inducida por los CAFs y por el FGF-2. Realizamos ensayos de proliferación a partir de co-cultivos entre células epiteliales C4-HD y CAF C4-HD. Como observamos en la Figura 3.23.A, tanto el E2 como el antiestrógeno puro ICI, inhiben la proliferación del co-cultivo. Dado que los CAF C4-HD no expresan receptores hormonales (Figura 3.22.E) ni responden en forma significativa a ningún tratamiento hormonal, ya sea MPA, RU 486, E2 o ICI (Figura 3.23.A), sugerimos que los efectos inhibitorios del E2 o del ICI son efectivos principalmente sobre las células epiteliales. En el mismo ensayo, corroboramos la respuesta al tratamiento hormonal por parte de las células Epi C4-HD al tratarlas con MPA y RU 486.

La proliferación de células epiteliales tumorales inducida por FGF-2, pudo ser inhibida bloqueando al RP. En la Figura 3.23.B, se muestran resultados obtenidos al estudiar los efectos del E2 y del ICI sobre la acción estimuladora del FGF-2 en cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI. Tanto el MPA como el FGF-2 indujeron proliferación celular. Mientras que, 1 nM de E2 y 1 μ M de ICI, fueron capaces de revertir el efecto proliferativo del FGF-2 sobre los cultivos epiteliales en forma similar o aún más que el RU 486. Estos resultados demuestran la importancia del RE α , además del RP, en los efectos estimuladores mediados por el estroma tumoral.

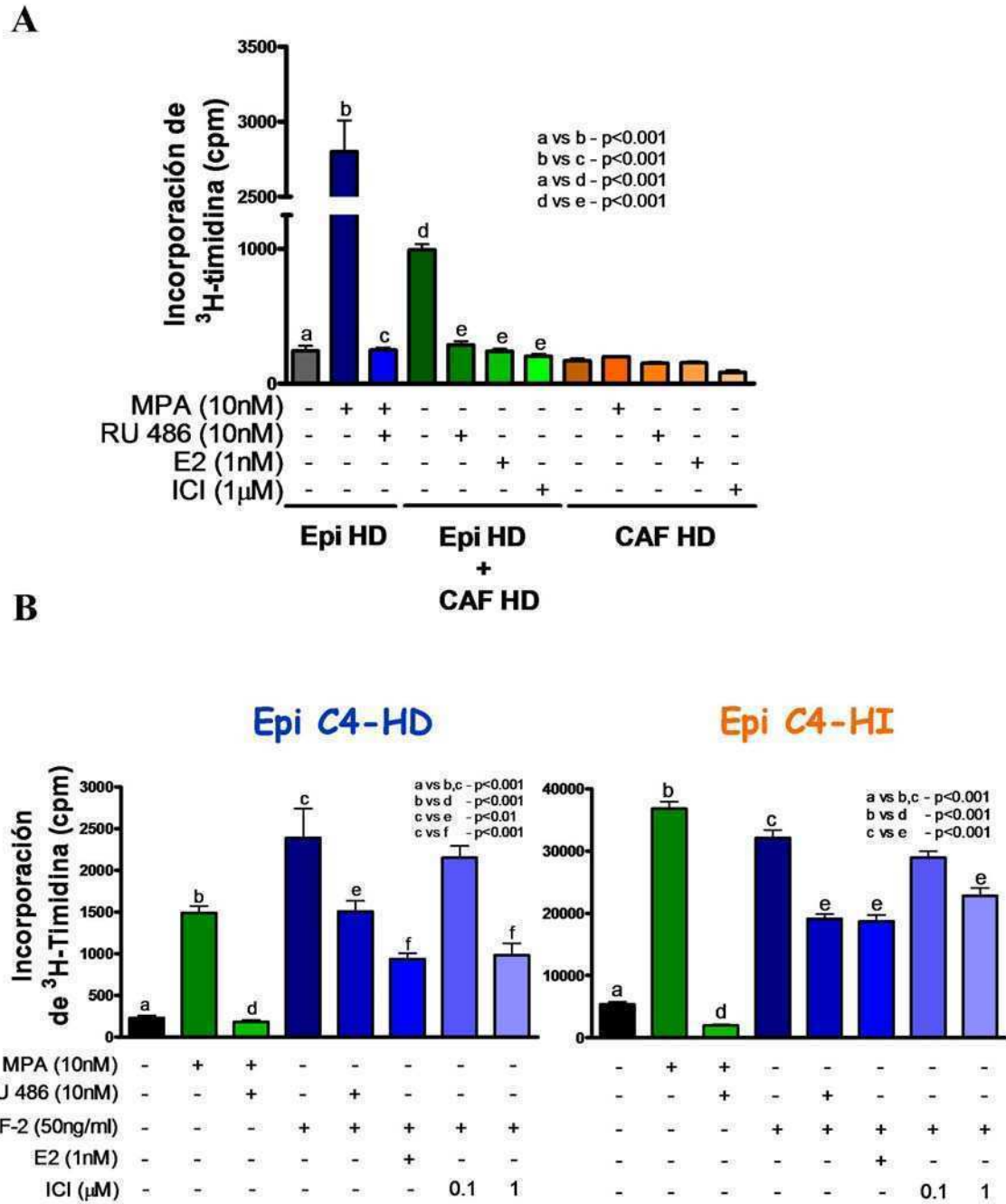


Figura 3.23. Participación del RE α en la estimulación inducida por el estroma tumoral. *Continúa.*

Figura 3.23. *Continuación.* A) Ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada (^3H -timidina). Igual número de células Epi C4-HD y CAF C4-HD fueron sembradas solas o combinadas en 10% SFB en placas de 96 *wells*. Luego del pegado a las mismas, el medio fue reemplazado por 1% SFBch por 24 hs. Los cultivos fueron tratados por 48 hs con MPA (10 nM), RU 486 (10 nM), E2 (1 nM) e ICI (1 μM), y se cuantificó la timidina incorporada como se detalla en Materiales y Métodos. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey. B) Cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI fueron sembradas en placas de 96 *wells* en 10% SFB. El medio fue reemplazado por 1% SFBch por 24 hs. Los cultivos fueron tratados por 48 hs con MPA (10 nM), FGF-2 (50 ng/ml), RU 486 (10 nM), E2 (1 nM) e ICI (0.1 y 1 μM), y se cuantificó la timidina incorporada como se detalla en Materiales y Métodos. Análisis estadístico: ANOVA y *test* de Tukey.

CAPITULO II

I. Patrón de expresión génica correspondiente a tumores creciendo *in vivo*

A. Cambios en el perfil de expresión génica mediado por MPA en tumores C4-HD.

Con el objetivo de identificar genes de importancia en el crecimiento tumoral HD mediado por MPA, obtuvimos diferentes muestras de tumores C4-HD creciendo con MPA (+MPA, n=5), o cuando el progestágeno fue eliminado 48 hs previo al sacrificio de los animales (-MPA, n=4). Comparamos los perfiles de expresión génica en presencia o ausencia de MPA, y utilizando el programa *SAM* (*Significance Analysis of Microarrays*), identificamos 112 genes que presentaron diferencias significativas por el tratamiento (Tabla 3.1). De esos 112 genes, encontramos 104 sobreexpresados y 8 subexpresados en los tumores sin MPA, en comparación a aquellos creciendo con el progestágeno. Es decir, sólo 8 genes se encontraron sobreexpresados en presencia de MPA.

Tabla 3.1. Número de genes con diferencias significativas en su expresión en muestras tumorales, determinado por SAM*

Tumores (comparación)	Número de Genes Significativos			<i>False Significant Number</i> **	<i>FDR (%)</i> ***
	Total	+	-		
C4-HD -MPA vs C4-HD +MPA	112	104	8	5.52	4.9
C4-HI vs C4-HD +MPA	5242	2696	2546	225.6	4.3
C4-HI vs C4-HD -MPA	4534	2024	2510	191.94	4.23

* *Significance Analysis of Microarrays* (Tusher et al., 2001). ** Número de genes del total, que podrían ser significativos por azar. *** *False discovery rate* (porcentaje de genes significativos identificados por azar). +: genes sobreexpresados. -: genes subexpresados.

Luego, utilizamos estos 112 genes para agrupar las muestras experimentales según su patrón de expresión génica (*Hierarchical Clustering Analysis*). El patrón y la longitud de las ramas del dendograma refleja la similitud entre las muestras experimentales. Los resultados obtenidos demuestran que los tumores analizados se agrupan en dos ramas bien

definidas. Por un lado, todos los tumores C4-HD creciendo con MPA, y por otro lado, aquellos a los cuales les fue quitado el progestágeno por 48 hs (*Apéndice* - Figura 7.1).

En la Tabla 3.2 (ver *Apéndice*), se muestran algunos de los genes que presentaron diferencias significativas en su expresión, entre los tumores C4-HD creciendo en presencia del MPA, o cuando sacamos la hormona por 48 hs. Entre los 8 genes sobreexpresados en presencia del MPA, podemos destacar al **FGF-2** (*basic fibroblast growth factor*). Es curioso que lo veamos mayormente expresado en tumores creciendo con MPA, indicando que uno de los mecanismos por los cuales el MPA estimula la proliferación celular, podría ser la síntesis del FGF-2.

Por otro lado, dentro de los genes sobreexpresados en el tumor C4-HD -MPA, encontramos diferentes ejemplos de genes asociados con el arresto del ciclo celular, apoptosis, y mecanismos de remodelación del endotelio vascular. Mecanismos coherentes con la falta de estímulos proliferativos mediados por MPA sobre el tumor C4-HD. Entre estos genes podemos citar a: **Gadd45a** (*growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha*) y **Gadd45g** (*growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma*), **Id2** (*inhibitor of DNA binding 2*) e **Id3** (*inhibitor of DNA binding 3*), **Hif1 α** (*hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*), **Angptl4** (*angiopoietin-like 4*), y **Bcl-2L14** (*Bcl-2-like 14*), entre otros.

Gadd45a y **Gadd45g**, son genes que codifican para una serie de proteínas inducibles por daño en el ADN o señales de estrés y que están implicadas en el arresto del crecimiento celular, reparación del ADN, supervivencia celular, senescencia y apoptosis (Zerbini and Libermann, 2005; Cretu et al., 2009). Se demostró que la expresión de Gadd45a en la carcinogénesis mamaria mediada por Ras, funciona a través de la activación de las vías de señalización de JNK y p38, las cuales contribuyen a un incremento de la apoptosis (Tront et al., 2006).

Id2 e **Id3**, que son miembros de la familia de factores de transcripción bHLH (*basic helix-loop-helix*), carecen del dominio de unión al ADN, y funcionan por interacción con otros factores de transcripción de la misma familia inhibiendo su actividad transcripcional (Zhao et al., 2006). Están implicadas en crecimiento celular, diferenciación y angiogénesis de tejidos embrionales y adultos, como así también en la biología de la glándula mamaria normal y neoplásica (Stighall et al., 2005; de Candia et al., 2004; Sikder et al., 2003).

Hif1 α y **Angptl4**, son otros de los genes identificados en estos tumores, que aparecen en respuesta a estrés por hipoxia (Wang et al., 2008). Hif1 α , codifica para la subunidad *alpha* del factor de transcripción HIF1 el cual funciona bajo condiciones de hipoxia regulando la expresión de genes relacionados al transporte de glucosa, enzimas glucolíticas, factores de crecimiento del endotelio vascular y otros genes implicados en la disponibilidad de oxígeno para facilitar la adaptación a la hipoxia (Poon et al., 2009; Marin-Hernandez et al., 2009). Mientras que Angptl4, es un miembro de la familia de “*angiopoietin-like proteins*”, compuesto por factores pro angiogénicos (Hato et al., 2008; Murata et al., 2009), cuya expresión podría estar regulada por HIF1 (Burkitt et al., 2009). Por otro lado, se ha visto un *crossstalk* entre miembros de la familia de proteínas Id e Hif1 α , en la expresión de VEGF y la angiogénesis tumoral (Kim et al., 2007). **Bcl-2L14**, es un miembro pro apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2 (Guo et al., 2001)

B. Diferencias en el perfil de expresión génica entre tumores C4-HD y C4-HI.

Con el objetivo de identificar genes de importancia en el crecimiento tumoral HI, se obtuvieron diferentes muestras de tumores C4-HI (n=7), las cuales fueron analizadas y comparadas con los perfiles de expresión génica de los tumores C4-HD (en presencia, +MPA, o ausencia de MPA, -MPA). Utilizando la herramienta informática *SAM*, se identificaron 5242 genes con diferencias significativas en su expresión entre tumores C4-HI *versus* tumores C4-HD creciendo con MPA (Tabla 3.1). Mientras que 4534 genes resultaron con diferencias significativas de expresión entre los mismos tumores HI *versus* tumores C4-HD -MPA.

Con las tres listas de genes, luego de cada comparación (Tabla 3.1), que presentaron diferencias significativas en su expresión, se obtuvo una única lista no redundante de 6418 genes. Estos genes luego se utilizaron para agrupar las muestras tumorales de acuerdo a su patrón de expresión génica (*Hierarchical Clustering Analysis*). Todas las muestras de tumores C4-HI se agrupan juntas pero separadas de las muestras HD, lo cual indica la semejanza entre los tumores HI por un lado, y los HD por el otro (*Apéndice – Figura 7.2*). En las Tablas 3.3 y 3.4 (ver *Apéndice*), se muestran algunos de los genes más representativos y que presentaron diferencias más importantes luego de

comparar los perfiles de expresión entre tumores C4-HI *versus* C4-HD +MPA, y C4-HI *versus* C4-HD –MPA respectivamente.

Algunos de los genes más interesantes expresados en los tumores C4-HI y que presentaron mayores diferencias en su expresión con los tumores C4-HD, fueron: **Steap** (*Six transmembrane epithelial antigen of the prostate*), **S100a8** (*S100 calcium binding protein A8*), **Pdgfc** (*Platelet-derived growth factor, C polypeptide*), **Runx2** (*Runt related transcription factor 2*), **Sdf2** (*Stromal cell derived factor 2*), **MMP10**, **MMP13**, **MMP9**, **MMP3** (*Matrix metalloproteinases*), **Angpt2** (*Angiopoietin 2*). Mientras que **Clca3** (*Chloride channel calcium activated 3*), **Calca** (*calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha*), **TF** (*Tissue factor/Coagulation factor III*), **Pten** (*phosphatase and tensin homolog*), **FGF-2**, entre muchos otros genes presentaron alta expresión en tumores C4-HD en comparación a los C4-HI.

Steap, es una proteína de 6 pasos transmembrana que, por su estructura, se pueden predecir funciones de canal o de transporte. Si bien se ha descrito en próstata como antígeno de la superficie celular, se encontró en varios tipos tumorales por lo que resulta atractiva como potencial blanco terapéutico (Alves et al., 2006). Esta sobreexpresada en células de cáncer de mama humano, observándose una regulación positiva por el RP en la línea T47D (Jacobsen et al., 2005), y una regulación negativa por E2 vía el receptor de estrógenos de membrana en la línea MCF-7 (Maia et al., 2008).

S100a8, pertenecen la super familia de proteínas de unión a calcio, y aunque no se conoce exactamente su función, están asociadas a fosforilación de proteínas, regulación del ciclo celular, diferenciación celular, movilidad celular, y contactos célula-célula y célula-matriz (Arai et al., 2008). Por otro lado, la expresión de esta proteína esta asociada al desarrollo y progresión tumoral, indicando una pobre supervivencia en tumores de mama (Arai et al., 2008). Además, esta sobreexpresada en líneas celulares tumorales de mama, resistentes a terapias endocrinas (Sommer et al., 2003).

Pdgfc, es un factor de crecimiento quimioattractante de fibroblastos (Tejada et al., 2006). Se observó que en una línea celular de carcinoma de pulmón los altos niveles de Pdgfa y c correlacionaban con la infiltración fibroblástica del tumor y se proponen terapias dirigidas a inhibir este factor. Recientemente se demostró un aumento de expresión de este factor en *CAFs* provenientes de tumores resistentes al tratamiento con anti-VEGF (Crawford et al., 2009). En células de melanoma B16, se publicó un trabajo muy interesante en el que demuestran que el Pdgfc promueve el crecimiento tumoral vía el

reclutamiento de *CAFs*. A su vez, este factor induce la secreción de FGF-2 de manera parácrina (Anderberg et al., 2009). Por otro lado, en células de músculo liso (SMC) de aorta de rata, se demostró que el FGF-2 induce la expresión del *Pdgfc* (Midgley and Khachigian, 2004).

Runx2, es un factor de transcripción que regula genes relacionados con metástasis óseas (ej. Colagenasa 3 ó MMP13) en cáncer de mama (Selvamurugan et al., 2009; Selvamurugan et al., 2004). En páncreas regula genes relacionados con mitosis y microambiente tumoral como SPARC y MMP1 (Pratap et al., 2006; Kayed et al., 2007), mientras que en glándula mamaria, regula genes específicos como la β -caseína (Shore, 2005). Curiosamente, se ha demostrado que uno de los alelos del FGFR2 está ligado al cáncer de mama esporádico en la mujer (Hunter et al., 2007). El alelo implicado tendría mayor afinidad por el factor de transcripción Runx2 que a su vez es activado por FGF-2 (Kim et al., 2006a).

Sdf2, es una proteína secretoria, aislada a partir de una línea celular estromal murina (Hamada et al., 1996), de la que se desconocen sus funciones. Es expresada por células tumorales de mama, donde elevados niveles de expresión están asociados a una buena sobrevida (Kang et al., 2009), mientras que resultados similares se observaron en cáncer de colon (Vendrell et al., 2007).

Angpt2, es un factor de crecimiento capaz de inducir migración e invasión de células tumorales mamarias MCF-7 *in vivo*, reduciendo los niveles de Caderina E, y aumentando la actividad de Akt (Imanishi et al., 2007).

MMP10, se encontró aumentada en linfomas de células T (Van Themsche et al., 2004) y en cáncer de pulmón (Gill et al., 2004) y riñón (Miyata et al., 2007). La **MMP13** se encuentra aumentada en cáncer de mama y es expresada por el estroma adyacente al tumor (Lafleur et al., 2005). Es secretada por *CAFs* asociados a tumores mamarios y se propone que está involucrada en la transición de un carcinoma ductal *in situ* a un carcinoma ductal invasivo (Nielsen et al., 2007). La **MMP9** se expresa tanto por células epiteliales tumorales como por fibroblastos y su expresión se encuentra asociada a metástasis (Vizoso et al., 2007; Hao et al., 2007). Nosotros hemos demostrado un aumento de la MMP9 en tumores HD en regresión (Simian et al., 2006), resultados luego confirmados por Carnevale *et al* quienes demostraron que MPA inhibe su expresión (Carnevale et al., 2007). La **MMP3** es, de las metaloproteasas, la más conocida y

estudiada. La sobreexpresión de la misma ha sido relacionada con la carcinogénesis mamaria (Sternlicht et al., 1999).

Clca3, pertenece a una familia de proteínas de 4 o 5 pasos transmembrana, que median el transporte de calcio en una variedad de tejidos, incluyendo epitelio, músculo liso y esquelético, y neuronas. La expresión de esta proteína está regulada negativamente por Pg y positivamente por E2 en útero (Jeong et al., 2006).

Calca, es una hormona peptídica involucrada en la homeostasis de calcio (Sexton et al., 1999). Se ha detectado su expresión en líneas humanas de cáncer de mama (Findlay et al., 1981) y en tumores primarios (Gillespie et al., 1997). Más recientemente, se la encontró en mama normal de ratas preñadas pero no en la glándula de la hembra virgen, sugiriendo su regulación por hormonas (Tverberg et al., 2000). Finalmente, se demostró que la expresión de esta proteína esta regulada por Pg, vía el RP, en células epiteliales de la glándula mamaria murina (Santos et al., 2009; Ismail et al., 2004), y en útero (Jeong et al., 2005).

TF, es un componente clave en el proceso de coagulación, y está asociado con metástasis en una amplia variedad de tipos de cáncer. Se demostró que el TF es un gen regulado por progestágenos, vía el RP_B en líneas celulares de cáncer de mama (Richer et al., 2002; Kato et al., 2005).

Pten, es una fosfatasa de proteínas y lípidos, cuyo principal sustrato es el fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), producto de la enzima PI3K. El aumento de PIP3 activa Akt, por lo tanto, Pten es un inhibidor de Akt. La actividad de Pten puede perderse por mutaciones, deleciones, o metilación del promotor, eventos que ocurren con alta frecuencia en muchos tipos de tumores humanos, y que llevan a la activación de la vía de PI3K/Akt (Blanco-Aparicio et al., 2007; Dillon et al., 2007). Por otro lado, en el modelo de carcinogenesis por MPA, vemos alta actividad de Akt en tumores C4-HI en comparación a los C4-HD, lo cual sería coherente con una menor expresión de Pten en estos tumores HI.

FGF-2, lo vemos sobreexpresado en tumores C4-HD +MPA, lo cual parecería inverso a resultados previos del laboratorio que indicaban mayor expresión en CAFs C4-HI que en CAFs C4-HD *in vitro*. Sin embargo, es importante mencionar que los datos del *microarray*, provienen de una población estromal, no de fibroblastos aislados, además de estar creciendo *in vivo* y en presencia del MPA (para el caso del tumor C4-HD).

II. Análisis de los perfiles de expresión génica entre estroma y parénquima tumoral obtenidos de tumores C4-HD y C4-HI.

Para poder analizar diferencias en la expresión génica entre el estroma o el epitelio de tumores HD y HI, aislamos estas diferentes poblaciones celulares mediante la técnica de *Laser Capture Microdissection (LCM)*. Para esto, empleamos 3 muestras de tumores C4-HD creciendo con MPA, y 3 muestras de tumores C4-HI. Cabe destacar, que el estroma tumoral, también denominado microambiente tumoral, se compone de diferentes poblaciones celulares, como por ejemplo: fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, adipocitos, células del sistema inmune, inmersas en la matriz extracelular (Micke and Ostman, 2005). Por lo tanto, este debe ser tenido en cuenta a la hora de analizar los resultados. Los genes más interesantes obtenidos podrían ser expresados por una población celular particular, o varias de ellas en conjunto.

Las muestras estromales y epiteliales se obtuvieron y procesaron según se detalla en Materiales y Métodos. En la Figura 3.24, se muestra para uno de los tumores C4-HI analizados, como fue la elección de las zonas de captura de células epiteliales o estromales por *LCM*. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el resto de las muestras estudiadas.

Para que los resultados del análisis de genes entre el estroma HD *versus* el HI, y entre el epitelio HD *versus* el HI sean más confiables, acotamos el estudio a los 6418 genes que encontramos con diferencias significativas en su expresión luego de comparar los *arrays* para los tumores C4-HD y C4-HI. Posteriormente, buscamos cuántos de estos genes estaban representados en los *arrays* de estroma o epitelio. Encontramos que 6349 y 6375 genes, de los 6418 genes analizados, estaban presentes en las muestras estromales y epiteliales respectivamente. Con estas listas de genes, analizamos cuáles de ellos presentaban diferencias significativas en su expresión entre tumores HD y HI, en cada uno de los compartimentos tumorales analizados. Utilizando la herramienta *SAM*, encontramos 1112 genes cuya expresión resultó significativa, luego de comparar el estroma HI *versus* el HD (Tabla 3.5). De estos 1112 genes, 735 estaban sobreexpresados en el estroma HI, mientras que 377 genes lo estaban en el estroma HD (o lo que es igual, estos 377 genes estaban subexpresados en el estroma HI). El mismo análisis se llevó a cabo para las muestras epiteliales. De los 6375 genes estudiados, 1799 presentaron diferencias significativas en su expresión entre el epitelio HI *versus* el HD. De los cuales 703 genes

III. Resultados

resultaron sobreexpresados en el epitelio HI, en comparación al HD, mientras que 1096 genes lo estaban en el epitelio HD (Tabla 3.5).

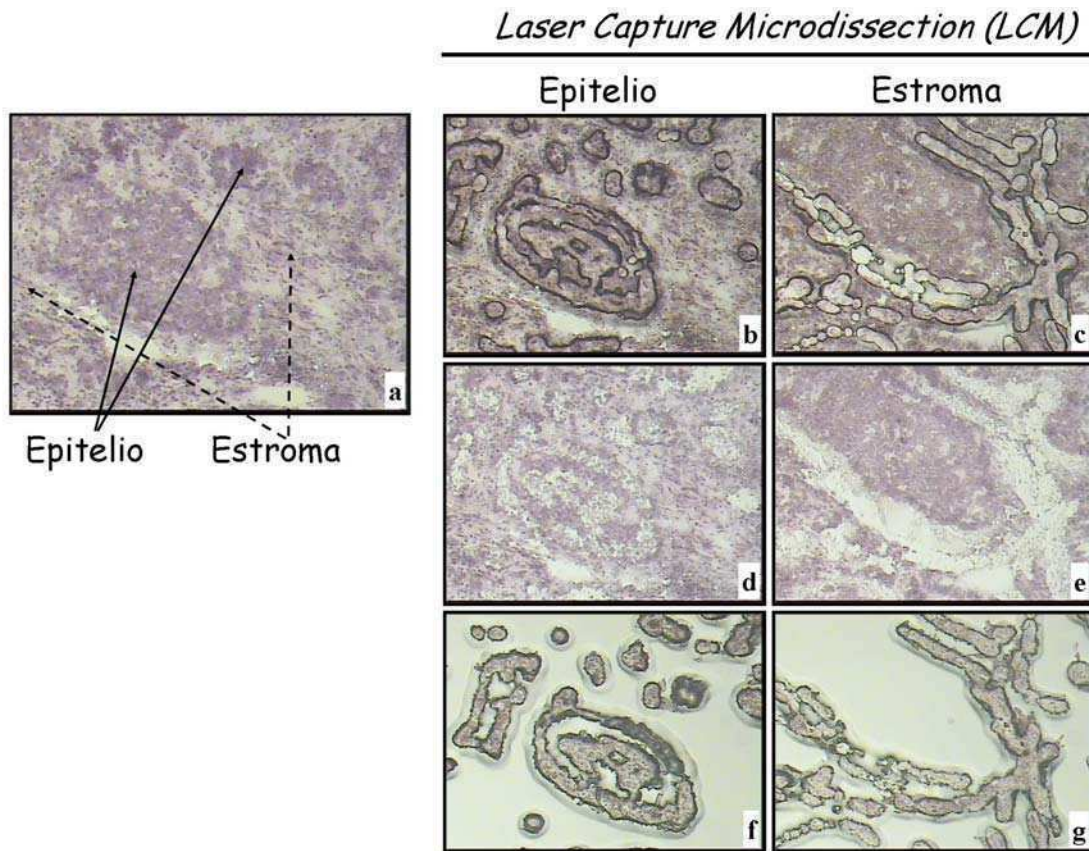


Figura 3.24. Obtención de muestras estromales y epiteliales de tumores C4-HD y C4-HI por LCM. Se muestra en (a), el tumor C4-HI luego de la tinción con H&E y previo a la captura de células. Se indican zonas de estroma y parénquima tumoral. En (b, d, f), se ejemplifica la obtención de tejido epitelial, mientras que en (c, e, g) la obtención de tejido estromal. Indicando en (b y c) las zonas donde se aplicó el láser, en (d y e) cómo quedó el corte luego de la captura, y en (f y g) las células capturadas propiamente dichas. Cabe destacar cómo las zonas del tejido elegidas para la captura de células en (b y c), desaparecen en (d y e), y se muestran aisladas en (f y g).

Tabla 3.5. Número de genes con diferencias significativas en su expresión en muestras epiteliales y estromales obtenidas por LCM* a partir de tumores C4-HD +MPA y C4-HI, determinado por SAM**

Muestras obtenidas por LCM	Número de Genes Significativos			False Significant Number***	FDR (%)****
	Total	+	-		
Estroma HI vs Estroma HD	1112	735	377	53.86	4.84
Epitelio HI vs Epitelio HD	1799	703	1096	80.67	4.48

* Laser Capture Microdissection. **Significance Analysis of Microarray (Tusher et al., 2001). *** Número de genes del total, que podrían ser significativos por azar. **** False discovery rate (porcentaje de genes significativos identificados por azar). +: genes sobreexpresados. -: genes subexpresados.

Posteriormente, comparamos ambas listas de genes. Los 1112 genes significativos en el estroma tumoral con los 1799 genes significativos del epitelio, con el fin de encontrar genes específicamente expresados en el parénquima o en el microambiente tumoral. El resumen de estos resultados se muestra en el esquema de la Figura 3.25. De los genes específicos del estroma tumoral (413), 349 genes estaban sobreexpresados en los tumores HI *versus* los HD, mientras que 64 genes estaban subexpresados en el estroma HI luego de la misma comparación. Por otro lado, analizando aquellos genes específicos del parénquima tumoral (1100), encontramos 320 sobreexpresados en el epitelio HI *versus* el HD, mientras que 780 genes lo estaban en el epitelio HD *versus* el HI.

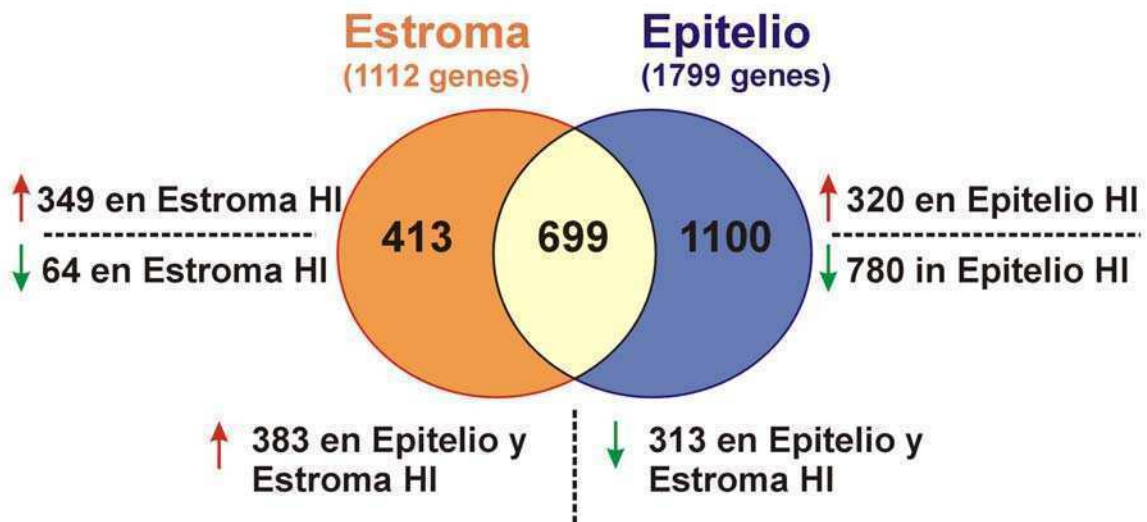


Figura 3.25. Resumen del número de genes específicamente expresados o compartidos entre el estroma y el epitelio tumoral. Los resultados se muestran como diagramas de Venn, y se indican los genes específicos del estroma (413) y del epitelio (1100), y aquellos genes expresados en ambos compartimentos (699). Además, se indican cuántos de estos genes se encontraron sobre (↑) o subexpresados (↓) en tumores C4-HI en comparación a los C4-HD.

En el *Apéndice* de esta tesis, se detallan los genes más importantes específicos de estroma (Tabla 3.6), epitelio (Tabla 3.9), o aquellos compartidos entre ambas poblaciones (Tabla 3.12). Los resultados obtenidos demostraron que tanto las células epiteliales como las estromales de tumores C4-HD y C4-HI, difieren en el patrón de expresión génica (Giulianelli et al., 2008b). Esto se observa claramente cuando agrupamos las muestras utilizando los genes cuya expresión resultó específica de estroma o epitelio (Figura 7.3 –

Apéndice). Algunos de los genes más significativos e interesantes sobreexpresados específicamente en el estroma HI, en comparación al HD, fueron: **MMP13**, **MMP10**, **MMP9**, **MMP3**. Mientras que **Steap**, **Cxcl9**, **Pdgfc**, **Runx2**, **Sdf2**, entre otros, se encontraron sobreexpresados específicamente en la población epitelial HI, en comparación al epitelio HD. Por otro lado, de los genes sobreexpresados en tumores C4-HD, **Calca** y **Pten**, por ejemplo, se encontraron específicamente expresados en el epitelio tumoral. Mientras que **FGF-2** y **Cla3**, se vieron expresados tanto en el epitelio como en el estroma tumoral. Claro esta que son solo algunos ejemplos seleccionados de todos los genes encontrados. Es interesante de notar, como en el análisis previo para los *arrays* de los tumores enteros, estos genes eran ejemplos de genes sobreexpresados en tumores C4-HI o C4-HD. Luego de analizar la expresión génica en estroma o epitelio tumoral, pudimos avanzar en el conocimiento de estos tumores, pudiendo discriminar entre genes específicamente expresados en una u otra población celular.

A. Análisis de los genes específicos del microambiente tumoral.

En la Tabla 3.6 (ver *Apéndice*), se exponen los genes más importantes y con mayores diferencias de expresión entre el estroma tumoral HI *versus* el HD.

Con el fin de identificar el perfil funcional asociados a los genes exclusivos del estroma HI o HD, utilizamos el programa EASE (Hosack et al., 2003). El cual permite hallar los términos ontológicos sobreexpresados estadísticamente, calculando la proporción de genes observados y esperados dentro de una dada categoría ontológica. En las Tablas 3.7.A, B, y C, se muestran las diferentes categorías ontológicas asociadas a Procesos Biológicos (A), Función Molecular (B) y *Pathways* (C), obtenidas luego de analizar los genes exclusivamente expresados por el estroma del tumor C4-HI. Dentro de la categoría ontológica Procesos Biológicos, podemos destacar los términos sobreexpresados: catabolismo del colágeno (*collagen catabolism*, genes: **MMP10**, **MMP9**, **MMP13**, **MMP3**), respuesta a heridas (*response to wounding*, genes: **Cd8a**, **Fcer1g**, **Cybb**, **Il1b**, **Itgb2**, **Il16**, **Ppicap**, **Ptpnc1**, **Tnf**, **Pla2g7**, **Cd244**), quimiotaxis de células inmunes (*immune cell chemotaxis*, genes: **Il1b**, **Itgb2**, **Il16**), extravasación celular (*cellular extravasation*, genes: **Itgb2**, **Tnf**), entre otros. Donde se marca la expresión de genes que se conocen expresados por componentes estromales, como por ejemplo las MMPs, el Tnf, la integrina $\beta 2$, y toda una serie de interleuquinas.

Tabla 3.7.A. Proceso Biológico	List Hits¹	List Total²	Population Hits³	Population Total⁴	Probability⁵
defense response	28	234	553	10658	3,03E-05
immune response	23	234	446	10658	0.00012
response to biotic stimulus	28	234	605	10658	0.00014
collagen catabolism	4	234	15	10658	0.00025
purine nucleotide metabolism	7	234	59	10658	0.00029
response to pest/pathogen/parasite	14	234	247	10658	0.0011
response to wounding	11	234	167	10658	0.0011
thymocyte differentiation	2	234	3	10658	0.0014
immune cell chemotaxis	3	234	13	10658	0.0025
cellular extravasation	2	234	4	10658	0.0028
endosome transport	3	234	17	10658	0.0056
transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	3	234	18	10658	0.0067
cytoplasm organization and biogenesis	18	234	434	10658	0.0072
cell organization and biogenesis	23	234	617	10658	0.009
endosome organization and biogenesis	3	234	20	10658	0.009

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada proceso biológico- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada proceso biológico incluidos en el array- ⁴ Todos los genes anotados para Procesos Biológicos en el array - ⁵ Fisher exact probability.

Tabla 3.7.B. Función Molecular	List Hits¹	List Total²	Population Hits³	Population Total⁴	Probability⁵
collagenase activity	4	230	12	11110	7,77E-05
Rho interactor activity	2	230	2	11110	0.00042
phosphoprotein phosphatase activity	8	230	112	11110	0.00223
small GTPase regulatory/interacting protein activity	9	230	140	11110	0.00250
phosphoric monoester hydrolase activity	9	230	166	11110	0.0076
protein-tyrosine-phosphatase activity	5	230	60	11110	0.0078
hydrolase activity	47	230	1633	11110	0.0106

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada función molecular- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada función molecular incluidos en el array- ⁴ Todos los genes anotados para Función Molecular en el array - ⁵ Fisher exact probability.

Tabla 3.7.C. Pathway	List Hits¹	List Total²	Population Hits³	Population Total⁴	Probability⁵
Matrix Metalloproteinases	6	26	25	1054	1,59E-05
G13 Signaling Pathway	2	26	3	1054	0.0017
Signal Transduction - Mus musculus	5	24	56	1021	0.0079
Phosphatidylinositol signaling system	5	24	56	1021	0.0079
61.Myc_network	2	2	2	12	0.015
N-Glycandegradation - Mus musculus	2	24	10	1021	0.021

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada Pathway- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada Pathway incluidos en el array- ⁴ Todos los genes anotados para Pathway en el array - ⁵ Fisher exact probability.

III. Resultados

Dentro de la categoría Función Molecular, podemos destacar la actividad colagenasa (*collagenase activity*). Mientras que dentro de los *Pathways* mas significativos encontramos nuevamente las metaloproteasas (*Matrix Metalloproteinases*), *G13 Signaling Pathway* asociados a la remodelación de las fibras de actina (**Calm1, Ppp1cb**), *Phosphatidylinositol signaling system*, que tiene que ver con la vía de PI3K/Akt (**Calm2, Ptpn8, Ptprg, Calm1, Ptprc**), entre otros.

En las Tablas 3.8.A y B, se muestra el mismo análisis anterior, pero en este caso para los 64 genes exclusivamente expresados por el estroma HD. Como podemos observar, el análisis no muestra grandes diferencias. Esto probablemente tiene que ver con el hecho de que en ambas situaciones estamos estudiando un estroma que acompaña el crecimiento tumoral, en un caso reclutado espontáneamente por el tumor y en el otro con la ayuda de la hormona.

Tabla 3.8.A. Proceso Biológico	List Hits¹	List Total²	Population Hits³	Population Total⁴	Probability⁵
vitamin E metabolism	1	36	1	10658	0.00337
vesicle-mediated transport	4	36	216	10658	0.00581
positive regulation of neuron differentiation	1	36	2	10658	0.00674
chitin catabolism	1	36	2	10658	0.00674
motor axon guidance	1	36	2	10658	0.00674
polysaccharide metabolism	2	36	40	10658	0.00798
growth	2	36	42	10658	0.00877
purine ribonucleoside diphosphate catabolism	1	36	3	10658	0.01009
retinal programmed cell death	1	36	3	10658	0.010

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada proceso biológico- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada proceso biológico incluidos en el array- ⁴ Todos los genes anotados para Procesos Biológicos en el array - ⁵ Fisher exact probability.

Tabla 3.8.B. Función Molecular	List Hits¹	List Total²	Population Hits³	Population Total⁴	Probability⁵
heparin-glucosamine 3-O-sulfotransferase activity	1	37	1	11110	0.00333
insulin-like growth factor receptor binding	1	37	1	11110	0.00333
ATPase activity), uncoupled	1	37	1	11110	0.00333
proprotein convertase 2 activity	1	37	1	11110	0.00333
growth hormone receptor binding	1	37	1	11110	0.00333
positive transcription elongation factor activity	1	37	1	11110	0.00333
tocopherol binding	1	37	2	11110	0.00664
prolactin receptor binding	1	37	2	11110	0.00664
proprotein convertase activity	1	37	2	11110	0.0066
transcriptional elongation regulator activity	1	37	3	11110	0.0099
MAP-kinase scaffold activity	1	37	3	11110	0.0099

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada función molecular- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada función molecular incluidos en el array- ⁴ Todos los genes anotados para Función Molecular en el array - ⁵ Fisher exact probability.

B. Análisis de los genes específicos del parénquima tumoral.

En la Tabla 3.9 (ver *Apéndice*), se exponen los genes más importantes y con mayores diferencias de expresión entre el parénquima tumoral HI *versus* el HD.

Con el fin de identificar el perfil funcional asociados a los genes exclusivos del epitelio HI o HD, utilizamos el programa EASE, para hallar los términos ontológicos sobreexpresados estadísticamente en ambos epitelios.

En las Tablas 3.10.A, B, y C, se muestran las diferentes categorías ontológicas asociadas a Procesos Biológicos (A), Función Molecular (B) y *Pathways* (C), obtenidas luego de analizar los genes exclusivamente expresados por el epitelio del tumor C4-HI. Dentro de la categoría ontológica Procesos Biológicos, podemos destacar los siguientes términos sobreexpresados: procesamiento de antígenos (*antigen processing*, genes: **H2-Ea, H2-DMb1, Psmb9**), transporte de electrones (*electron transport*, genes: **Slc22a11, Ugdh, Pftk1, Acox1, Ndufb3, Txndc5, Ndufs2, Rufy1, Nnt**), entre otros. Cabe destacar que algunos de estos genes han sido asociados a diversos procesos neoplásico como por ejemplo la *UDP-glucose dehydrogenase* (Ugdh) en cáncer de mama (Huh et al., 2005) y próstata (Huang et al., 2009), o la *acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl* (Acox1), también en tumores mamarios (Dalgin et al., 2007) y regulada por RP_B (Richer et al., 2002). Dentro de la categoría Función Molecular, podemos destacar nuevamente la actividad transportadora de electrones (*electron transporter activity*, genes: **Glud, Ugdh, Prdx2, Zyx, Akr7a5, Ndufb3, Ndufa6, Txndc5, Ndufs2, Rufy1, Nnt**), donde por ejemplo se sabe que la actividad de la enzima *glutamate dehydrogenase* (Glud) está elevada en tumores mamarios (Rzymowska, 1992). Mientras que dentro de los *Pathways* mas significativos encontramos aquellos asociados al metabolismo del glutamato, glucólisis y gluconeogénesis. Es decir, que en el epitelio HI gran parte de los genes encontrados están asociados a procesos metabólicos. No pudiendo asegurar si estos genes participan en el fenotipo HI, o si se trata solo de una consecuencia producida por una mayor tasa de crecimiento.

<i>Tabla 3.10.A. Proceso Biológico</i>	<i>List Hits¹</i>	<i>List Total²</i>	<i>Population Hits³</i>	<i>Population Total⁴</i>	<i>Probability⁵</i>
antigen processing\, exogenous antigen via MHC class II	3	184	9	10658	0.00039
antigen processing	3	184	18	10658	0.0034
antigen presentation	3	184	21	10658	0.0053
icosanoid metabolism	3	184	24	10658	0.0078
organelle organization and biogenesis	13	184	358	10658	0.0091
electron transport	13	184	360	10658	0.0095
prostaglandin metabolism	2	184	10	10658	0.012
aldehyde metabolism	2	184	11	10658	0.014
mitochondrial electron transport\, NADH to ubiquinone	2	184	12	10658	0.017
ATP synthesis coupled electron transport	2	184	14	10658	0.023
G1/S transition of mitotic cell cycle	3	184	36	10658	0.023
protein folding	5	184	96	10658	0.025
protein-disulfide reduction	2	184	16	10658	0.03
transmembrane receptor protein tyrosine kinase activation (dimerization)	1	184	2	10658	0.034

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada proceso biológico- ² Número total de genes significativos en esta comparación-
³ Genes de cada proceso biológico incluidos en el array- ⁴ Todos los genes anotados para Procesos Biológicos en el array - ⁵ Fisher exact probability.

<i>Tabla 3.10.B. Función Molecular</i>	<i>List Hits¹</i>	<i>List Total²</i>	<i>Population Hits³</i>	<i>Population Total⁴</i>	<i>Probability⁵</i>
electron transporter activity	14	192	182	11110	3.13E-06
MHC class II receptor activity	3	192	8	11110	0.00027
oxidoreductase activity\, acting on NADH or NADPH	5	192	49	11110	0.0015
transferase activity\, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	5	192	52	11110	0.0019
NADH dehydrogenase activity	3	192	23	11110	0.0069
solute\;hydrogen antiporter activity	2	192	10	11110	0.012
interleukin-10 binding	1	192	1	11110	0.017
cyclin-dependent protein kinase activity	2	192	13	11110	0.02
transferase activity	30	192	1191	11110	0.021
kinase binding	2	192	17	11110	0.034

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada función molecular- ² Número total de genes significativos en esta comparación-
³ Genes de cada función molecular incluidos en el array- ⁴ Todos los genes anotados para Función Molecular en el array - ⁵ Fisher exact probability.

<i>Tabla 3.10.C. Pathways</i>	<i>List Hits¹</i>	<i>List Total²</i>	<i>Population Hits³</i>	<i>Population Total⁴</i>	<i>Probability⁵</i>
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1	17	1	1021	0.0166
Glutamate Metabolism	1	10	3	1054	0.0282
Nucleotide sugars metabolism	1	17	2	1021	0.033
Translation - Mus musculus	4	17	79	1021	0.036
Glycolysis and Gluconeogenesis	2	10	35	1054	0.04

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada *Pathway*- ² Número total de genes significativos en esta comparación-
³ Genes de cada *Pathway* incluidos en el *array*- ⁴ Todos los genes anotados para *Pathway* en el *array* - ⁵ Fisher exact probability.

En las Tablas 3.11.A, B y C, se muestra el mismo análisis anterior, pero en este caso para los 780 genes exclusivamente expresados por el epitelio HD. Como podemos observar, dentro de la categoría ontológica Procesos Biológicos, podemos destacar los siguientes términos sobreexpresados: ciclo celular (*mitotic cell cycle*, genes: **Smc411**, **Ccnd1**, **Ccne1**, **Smc211**, **Mcm7**, **Pms2**, **Prim1**, **Pten**, **Brca2**, **Top2a**, **Pparbp**, **Incenp**, **Cdk2**, **Rbms1**, **Cables1**, **Cdk5rap3**, **Ube2n**, **Cdc25a**), y la señalización vía el receptor de Wnt (*Wnt receptor signaling pathway*, genes: **Frat1**, **Tcf3**, **Csnk1e**, **Wisp1**, **Fzd2**, **Kremen**, **Ppap2b**, **Tle1**), entre otros. Dentro de estas categorías podemos nombrar algunos genes de interés, como el gen de ciclina D1 (*Ccnd1*) y otros genes del ciclo celular. Sabemos que *Ccnd1* está regulado por progestágenos en líneas celulares de tumores mamarios (Cicatiello et al., 2004), y en células epiteliales de tumores HD y HI en cultivo. Por otro lado, ya nombramos la participación de *Pten* en procesos neoplásicos; cabe destacar a *Brca2* como un gen de susceptibilidad al cáncer de mama (Wooster et al., 1995), y a *Wisp1* como posible supresor tumoral en cáncer de mama (Davies et al., 2007). Dentro de la categoría Función Molecular, podemos destacar la presencia de enzimas relacionadas a la biología del colágeno (*procollagen-lysine 5-dioxygenase activity*, genes: **Plod2**, **Plod3**), proteínas de la familia de las GTPasas Ras (*small monomeric GTPase activity*, genes: **Rab6**, **Rragd**, **Hras1**, **Rac2**, **Kras2**, **Rab2**, **Arl1**, **Rragd**, **Arht2**) ampliamente asociadas al cáncer (Chiaradonna et al., 2008; Vega and Ridley, 2008; Thomas et al., 2008a), y genes relacionados con proteasas de la familia de las carboxipeptidasas (*carboxypeptidase A activity*, genes: **Cpe**, **Agtpbp1**, **Cpn1**; Matsugi et al., 2007).

Mientras que dentro de los *Pathways* más significativos encontramos aquellos asociados a ciclo celular y a la señalización vía Wnt, los cuales ya fueron discutidos previamente.

<i>Tabla 3.11.A. Proceso Biológico</i>	<i>List Hits¹</i>	<i>List Total²</i>	<i>Population Hits³</i>	<i>Population Total⁴</i>	<i>Probability⁵</i>
amino acid derivative metabolism	8	451	53	10658	0.0016
establishment of tissue polarity	2	451	2	10658	0.0017
secondary metabolism	4	451	14	10658	0.0022
mitotic cell cycle	20	451	235	10658	0.0023
protein metabolism	111	451	2058	10658	0.0026
activation of MAPKKK	2	451	3	10658	0.0052
mitotic chromosome condensation	3	451	10	10658	0.0072
mitotic prophase	3	451	10	10658	0.0072
amine metabolism	20	451	264	10658	0.0084
Wnt receptor signaling pathway	8	451	70	10658	0.0091
protein modification	50	451	846	10658	0.0095
amino acid and derivative metabolism	18	451	234	10658	0.0104

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada proceso biológico- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada proceso biológico incluidos en el *array*- ⁴ Todos los genes anotados para Procesos Biológicos en el *array* - ⁵ Fisher exact probability.

<i>Tabla 3.11.B. Función Molecular</i>	<i>List Hits¹</i>	<i>List Total²</i>	<i>Population Hits³</i>	<i>Population Total⁴</i>	<i>Probability⁵</i>
procollagen-lysine 5-dioxygenase activity	3	466	4	11110	0.0002
catalytic activity	199	466	3968	11110	0.0008
oxidoreductase activity), acting on single donors with incorporation of molecular oxygen	6	466	30	11110	0.0013
vitamin binding	5	466	24	11110	0.0027
glycine hydroxymethyltransferase activity	3	466	8	11110	0.0035
small monomeric GTPase activity	12	466	120	11110	0.0044
carboxypeptidase A activity	4	466	19	11110	0.0071
tRNA methyltransferase activity	2	466	4	11110	0.0099
serine-type peptidase activity	14	466	167	11110	0.010
folic acid binding	3	466	13	11110	0.015
epoxide hydrolase activity	2	466	5	11110	0.016
serine-type endopeptidase activity	13	466	159	11110	0.016
RAS small monomeric GTPase activity	4	466	25	11110	0.019

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada función molecular- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada función molecular incluidos en el *array*- ⁴ Todos los genes anotados para *Función Molecular* en el *array* - ⁵ Fisher exact probability.

<i>Tabla 3.11.C. Pathways</i>	<i>List Hits¹</i>	<i>List Total²</i>	<i>Population Hits³</i>	<i>Population Total⁴</i>	<i>Probability⁵</i>
Cell Cycle	7	41	72	1054	0.017
Wnt Signaling	6	41	57	1054	0.019
Krebs-TCA Cycle	3	41	17	1054	0.025

¹ Número de genes obtenidos que caen en cada *Pathway*- ² Número total de genes significativos en esta comparación- ³ Genes de cada *Pathway* incluidos en el *array*- ⁴ Todos los genes anotados para *Pathway* en el *array* - ⁵ Fisher exact probability.

C. Validación de los resultados obtenidos en los ensayos de *microarrays* de ADN.

Utilizamos ensayos de IHQ e IF para validar los resultados obtenidos en los *microarrays*. De esta manera, podemos evaluar en el mismo ensayo la expresión proteica, en estroma y epitelio tumoral, de genes seleccionados. Elegimos estudiar la expresión del Pdgfc, Runx2, TF, MMP13 y MMP9. La selección de estos genes se basó en que el Pdgfc y el Runx2 resultaron sobreexpresados en el epitelio de tumores C4-HI, mientras que las MMP9 y MMP13, aparecieron en el estroma de los mismos tumores. Como dijimos antes, existiría una interacción funcional entre el Pdgfc y el Runx2, con el FGF-2. Por lo tanto resultó interesante evaluar en una primera instancia la expresión de estas proteínas en los tumores en estudio. Por otro lado, elegimos investigar la expresión protéica del TF, dado que apareció más expresado en los tumores C4-HD y se sabe esta regulado por progestágenos. En la Figura 3.26.A, se muestran los resultados de los *microarrays* para el Pdgfc, Runx2 y TF, en los tumores enteros y en las muestras epiteliales. Como vemos, todos los tumores C4-HI presentaron una elevada expresión del Pdgfc y del Runx2 (en rojo), en comparación a los tumores C4-HD (en verde). Y lo mismo fue observado en las muestras epiteliales obtenidas por LCM. Mientras que la expresión del TF, resultó opuesta. Más elevada en los tumores C4-HD que en los C4-HI. Sin embargo, este gen no fue detectado en los *microarrays* de las muestras epiteliales aisladas. Estos resultados fueron corroborados por IHQ con anticuerpos específicos para las proteínas analizadas, y se muestran en la Figura 3.26.B. Podemos observar una mayor marcación para Pdgfc y Runx2 en los tumores C4-HI respecto a los HD, y esta marcación es principalmente epitelial. Mientras que para el TF, la marcación se observa mas intensa en los tumores C4-HD, y disminuye en ausencia del MPA, validando así los resultados obtenidos.

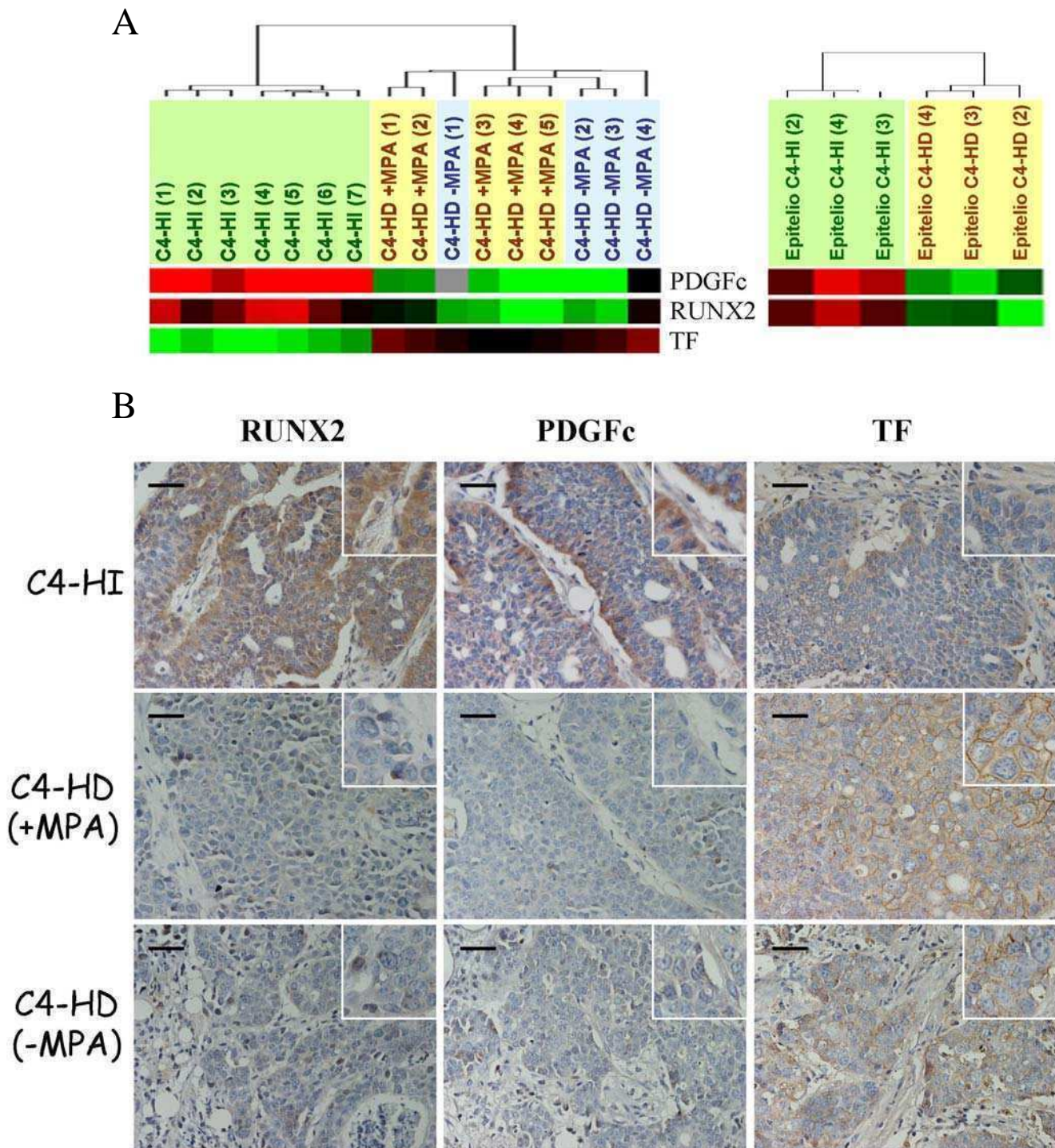


Figura 3.26. Validación de genes sobreexpresados en tumores C4-HI y C4-HD por IHQ. A) Datos obtenidos de los *microarrays* luego de comparar los perfiles de expresión génica entre tumores C4-HI *versus* C4-HD (*izquierda*), y Epitelio C4-HI *versus* C4-HD (*derecha*), para Pdgfc, Runx2 y TF. Cada columna representa una muestra experimental, las filas representan los genes que se obtuvieron luego del análisis, y cada celda refleja la mediana centrada de la intensidad de fluorescencia ($\log_2 \text{Cy5/Cy3}$) del gen correspondiente en el *array* apropiado. La intensidad de cada celda, representa la expresión relativa de cada gen en cada muestra experimental. Celdas en negro: genes que no cambian respecto a la mediana, celdas en rojo: genes positivamente expresados, celdas en verde: genes negativamente expresados, celdas en gris: datos perdidos para ese gen. B) Ensayos de IHQ sobre cortes en parafina de tumores C4-HI, C4-HD +MPA y C4-HD -MPA, para evaluar la expresión de Pdgfc, Runx2, y TF. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina. Barra: 50 μm .

Por otro lado, evaluamos la expresión de las MMPs dado que presentaron una expresión específica en el estroma tumoral. En la Figura 3.27.A, se muestra una porción de los *microarrays*, exclusivamente indicando los resultados para la MMP13 y MMP9. Como vemos, ambas MMPs son altamente expresadas en los tumores HI respecto a los HD, en particular en el estroma HI respecto al HD. Evaluamos por IF la expresión de estas proteínas en los mismos tumores, y los resultados se muestran en la Figura 3.27.B. Allí podemos apreciar una marcación principalmente estromal y con claras diferencias entre ambos tumores, siendo ambas MMPs mayormente expresados en los tumores C4-HI.

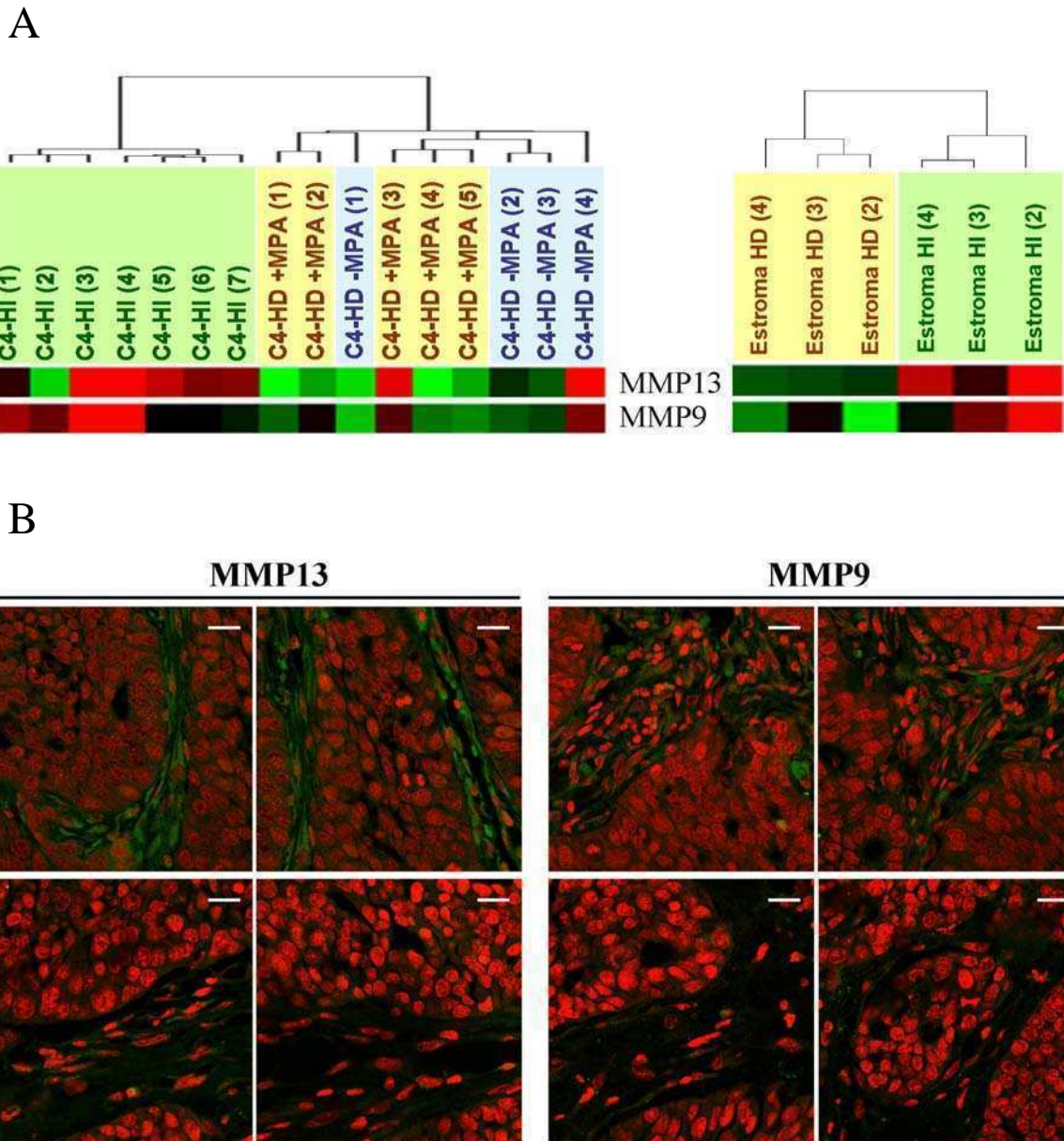


Figura 3.27. Validación de genes sobreexpresados en tumores C4-HI por IF. A) Datos obtenidos de los *microarrays* luego de comparar los perfiles de expresión génica entre tumores C4-HI *versus* C4-HD (*izquierda*), y estroma C4-HI *versus* C4-HD (*derecha*), para MMP13 y MMP9. Cada columna representa una muestra experimental, las filas representan los genes que se obtuvieron luego del análisis, y cada celda refleja la mediana centrada de la intensidad de fluorescencia ($\log_2 \text{Cy5/Cy3}$) del gen correspondiente en el *microarray* apropiado. La intensidad de cada celda, representa la expresión relativa de cada gen en cada muestra experimental. Celdas en negro: genes que no cambian respecto a la mediana, celdas en rojo: genes positivamente expresados, celdas en verde: genes negativamente expresados, celdas en gris: datos perdidos para ese gen. B) Ensayos de IF sobre cortes en parafina de tumores C4-HI y C4-HD +MPA, para evaluar la expresión de MMP13 y MMP9 (en verde). Los núcleos se tiñeron con yoduro de potasio (en rojo). Barra: 30 μm .

PARTE I V

DI SCUSI ÓN

Capítulo I

Fosforilación y activación del RE α

La dependencia por el MPA en el crecimiento *in vivo* del tumor C4-HD resulta evidente cuando quitamos la hormona, una vez establecido el tumor. En estas condiciones se observó una regresión tumoral, acompañada de apoptosis de células epiteliales, un incremento del estroma y de la actividad de metaloproteasas, y remodelación de la matriz extracelular. Eventos que alcanzan su pico entre las 48 y 72 hs en ausencia del MPA (Simian et al., 2006). Cuando analizamos la expresión del RE α y del RP, observamos que luego de 48 hs en ausencia de la hormona, hay un aumento en los niveles del RP y una disminución en los niveles del RE α , en comparación al tumor creciendo con MPA, y esto fue concordante con lo reportado en trabajos previos (Actis et al., 1994; Actis et al., 1995; Helguero et al., 2003). Es posible que dicha disminución en la expresión del RE α observada por técnicas de unión al ligando o WB, se deba a una reducción en el número de células epiteliales tumorales, conjuntamente con un aumento del estroma, debido a la regresión tumoral. Sin embargo, en este trabajo analizamos la expresión del RE α por IHQ, técnica por la cual podemos cuantificar el número de células positivas para el receptor, en función del número de células epiteliales tumorales totales, demostrando así que el tratamiento con MPA efectivamente aumenta la expresión del RE α en células epiteliales.

La regulación del gen del RE α es muy compleja, dado que posee múltiples promotores y secuencias regulatorias tanto en humanos como en ratones. Entre 7 y 6 secuencias promotoras se han descripto para este gen en ambas especies, las cuales pueden actuar de manera tejida específica y son capaces de generar el RE α clásico de 66 kDa (Kos et al., 2000; Kos et al., 2001). En la glándula mamaria normal de ratón, se observó que el MPA reduce los niveles de expresión del RE α (Montero et al., 2007). Resultados similares se observaron con Pg en útero (Okulicz et al., 1981), y con E2 y R5020 en células T47D y MCF-7 (Berkenstam et al., 1989; Martín et al., 1993; Savoldi et al., 1995). El *loop* E2 induciendo RP, y progestágenos induciendo una disminución del RE, podría tener un sentido fisiológico en las células normales de la glándula mamaria. Los cambios asociados a la transformación maligna en este modelo, podrían estar asociados a una desregulación en la expresión del RP que lo mantiene alto, independientemente de la

regulación por E2 y por el RE α . En el tumor C4-HI podríamos llegar a pensar que el RP está alto porque el RE α está activado. Sin embargo, el hecho de que en el tumor C4-HD vemos expresión del RP en ausencia de MPA y de E2, implicaría una expresión constitutiva del RP, que por sí sola no sería estimuladora. En presencia del MPA, esta se uniría y activaría al RP basal, lo cual redundaría en la estimulación de vías de señalización no genómicas, como Akt y MAPK (Carnevale et al., 2007; Bottino et al., 2009), y de vías genómicas induciendo la expresión del RE α (que podría a su vez ser activado por Akt y MAPK), y otros genes del ciclo celular induciendo así el crecimiento tumoral.

A su vez, la unión del MPA al RP, además de inducir un aumento en el RE α , induce una reducción en los niveles del RP, probablemente por degradación vía el proteosoma (Lange et al., 2000). No sabemos si el aumento en el RE α es por un mecanismo directo del RP sobre el promotor del gen, o a través de un mecanismo independiente. La expresión del RE α puede ser regulada por E2, y aunque en general está asociada a una reducción en los niveles del receptor, se vió que en células estromales del útero de rata, o en células del hígado, el E2 regula positivamente su gen (Nephew et al., 2000). En ausencia del MPA, observamos niveles basales de expresión del RE α en tumores C4-HD. Es posible que estos pocos receptores sean suficientes para ser activados por MPA y regular positivamente la expresión del gen. Lo cierto es que el MPA induce la fosforilación del RE α tanto *in vivo* como *in vitro*, e incrementa la capacidad del RE α de unirse al ERE, en tumores C4-HD. La activación del RE α se daría de forma ligando independiente, no creemos que sea por unión del MPA, ni tampoco por bajas concentraciones de E2, que podrían existir *in vivo*, dado que el E2 es inhibitorio, en este modelo, aún en concentraciones de 1 pM (Lamb et al., 2003). Por otra parte, el MPA también estimula el crecimiento del tumor C4-HD en hembras ovariectomizadas (Kordon et al., 1990).

Recientemente se describió que la sobreexpresión del RP_B en ausencia de ligando, recluta corepresores al promotor del RE α , a un sitio medio-PRE, reduciendo la expresión del RE α e inhibiendo la acción estimuladora del E2 en células T47D y MCF-7 (De Amicis et al., 2009). Sin embargo, en este conjunto de experimentos, los autores no ven proliferación de las células T47D por Pg, un resultado opuesto al publicado por otros autores (Labriola et al., 2003; McGowan et al., 2007), sino más bien, ven que la Pg inhibe la proliferación mediada por E2. A partir de estos resultados, en principio contradictorios a

los nuestros, podemos decir que se dan en un contexto de sobreexpresión del RP_B , y en ausencia de ligando. Está descrito que el RP_B presenta mayor actividad transcripcional que el RP_A , dependiendo del modelo, de la expresión de corepresores y coactivadores de los receptores nucleares, y de la presencia o no de la hormona, lo que sugiere una gran complejidad en los mecanismos regulatorios. Es interesante resaltar, que en algunos tumores de nuestro modelo experimental en los cuales hay sobreexpresión del RP_B con respecto al RP_A , el MPA también es inhibitorio (estudios en curso) sugiriendo que el progestágeno podría tener efectos proliferativos o inhibitorios según la sobreexpresión de la isoforma A o B del RP. El modelo utilizado en este trabajo, presenta mayor expresión de RP_A que de RP_B , y los mecanismos por los cuales el PR regularía la expresión del $RE\alpha$ no han sido investigados.

En el tumor C4-HI, el tratamiento con MPA no modifica el crecimiento del mismo, ni altera los niveles de expresión del $RE\alpha$, pero sí produce una disminución en el RP (Helguero et al., 2003). Los resultados obtenidos en esta tesis, indican que el $RE\alpha$ estaría basalmente fosforilado tanto *in vivo* como *in vitro*, y con una alta capacidad de asociarse al ERE. Se ha reportado que el $RE\alpha$ puede ser activado de forma ligando independiente, ya sea directamente por moléculas no relacionadas al receptor como prolactina, leptina, heregulina $\beta 1$, IGF-I, que activando vías de señalización intracelular, inducen fosforilación del $RE\alpha$ en células tumorales de mama (Gonzalez et al., 2009; Catalano et al., 2004; Stoica et al., 2003) o en células epiteliales del útero (Klotz et al., 2002); o a través de la activación de receptores tirosina quinasa en procesos de resistencia a la terapia endócrina (Campbell et al., 2001; Normanno et al., 2005; Osipo et al., 2007). Es posible que la sobreexpresión de algunos de estos factores, como la heregulina y el IGF-II, que sabemos están expresados en estos tumores, participen de este proceso.

Participación del $RE\alpha$ en la expresión del RP

Ya se discutió anteriormente la capacidad del $RE\alpha$ unido a su ligando, de regular la expresión del RP en diferentes modelos animales y celulares. Resultados previos de nuestro laboratorio indicaban que el $RE\alpha$ jugaría un rol importante en el crecimiento tumoral en este modelo de carcinomas mamarios. Es por esto que nos preguntamos si su importancia radicaba, por un lado, en la regulación de la expresión del RP, clave en este

modelo. Resultados anteriores de nuestro grupo, indicaban un aumento en la expresión del RP luego de 72 hs de incubación con E2 en cultivos primarios de células epiteliales C4-HD, medido por ensayos de unión a ligando (Lamb et al., 2003). La misma regulación fue observada en células epiteliales C4-HI en ensayos de WB (Soldati et al., 2009).

El antiestrógeno puro ICI, carece de actividad agonista sobre RE α y sobre el RE β , tiene la capacidad de unirse al RE α con un 10% menos de afinidad que el E2, y con una afinidad 100 veces mayor que el tamoxifeno, inhibe la acción transcripcional del RE α e induce su degradación vía la maquinaria del proteosoma, mientras que estabiliza los niveles del RE β (Marsaud et al., 2003; Piccart et al., 2003; Robertson, 2007; Robertson, 2001; Wakeling et al., 1991; Peekhaus et al., 2004). Cuando utilizamos este compuesto sobre ambos cultivos primarios, observamos una reducción significativa en la expresión del RE α , mientras que el RP no se vio afectado en los tiempos analizados. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se demostró que el ICI reduce los niveles del RP en células epiteliales C4-HD luego de 72 hs de tratamiento, medido por la técnica de unión a ligando (Lamb et al., 2003). Es probable que las diferencias se deban a los tiempos de incubación utilizados. Será necesario repetir los ensayos de WB a tiempos posteriores de 24 hs para corroborar estos resultados. Lo importante es que los ensayos que se hicieron de proliferación celular, se hicieron en tiempos en que el RP todavía está alto.

La posibilidad que el RE β esté participando en la regulación de la expresión del RP luego del tratamiento con ICI, no puede ser descartada. Sin embargo, no se ha visto expresión del RP en la glándula mamaria de ratones RE α KO, ni siquiera por tratamiento con E2, sugiriendo que el RE β no cumpliría un rol importante en este proceso (Bocchinfuso and Korach, 1997). En cambio, en el útero, el tratamiento con E2 induce la expresión del RP en células estromales vía el RE β (Kurita et al., 2001). No hemos encontrados datos bibliográficos relacionando al RE β con la regulación de RP en cáncer de mama.

Por otro lado, cuando utilizamos la estrategia de inhibir la expresión del RE α con un *siRNA* contra el *mRNA* del receptor, vimos una reducción (de entre un 40-60%) significativa en los niveles de expresión del RE α en ambos cultivos primarios. Este grado de reducción en el RE α por un *siRNA*, ya fue reportado en otros trabajos, afectando la respuesta biológica del RE α en células MCF-7 (Wickramasinghe et al., 2009; Zhang et al., 2005). Asimismo, experimentos de la Dra Caroline Lamb en su tesis doctoral, utilizando

un oligonucleótido antisentido para el RE α , obtuvo una reducción del orden del 60% en los niveles de expresión del RE α (medido por la técnica de unión a ligando). Esta reducción en la expresión del receptor, fue suficiente para inhibir la proliferación celular mediada por MPA en células epiteliales C4-HD. En cuanto al RP, si bien observamos una leve pero estadísticamente significativa reducción en la expresión del receptor (entre un 10-20%), dicha disminución no justificaría la inhibición de crecimiento celular inducida por el *siRNA*.

En definitiva, estos resultados indican que la expresión del RP en este modelo, estaría regulada sólo parcialmente por el RE α . El tratamiento con E2 puede aumentar aún más los niveles del RP, indicando que podría haber un *pool* de receptores basalmente expresados y otro inducible por el RE α . Dado que cuando el RE α está ausente o bloqueado con un antagonista, se observa sólo una pequeña disminución en los niveles de expresión del RP, nos hace suponer que existirían otros mecanismos de regulación en la expresión de este receptor.

Rol del RE α en la proliferación celular mediada por MPA

La participación del RP en la proliferación celular en este modelo de tumores mamarios resulta evidente de investigaciones previas de nuestro laboratorio. En este trabajo demostramos la necesidad de un RE α presente y no unido a ligando en la proliferación celular inducida por MPA sobre células epiteliales derivadas de tumores C4-HD y C4-HI *in vitro*.

Demostramos que el ICI en concentraciones micromolares inhibe completamente la proliferación celular mediada por MPA en cultivos primarios de tumores C4-HD y C4-HI. Cabe recordar que en cultivo, ambos tumores tienen el mismo requerimiento de MPA para proliferar. Por otra parte, mientras que las células epiteliales C4-HD se inhiben completamente con 0.5 μ M de ICI, hace falta el doble de moléculas del antiestrógeno para lograr el mismo efecto en células epiteliales C4-HI (1 μ M), indicando una mayor sensibilidad de las células C4-HD. Incluso, ya fue demostrado por nuestro grupo que concentraciones de 10 nM de ICI, son capaces de inhibir la proliferación dependiente de MPA sobre células epiteliales C4-HD (Lamb et al., 2003). Todo esto indica la especificidad del efecto inhibitorio sobre el RE.

Se sugirió que el ICI tendría además actividad antiprogestacional actuando como un antagonista débil del RP. Estos efectos se observaron utilizando dosis $\geq 1 \mu\text{M}$ de ICI sobre líneas celulares de cáncer de mama humano BT-474, que responden a E2 y progestágenos (Rosenberg Zand et al., 2000), y en células Hela sobreexpresando el RP_B (Nawaz et al., 1999). Sin embargo, los autores no fueron capaces de demostrar pegado directo del ICI al RP (Hyder and Stancel, 2002), indicando que éste podría unirse al $\text{RE}\alpha$ (celulas BT-474) o a proteínas relacionadas (celulas Hela), y suprimir las funciones del RP directamente vía un *crosstalk*, o reduciendo los niveles del RP de forma indirecta por una inactivación del $\text{RE}\alpha$.

La capacidad del ICI de bloquear la acción del E2 sobre genes blanco es máxima en concentraciones mayores o iguales a $0.1 \mu\text{M}$ en células de cáncer de mama humano (Rosenberg Zand et al., 2000). Además, las mismas dosis fueron utilizadas para inhibir la proliferación inducida por E2 en células MCF-7 (Shaw et al., 2006).

Teniendo en cuenta estas evidencias, y dado que se obtuvieron inhibiciones con concentraciones menores a $1 \mu\text{M}$ de ICI, sobre cultivos que expresan mayores niveles de RP_A que de RP_B (Helguero et al., 2003), sumado a la rápida respuesta del $\text{RE}\alpha$ a su antihormona (rápida degradación), resulta poco probable la acción del ICI como antagonista del RP en la proliferación inducida por MPA en cultivos epiteliales C4-HD o C4-HI.

El grupo de S. Hyder, describió además que el ICI tendría actividad agonista del RP en condiciones de alta expresión del RP_B . Algo similar a lo que pasa con el antiprogestágeno RU 486 (Meyer et al., 1990; Tung et al., 1993). Demostraron que el ICI aumenta la expresión del VEGF (al igual que los progestágenos) en células tumorales de mama humana que sobreexpresan RP_B , y en las cuales el $\text{RE}\alpha$ no se ve afectado por su antihormona (T47D-YB). Además, el ICI es capaz de inducir activación de MAPK y Akt, en las mismas células, a diferencia de su acción en células que expresan niveles similares de RP_A - RP_B (T47D), o en las que sobreexpresan RP_A (T47D-YA), o en las negativas para el RP (T47D-Y). Estos datos sugirieron que la expresión del VEGF sería a través de un RP_B activado por señales no genómicas inducidas por el ICI, favoreciendo el desarrollo tumoral (Wu et al., 2005). Un resultado muy importante en la clínica, dado que un paciente con un tumor mamario que presente alta expresión del RP_B , podría beneficiarse con terapias antihormonales y antiangiogénicas, pero no sería candidato al tratamiento con Fulvestrant.

Los ensayos de proliferación por incorporación de ^3H -timidina, fueron corroborados por recuento de células. Cuando evaluamos proliferación celular con la técnica de BrDU, vimos inhibición por tratamiento con 1 μM de ICI. Cabe destacar, que este ensayo se realizó durante 6 hs de incubación con las hormonas, un tiempo en el cual no hubo disminución del RP, y no detectamos RE α por WB. Por lo tanto, demostramos que la inhibición en la proliferación celular mediada por el ICI, no se debió a una ausencia de expresión del RP, sugiriendo fuertemente, la necesidad de un RE α libre en la respuesta proliferativa mediada por MPA.

Rol del RE α en el crecimiento tumoral *in vivo*

La administración del ICI afecta a la glándula mamaria normal. En ratas, diferentes dosis de ICI (1-2 mg/kg), produjeron una reducción en el tamaño de las estructuras lobulares de la mama, y un aumento en la apoptosis de las células epiteliales. Esto se vió sustentado por el consecuente aumento de proteínas proapoptóticas como Bax y Bad, y una reducción en las antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xl (Lim et al., 2001).

Luego de corroborar el efecto inhibitorio del ICI *in vitro*, pasamos a un ensayo *in vivo*, con tumores C4-HD creciendo con MPA y tumores C4-HI. Utilizamos una dosis de ICI de 5 mg por semana, durante 4-5 semanas, basados en el trabajo de Osborne y col, quienes demostraron que esta dosis resultó inhibitoria del crecimiento de tumores establecidos con la línea celular MCF-7, dependiente de E2, en ratones *nude* (Osborne et al., 1995).

El tumor C4-HD, creciendo con MPA, regresionó completamente a causa del tratamiento con el ICI, de forma similar al efecto ya registrado con E2 y con antiprogéstágenos. El efecto del antiestrógeno sobre el tumor C4-HI, fue por otra parte, menos marcado induciendo una inhibición en el crecimiento tumoral. Si bien esta inhibición resultó significativa, fue menos eficiente que los tratamientos con E2 y RU 486. Estos resultados *in vivo*, fueron coherentes con los obtenidos *in vitro*, en cuanto a que el tumor C4-HI es menos sensible al tratamiento con ICI que la variante tumoral C4-HD.

Sabemos que en ambos tumores la expresión del RE α y del RE β es muy similar (Tesis doctoral Dra. Luisa Helguero), por lo tanto no sería ésta la causa de las diferencias en la respuesta al ICI. Demostramos que en las células epiteliales C4-HI el RE α está

constitutivamente fosforilado, *in vivo* e *in vitro*, y unido al ADN, mientras que en las células C4-HD, es necesario el estímulo con MPA para tener este efecto. Nuestra hipótesis es que el ICI tiene gran afinidad por su receptor, evita su actividad transcripcional y lo lleva a degradación, por lo tanto, aunque el RP pueda activarse por MPA, en ausencia del RE α no hay activación de la proliferación celular en tumores C4-HD.

En células epiteliales C4-HI *in vitro*, el RE α estaría activado constitutivamente por mecanismos ligando independiente, por lo tanto, estaría asociado a la cromatina o con la capacidad de interactuar con ésta, de forma basal. Dado que estas células aún necesitan de un estímulo proliferativo *in vitro*, cuando este estímulo está presente se suma a un RE α ya activo (a diferencia del HD donde el MPA debe activar al RE α y al RP), dando como resultado un efecto proliferativo superior y más difícil de ser contrarrestado por el ICI. *In vivo*, el estroma C4-HI es más activo, y envía múltiples señales de proliferación que activan al RP y por lo tanto, pueden ser contrarrestadas rápidamente por un antiprogéstágeno. Por otro lado, dado que la acción del ICI sobre este tumor es menos efectiva que la del RU 486 o la del E2 propiamente dicho, se podría especular que en el tumor C4-HI, la ausencia del RE α por el tratamiento, no sería tan importante como en el tumor C4-HD. La otra opción, es que se necesite una dosis de ICI más grande para inducir la degradación del RE α e inhibir el crecimiento tumoral por completo. Teniendo en cuenta que *in vitro*, se logró una inhibición completa con concentraciones más altas de ICI, esta última parece ser la hipótesis más plausible.

Nos resta conocer que sucede con los RE α y los RP *in vivo*, en los tumores C4-HD y C4-HI tratados con el ICI. Está descrito en tumores de mama humanos, positivos para la expresión de receptores hormonales, que el tratamiento con altas dosis de ICI *in vivo* (125-250 mg), no sólo reduce los niveles de expresión de RE α , sino que también, se observa una reducción significativa en la expresión del RP y en ciertos parámetros de proliferación celular, como es la medición del antígeno Ki67 (Robertson et al., 2001).

Es interesante destacar que ambos tumores o cultivos primarios son inhibidos completamente por E2. En este caso podemos decir que el E2 unido a su receptor, desencadenaría señales apoptóticas que llevan a la regresión tumoral en un mecanismo que prevalece sobre la estimulación mediada por MPA en el tumor C4-HD, o sobre el crecimiento autónomo en el tumor C4-HI (Soldati et al., 2009). Este fenómeno también va

acompañado por una regulación negativa del RE α , apoyando también la hipótesis de que se necesitan ambos, el RP y el RE α para tener un estímulo proliferativo. El efecto inhibitorio de los estrógenos, como ya se mencionó anteriormente, ha sido aprovechado para el tratamiento del cáncer de mama.

Interacción entre el RP y el RE α

La inducción de la proliferación celular en respuesta a MPA, fue inhibida con varios antagonistas del RP y oligonucleótidos antisentido para el RP (Lamb et al., 2005), indicando que estas respuestas están mediadas por el receptor clásico de Pg.

Tanto los estrógenos, como el antagonista del RE α , ICI, bloquean el efecto del MPA sobre la proliferación celular, indicando que el estímulo proliferativo mediado por el progestágeno a través del RP clásico, requiere del RE α libre de ligando. De manera similar, se ha reportado una inhibición por ICI en la proliferación celular mediada por progestágenos en células T47D, y en células estromales de útero de rata UIII, implicando el RE α y al RE β en cada caso respectivamente (Migliaccio et al., 1998; Vallejo et al., 2005). Estos resultados sugieren una interacción entre el RP y el RE en la proliferación celular inducida por progestágenos. Como mencionamos en la Introducción de esta tesis, está descrita una interacción a nivel citoplasmático, como mecanismo de activación de vías de señalización intracelular por progestágenos. Mecanismo que puede ser inhibido por antiprogestágenos y antiestrógenos. Algo interesante de mencionar en este punto, es que en estos trabajos se utilizaron concentraciones elevadas de ICI, del orden de 10 μ M, mucho mayores a las descritas para inhibir la acción del RE α . Los autores proponen un complejo formado entre el RP_B y el RE α en células T47D (Ballare et al., 2003), y entre el RP y el RE β en células UIII (Vallejo et al., 2005), que llevaría a la proliferación celular en presencia del progestágeno. Un mecanismo similar fue descrito en células de cáncer de próstata LNCaP, donde la interacción entre el AR y el RE β media la activación de MAPK y la proliferación celular por andrógenos y E2 (Migliaccio et al., 2000). Por otro lado, el grupo de *D. Edwards y col.*, sugiere que no es necesaria la interacción entre el RP y el RE α en la activación de la vía de señalización no genómica c-Src/MAPK por Pg (Boonyaratanakornkit et al., 2008).

Los experimentos de colocalización e IP en tumores C4-HD creciendo con MPA y C4-HI, demostraron que una fracción de ambas isoformas del RP y el RE α forman parte

de un mismo complejo a nivel nuclear. Cabe destacar, que aunque no se muestra en esta tesis, también detectamos interacción física entre ambos receptores, por IP a partir de extractos citosólicos provenientes de tumores C4-HD y C4-HI. A diferencia de lo reportado en los trabajos mencionados, observamos que tanto la isoforma A como la isoforma B del RP, interaccionarían con el RE α . Teniendo en cuenta que no hay evidencias previas donde describan esta interacción a nivel nuclear, nos centramos en estudiar este mecanismo. En cultivos primarios de células epiteliales C4-HD, la interacción entre el RP y el RE α está regulada por el MPA. El progestágeno induce la colocalización nuclear entre ambos receptores, alcanzando un pico a los 30 minutos post estímulo. Además, los receptores que forman parte de este complejo, se encuentran fosforilados por el tratamiento con el MPA, sugiriendo que podrían estar activos transcripcionalmente. Estos resultados fueron reproducidos en las células humanas T47D, donde el MPA también fue capaz de inducir la interacción entre el RP y el RE α en el núcleo celular, alcanzando un máximo a los 10 minutos post estímulo. Estos resultados, se ven reforzados dado que vimos el mismo mecanismo con diferentes anticuerpos contra los receptores totales, o sus formas fosforiladas. Cabe mencionar, que uno de los anticuerpos utilizados, que reconoce al RP total (Ab7, Neomarkers) se describió como específico para la isoforma A del RP en ensayos de IF de glándula mamaria de ratón, mientras que es capaz de detectar ambas isoformas del RP por WB (Aupperlee et al., 2005b). Por lo tanto, en los experimentos de colocalización de receptores hormonales por IF presentados en esta tesis, podemos concluir que el RP_A está interactuando físicamente en el núcleo celular con el RE α en un mecanismo regulado por MPA. Debemos encarar experimentos de este tipo con anticuerpos específicos para el RP_B. A pesar de esto, los ensayos de IP y WB, demuestran que ambas isoformas del RP participarían en dicha interacción.

Si bien no observamos colocalización citoplasmática con el RE α , es importante recordar que está reportada la interacción entre RP_B, a través de los sitios ERID, y no con RP_A, por lo tanto nuestros resultados no estarían en contraposición con los de *Migliaccio y col.* y *Ballaré y col.*, que indicaban una interacción citosólica entre el RP_B y el RE α (Migliaccio et al., 1998; Ballaré et al., 2003). De manera tal, que deberíamos repetir estos experimentos con un anticuerpo que reconozca al RP_B específicamente, e investigar si podemos reproducir, por IF, los resultados que *Ballaré y col.* reportaron con técnicas de IP y *pull-down*. Es interesante destacar, que pudimos apreciar marcación para el RP en la membrana celular por IF, con dos anticuerpos diferentes, uno que reconoce al RP_A total

(Ab7), y otro que reconoce ambas isoformas fosforiladas en Ser294. Esta última marcación se observó incrementada por el tratamiento con MPA, corroborando además, los resultados obtenidos por la Dra MC Bottino en su tesis doctoral, quien incluso fue capaz de detectar al RE α en membrana celular. Por lo tanto, no podemos descartar la formación del complejo RP-RE α en el citoplasma en este modelo. Estudios en curso están evaluando la colocalización de ambos receptores en la membrana celular.

Por otro lado, confirmamos la presencia del RE α en la interacción con el RP, y la dinámica de este proceso cuando tratamos los cultivos epiteliales C4-HD con E2 o ICI en presencia de MPA. Tanto la hormona, como la antihormona inhiben la interacción entre ambos receptores promovida por el MPA. Sin embargo, la participación del antiprogestágeno en este proceso es más controvertida. El RU 486 no parece bloquear la capacidad de ambos receptores de interactuar en el núcleo celular. El concepto clásico por el cual el RU 486 debe hacer exactamente lo opuesto al progestágeno no parece ser válido en este caso. A favor de esto, podemos decir que ya hemos visto acciones del RU 486 similares a los progestágenos, que tienen que ver con inducir fosforilación del RP (Beck et al., 1996; Clemm et al., 2000), inducir el pegado al ADN (Bottino et al., 2009; Edwards et al., 1995; Leonhardt and Edwards, 2002; Gass et al., 1998), y actuar como agonista en ciertas condiciones celulares que tienen que ver con sobreexpresión del RP_B. Además, en células epiteliales C4-HI hemos podido observar activación de MAPK, incremento en ciclina D1, e incluso proliferación celular, con bajas concentraciones de RU 486 (Tesis doctoral Dra. MC Bottino)(Bottino et al., 2009). Por lo tanto, proponemos que varios procesos intracelulares gatillados por el MPA o el RU 486 pueden llegar a ser muy similares, sin embargo la principal diferencia entre ambos se daría a nivel genómico. La actividad transcripcional inducida por MPA estaría asociada a la interacción del RP con coactivadores, mientras que el RU 486 unido al RP, reclutaría corepresores inhibiendo la expresión génica. De la misma manera, el antiprogestágeno sería capaz también de favorecer la formación del complejo entre el RE α y el RP. La funcionalidad y actividad de este complejo estaría supeditada a la acción del RU 486 reclutando corepresores de la transcripción.

Estroma tumoral y receptores hormonales

Un componente fundamental del estroma tumoral mamario, son los *CAFs*. Estos fibroblastos activados son capaces de promover el crecimiento y desarrollo tumoral a través de diversos mecanismos como la liberación de factores de crecimiento, o promoviendo la angiogénesis, migración celular y metastasis (Bhowmick et al., 2004; Bhowmick and Moses, 2005).

Nuestro grupo demostró recientemente que los *CAFs* derivados de tumores C4-HI expresan mayores cantidades de FGF-2 *in vitro*, que los *CAFs* provenientes de tumores C4-HD. Además, vimos que estos *CAFs* HI incrementan la proliferación de células epiteliales tumorales de forma más significativa que los *CAFs* HD, involucrando al FGF-2 como factor capaz de activar al RP en este proceso (Giulianelli et al., 2008a). Se demostró que componentes de la membrana basal como la laminina y el colágeno IV, sintetizados principalmente por células estromales de la mama normal de ratón, regulan la expresión del RE α (Novaro et al., 2003). Sin embargo, no hay mucha literatura sobre la relación entre el estroma tumoral y la activación de receptores hormonales. Recientemente se demostró que factores derivados del estroma de carcinomas de próstata, son capaces de inducir proliferación celular de la línea de cáncer de próstata LNCaP, vía la fosforilación del AR por MAPK (Shigemura et al., 2009). Estos resultados son bastante similares a los reportados por nuestro grupo en el 2008, y en parte en este trabajo de tesis, donde demostramos que el FGF-2 estromal participaría en la activación del RP induciendo así el crecimiento tumoral hormono-independiente.

En este trabajo de tesis, demostramos que los *CAFs* HI inducen de forma más significativa que los *CAFs* HD, la expresión, fosforilación y activación del RP, involucrando al FGF-2 en este mecanismo. Además, utilizando ensayos de proliferación celular de co-cultivos entre células epiteliales C4-HD con *CAFs* derivados de los mismos tumores, demostramos que el incremento en la proliferación epitelial a causa del co-cultivo con *CAFs*, pudo ser revertida por tratamiento con E2 e ICI. Incluso, observamos el mismo efecto sobre la proliferación inducida por el FGF-2 sobre cultivos epiteliales C4-HD y C4-HI, implicando al RE α , además del RP, en este proceso. En este conjunto de experimentos, vimos que los *CAFs* no expresan receptores hormonales, indicando que el efecto de estas hormonas/antihormonas en el co-cultivo, fue específicamente sobre el RE α .

de las células epiteliales tumorales. Observamos que los *CAFs*, además de inducir un aumento en la expresión del RP, inducen también un incremento en los niveles de expresión del RE α . Resultados recientes presentados en la tesis de licenciatura de M. Riggio, demuestran que los *CAFs*, vía el FGF-2, son capaces de inducir activación de Akt. Además, sabemos que esta vía está implicada en la fosforilación y activación del RE α , por lo tanto, si bien habíamos visto que *in vitro* las células epiteliales tumorales HI ya tenían un RE α fosforilado en ausencia de estímulos, postulamos que el estroma tumoral podría participar, al menos en parte, en mantener alta expresión de RE α activos.

Hipótesis de trabajo

Por todo lo expuesto hasta aquí, nuestra hipótesis de trabajo sobre la participación del RE α en el crecimiento tumoral C4-HD esta ejemplificada en las Figuras 4.1 y 4.2. En ausencia del MPA (Figura 4.1.A), hay altos niveles de expresión del RP y bajos del RE α . Los receptores se encontrarían inactivos y el tumor no crece dada su dependencia por el progestágeno para crecer. En presencia del MPA (Figura 4.1.B), este induce fosforilación y activación del RP y del RE α en células epiteliales tumorales.

La existencia de mecanismos no genómicos inducidos por MPA en asociación con el RP clásico en membrana celular, fue descrito en este modelo y serían los responsables de fosforilar a los receptores (Bottino et al., 2009; Carnevale et al., 2007). El RP activado y unido a su ligando, traslocaría al núcleo donde regularía la actividad de genes asociados a proliferación celular, uniéndose a secuencias PRE, como sería el caso de c-Myc o por interacción con otros factores de transcripción en sitios no PRE, como sería el caso de la ciclina D1 (no se muestra este caso para hacer más comprensible la figura). El MPA podría además inducir un aumento en la expresión del RE α , que a su vez se fosforilaría en forma ligando independiente por Akt y/o MAPK. Otra alternativa es que los niveles basales del RE α presentes en ausencia del MPA, sean fosforilados y activados por la hormona, llevándolo a regular positivamente su síntesis (no se muestra en la figura), y a su vez induciendo la expresión del RP. Teniendo en cuenta que no hay proliferación celular si no están ambos receptores colocalizando en el núcleo, proponemos que esta interacción podría ser imprescindible en los promotores de determinados genes claves en regular el ciclo celular. No estamos en condiciones de asegurar sobre qué secuencias promotoras sería funcional este complejo, pero evidencias bibliográficas sugieren que ciclina D1

podría ser un buen candidato. Por otra parte, tampoco hemos podido concluir sobre la posible interacción extranuclear de ambos receptores hormonales en este modelo.

El antiprogestágeno RU 486 es capaz de inhibir la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo*. A pesar que el RU 486 puede desencadenar fosforilación del RP y unión de este a secuencias PRE, induce un cambio conformacional en el RP que lo lleva a interactuar con corepresores de la transcripción, inhibiendo la expresión de genes asociados al ciclo celular (como por ej, el gen para ciclina D1), e inhibiendo el crecimiento tumoral (Bottino et al., 2009). Sin embargo, el RU 486 no inhibe la interacción entre el RP y el RE α . Postulamos que la inhibición transcripcional de este complejo se debería al reclutamiento de corepresores, inhibiendo así la transcripción de determinados genes como el de la ciclina D1 (Figura 4.2.A).

Vimos que tanto el E2 como el ICI, inducen inhibición en la proliferación celular mediada por MPA tanto *in vivo* como *in vitro*. El E2 es capaz de inducir fosforilación de su receptor, y unido a este, se asociaría a promotores de genes regulados por la hormona. El RP sería uno de los genes inducidos por E2. Asimismo, el E2 activaría vías apoptóticas, llevaría al RE α a degradación (Soldati et al., 2009), y lo sacaría del complejo con el RP, induciendo regresión tumoral. Vimos que en tumores en crecimiento, la clasterina y el PCNA, proteínas reguladas por el RE α activado probablemente en un mecanismo ligando independiente, se encuentran altamente expresadas. Clasterina es responsable de reclutar Bax. En presencia de E2, la Clasterina disminuye, se libera Bax y aumenta la activación de caspasa 9, vía el mecanismo intrínseco de la apoptosis (Soldati et al., 2009). Mientras que el ICI, eliminaría al RE α por degradación, evitando su actividad transcripcional, y su asociación con el RP, llevando a la regresión tumoral (Figura 4.2.B).

Nuestra hipótesis sobre el crecimiento tumoral C4-HI y la participación del RE α , está ejemplificada en la Figura 4.3. En este tumor, el estroma, en particular los CAFs, cumplen un rol muy importante en el crecimiento tumoral. Sabemos que vía la liberación del FGF-2, y probablemente otros factores, se activan cascadas de señalización citoplasmáticas como Akt y MAPK (tesis de Licenciatura M. Riggio, y tesis Doctoral J.P. Cerliani). Esta acción del estroma, lleva a un incremento en los niveles de expresión, fosforilación y activación del RP en células epiteliales, induciendo proliferación celular (Giulianelli et al., 2008a). Además, sabemos que el FGFR-2, es capaz de traslocar al

núcleo celular, e interactuar con el RP, en un mecanismo regulado por MPA y FGF-2 (tesis Doctoral J.P. Cerliani). Resta conocer la funcionalidad y la participación del RE α en este complejo (Figura 4.3.A). En este tumor, los RE α estarían activados en forma ligando independiente, probablemente por los altos niveles de Akt y/o MAPK activados, y estos interactuarían con los RP activados por FGF-2 y otros factores de la misma manera en que fue postulado para el tumor C4-HD.

La acción del RU 486 sobre este tumor, sería similar a su acción sobre el C4-HD. Se uniría al RP, cambiando su conformación tridimensional, e induciendo la asociación con corepresores de la transcripción, inhibiendo la expresión de genes proliferativos e induciendo la regresión tumoral. En esta tesis vimos además que los *CAFs* son capaces de incrementar los niveles de expresión del RE α en células epiteliales. En estas células, el RE α se encontraría basalmente fosforilado y con la capacidad de interactuar con secuencias ERE. La presencia de E2, llevaría al RE α a activar vías apoptóticas, y a inducir su degradación (Soldati et al., 2009), inhibiendo el crecimiento tumoral y la acción proliferativa del estroma sobre el epitelio. Vimos que el ICI también induce degradación del RE α , y fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral, aunque de forma menos eficiente que en el tumor C4-HD (Figura 4.3.B). Esto podría ser a causa de un RE α basalmente activo y asociado a la cromatina, menos disponible para interactuar con el ICI. Si bien no estudiamos el mecanismo de interacción entre el RE α y el RP a nivel nuclear, vimos que este complejo existe, al igual que en tumores C4-HD.

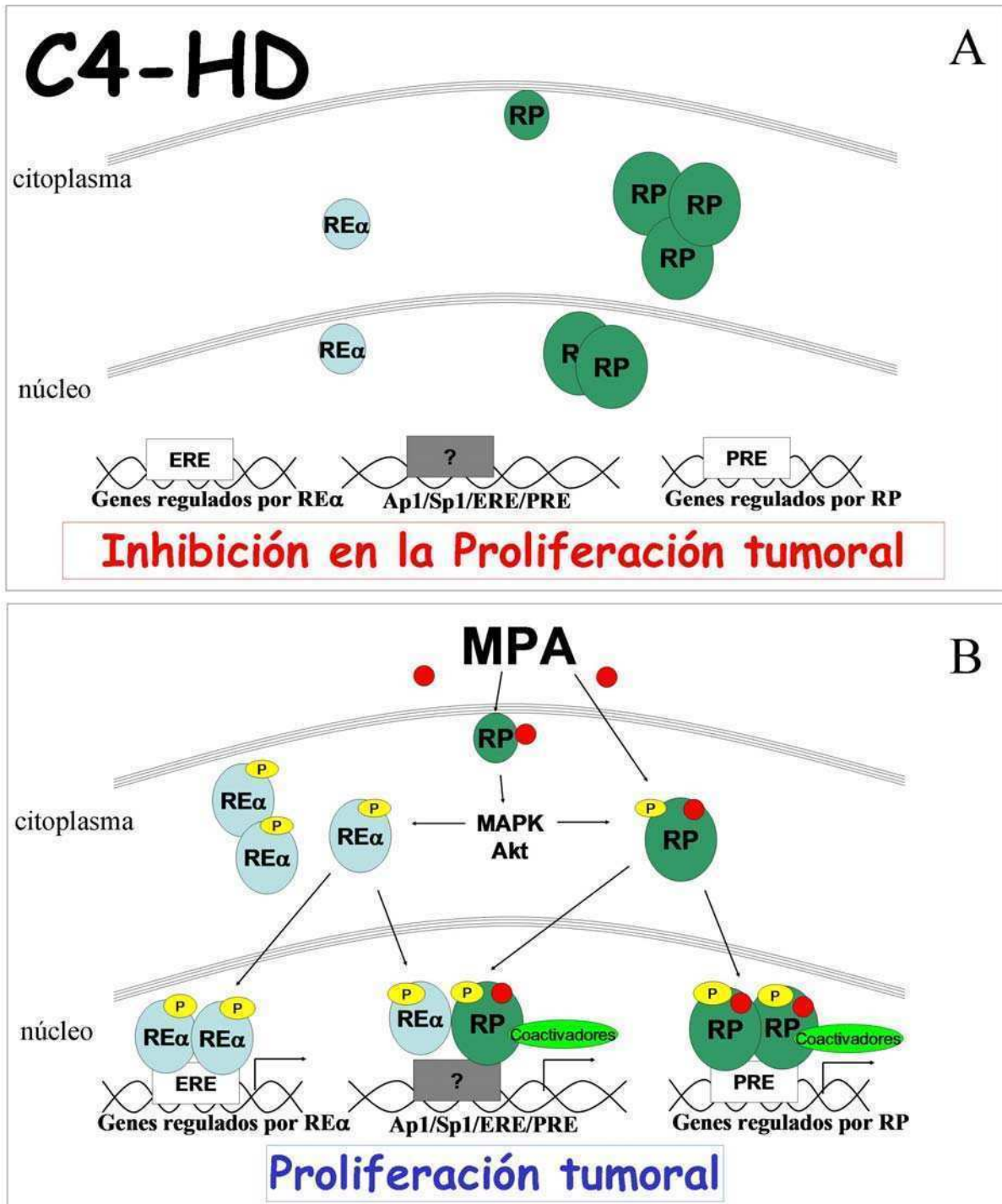


Figura 4.1. Hipótesis de trabajo sobre la participación del RE α en el crecimiento del tumor C4-HD en presencia o ausencia del MPA.

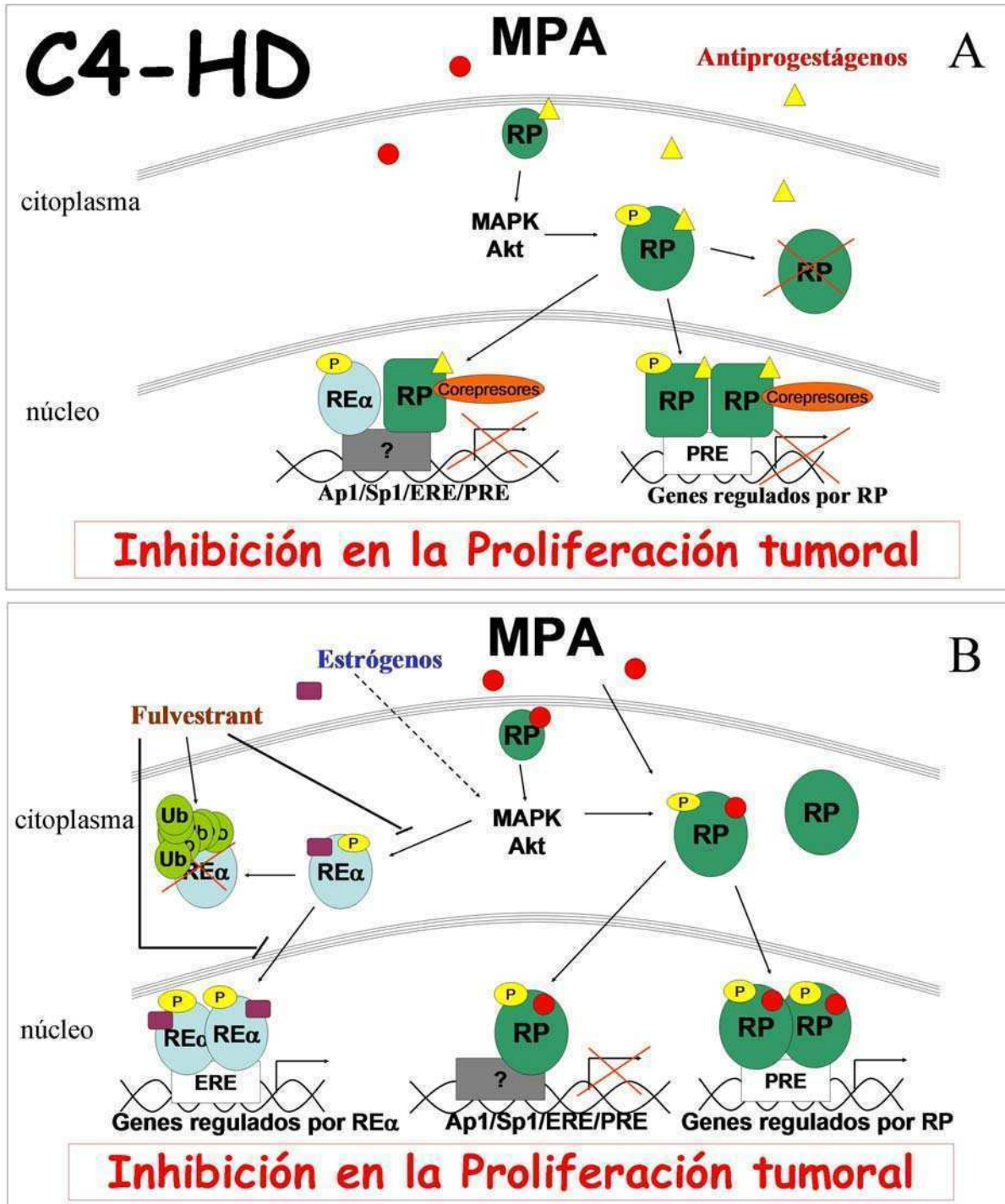


Figura 4.2. Hipótesis de trabajo sobre la participación del RE α en la inhibición del crecimiento tumoral C4-HD, por RU 486, E2 o ICI.

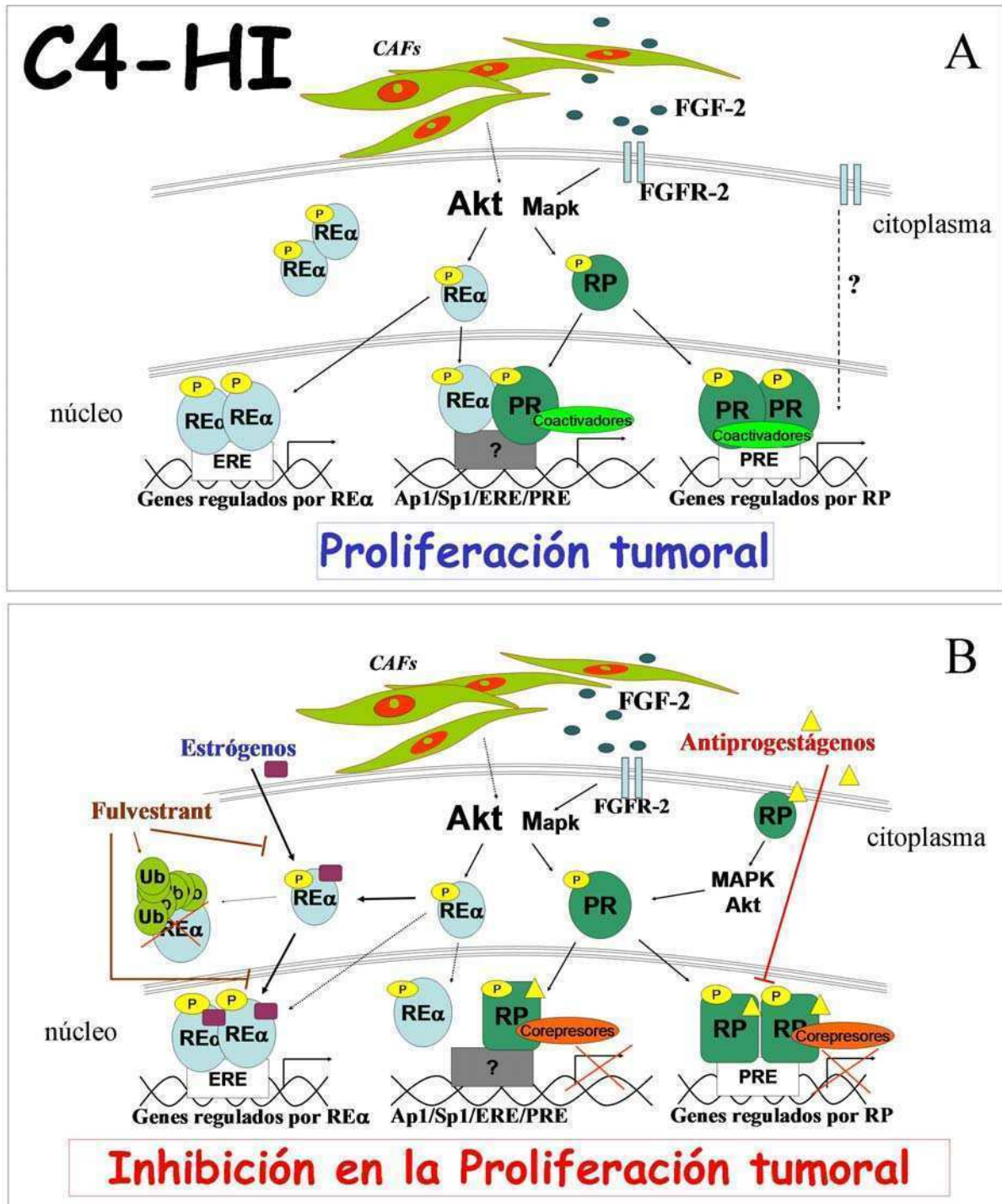


Figura 4.3. Hipótesis de trabajo sobre la participación del RE α en el crecimiento del tumor C4-HI.

Estudios de expresión génica por *microarrays* de ADN

El análisis de los genes regulados por MPA en tumores C4-HD reveló que sólo 8 genes resultaron sobreexpresados de forma significativa por el progestágeno, mientras que encontramos 112 genes sobreexpresados significativamente en tumores donde había sido eliminado el MPA por 48 hs. Los genes que surgieron en este caso, están asociados con arresto del ciclo celular, apoptosis, y mecanismos de remodelación del endotelio vascular. Lo cual resulta coherente en un tumor sin estímulos proliferativos. Por otro lado, en el grupo de genes regulados positivamente por MPA encontramos fundamentalmente al FGF-2. La capacidad de la Pg de regular la síntesis de este factor de crecimiento fue reportado en células de la granulosa y en útero de rata (Peluso and Pappalardo, 1999; Rider et al., 1997), indicando que uno de los mecanismos por los cuales el MPA podría regular la proliferación celular en tumores C4-HD, sería mediante la expresión del FGF-2. Sin embargo, no podemos asegurar si la expresión del FGF-2 por MPA es a través de la acción genómica del RP, o de forma indirecta por la activación de vías de señalización intracelular. Es interesante destacar que demostramos recientemente que el FGF-2 administrado en forma exógena fue capaz de imitar al MPA y estimular el crecimiento del tumor C4-HD (Giulianelli et al., 2008a). La participación del RP en este proceso resultó evidente luego de corroborar que el antagonista del RP, el RU 486, inhibió el crecimiento tumoral FGF-2 dependiente (tesis doctoral J.P. Cerliani).

Resulta curioso que en quiescencia (en ausencia del MPA), encontramos un mayor número de genes sobreexpresados que en condiciones de crecimiento tumoral. Esto sugiere que el crecimiento tumoral estaría acompañado por pérdida de funciones más que por ganancias. Ó, que la regresión tumoral por la ausencia del MPA, implica la puesta en marcha de nuevas funciones. Resultados similares han sido descriptos por otros, en la regulación hormonal en diferentes tejidos. Por ejemplo, se demostró que el E2, actuando vía el RE α en células MCF-7 reduce la expresión del 70% de todos los genes regulados por la hormona (Frasor et al., 2003). Resultados similares se obtuvieron con genes regulados por E2 en el útero de ratón (Hong et al., 2004), y con Pg en glándula mamaria de ratón (Fernandez-Valdivia et al., 2008) o en endometrio de monos (Ace and Okulicz, 2004).

Posteriormente, determinamos un perfil de expresión génica diferencial entre tumores C4-HD y C4-HI. Cuando agrupamos las muestras tumorales de acuerdo a sus perfiles de expresión génica, pudimos corroborar que ambas variantes tumorales presentaron un patrón de expresión diferencial. Resulta esperable que en el pasaje de la hormono-dependencia a la hormono-independencia hayan aparecido nuevas funciones o se hayan eliminado otras. Sin embargo, demostramos que esto no se debería a un cambio en la ploidía de los tumores (Fabris et al., 2005). El análisis de los genes cuya expresión resultó significativa en cada una de las variantes tumorales arrojó resultados muy interesantes los cuales fueron profundizados cuando analizamos específicamente el estroma y el epitelio de cada tipo de tumor. Pudimos determinar tres grupos de genes, uno específicamente expresado en el estroma tumoral, otro específicamente expresado en el epitelio tumoral, y un tercer grupo conteniendo genes que aparecieron representados en ambas poblaciones tumorales. Demostramos que tanto el estroma como el parénquima del tumor C4-HI, presentaron perfiles de expresión génica diferencial en comparación a las mismas poblaciones en el tumor C4-HD.

Dentro de los genes sobreexpresados significativamente en el estroma HI en comparación al HD, encontramos ejemplos de metaloproteasas, genes asociados a mecanismos de respuesta a heridas, quimiotaxis y extravasación celular. Un conjunto de genes que se conocen expresados por componentes estromales. Se sabe que la transición de un estadio preinvasivo a uno invasivo en tumores de mama, está asociado a la expresión de varias metaloproteasas en el estroma tumoral, las cuales modifican la matriz extracelular alterando la adhesión y movilidad de las células epiteliales (Ma et al., 2009; Casey et al., 2009). Entre las MMPs que encontramos presentes en el estroma HI, validamos la expresión de la MMP9 y MMP13 por IF. Un componente fundamental del estroma tumoral mamario son los fibroblastos, en particular los miofibroblastos o fibroblastos activos, los cuales son capaces de producir y modificar la matriz extracelular, liberar factores angiogénicos y pro inflamatorios, estimular la proliferación e invasión de células epiteliales tumorales. Todos mecanismos similares a los producidos como respuesta ante una herida (Radisky et al., 2007; Galie et al., 2005). Ésto, sumado a resultados de nuestro laboratorio que indican la expresión de actina de músculo liso por los *CAFs*, indica que el estroma C4-HI presenta fibroblastos activados

Dentro de los genes que encontramos específicos del parénquima tumoral, vimos que muchos de ellos ya habían sido reportados como genes expresados en células

epiteliales, y más aun, regulados por el RP, validando de esta manera los resultados obtenidos. Entre ellos podemos citar a *Steap* o *Plk2*, sobreexpresado en el epitelio HI y regulado por el RP en células T47D. *Calca* o *Cald1*, por otra parte, están sobreexpresados en el epitelio HD, y se vieron regulados por progestágenos en células T47D. Los genes para *Pdgfc* y *Runx2*, sobreexpresados significativamente en el epitelio HI, fueron luego validados por IHQ. Como se describió previamente, el *Pdgfc* es un factor de crecimiento quimioattractante de fibroblastos capaz de inducir en éstos la secreción de FGF-2. Por ende, creemos que este puede ser un buen candidato para reclutar *CAFs*, inducido por células epiteliales C4-HI. Proponemos la existencia de un *loop* parácrino por el cual el *Pdgfc* secretado por el epitelio HI estaría reclutando *CAFs*, e induciendo la síntesis del FGF-2 por parte de los fibroblastos. Este FGF-2 actuaría sobre el epitelio, favoreciendo la proliferación tumoral e induciendo la síntesis del *Pdgfc*.

Otro de los genes sobreexpresados en tumores C4-HD en comparación al C4-HI, fue el FGF-2. El análisis de las poblaciones epiteliales y estromales indicó que este factor se encontraría expresado en ambas. Este resultado parecería inverso a evidencias previas de nuestro laboratorio que indicaban alta expresión en *CAFs in vitro*, derivados de tumores C4-HI. Hay que tener en cuenta que en nuestro análisis en cultivo, los estudios se habían hecho en ausencia de MPA, en cambio el estroma en los ensayos *microarrays*, proviene de tumores creciendo *in vivo* en donde se encuentra estimulado por las células epiteliales del tumor C4-HD en presencia del MPA. Es probable que el tumor C4-HI utilice el FGF-2 estromal mientras que en el C4-HD, el MPA induzca la síntesis de FGF-2 en el epitelio, además de la expresión estromal. Es posible que en estos últimos la vida media del *mRNA* para FGF-2 sea mucho menor que en tumores HD, por eso las diferencias con los *microarrays*. Por otro lado, puede existir una regulación a nivel proteico. Y que el FGF-2 se degrade más rápidamente en los tumores HD. Se sabe que existe una íntima relación entre FGFs y MMPs. Ya sea, los factores de crecimiento regulando a las metaloproteasas (Onguchi et al., 2009; Pintucci et al., 2003; Xie et al., 2008), o a la inversa, las proteasas haciendo más disponible a los FGFs (Ardi et al., 2009; Onguchi et al., 2009; Tholozan et al., 2007). De esta manera, podemos suponer que en los tumores HI, a pesar de tener menos *mRNA* para FGF-2 que los HD, tendrían mayor disponibilidad del factor dada la alta expresión de metaloproteasas. En el HD es muy probable que el FGF-2 esté regulado en respuesta al MPA tal como quedó demostrado en el *microarray* donde comparamos C4-HD con MPA vs sin MPA.

PARTE V

CONCLUSI ONES

Conclusiones particulares

Capítulo I

- En este trabajo de tesis, demostramos que el MPA eleva los niveles de expresión del RE α e incrementa su fosforilación en tumores C4-HD creciendo *in vivo*, mientras que no tiene efecto sobre los tumores C4-HI, donde ya está basalmente fosforilado.
- Demostramos en células epiteliales C4-HD *in vitro*, que el MPA induce fosforilación del RE α en Ser118 y Ser167, involucrando a las vías de PI3K/Akt y MEK1/MAPK en este proceso. Además, induce el pegado del RE α a su elemento de respuesta consenso en el ADN (ERE).
- En células epiteliales C4-HI mantenidas en condiciones de quiescencia, el RE α presentó altos niveles de fosforilación, consistente con una elevada capacidad de unirse al ERE; procesos que no fueron alterados con el agregado del MPA.

Esos resultados sugieren que el RE α se encontraría activado basalmente en tumores C4-HI, y que esta activación es insuficiente por sí sola para gatillar la proliferación celular *in vitro*. En tumores C4-HD, en cambio, su activación y regulación estaría influenciada por la administración del MPA.

- Demostramos que el antiestrógeno puro ICI, redujo significativamente los niveles de expresión del RE α , inhibiendo la proliferación celular mediada por MPA en cultivos primarios de células epiteliales C4-HD y C4-HI; siendo estos últimos, menos sensibles a la inhibición.
- En ambos casos, luego de 24 hs de tratamiento con el ICI se detectó la presencia del RP, sugiriendo que la inhibición en la proliferación celular observada, no se debió a una ausencia del RP. Lo mismo es válido para la acción del E2, que reduce la expresión de su receptor, incrementa los niveles del RP e induce inhibición del crecimiento celular.
- En cultivos primarios de ambos tumores, la inhibición del mensajero del RE α , mediante el uso de un *siRNA* específico, provocó la reducción en los niveles de expresión del RE α , afectó parcialmente la expresión del RP, e inhibió la proliferación celular mediada por MPA.

- *In vivo*, el ICI indujo una regresión completa del tumor C4-HD creciendo con MPA, mientras que inhibió el crecimiento autónomo del tumor C4-HI, en concordancia con los resultados obtenidos *in vitro*.

De esta manera, concluimos que la activación ligando independiente del RE α estaría involucrada en la proliferación de células epiteliales C4-HD inducida por MPA, y en células C4-HI *in vitro*. *In vivo*, en el tumor C4-HI, la activación ligando independiente del RE α sería constitutiva o al menos MPA-independiente, mientras que en el HD sería inducida por el progestágeno.

- Demostramos una interacción nuclear entre el RE α y el RP en tumores C4-HD y C4-HI creciendo *in vivo*, y en células epiteliales C4-HD *in vitro*, en un mecanismo regulado por MPA.
- La interacción nuclear de ambos receptores fue también observada en la línea de cáncer de mama humano T47D.
- El E2 y el ICI disminuyeron la interacción nuclear entre el RE α y el RP mediada por MPA en células epiteliales C4-HD, en condiciones experimentales en las cuales ambos compuestos inhiben la proliferación celular. Corroborando la participación del RE α en dicho complejo. Curiosamente el RU 486 si bien es inhibitorio de la proliferación celular, no afectó la interacción entre ambos receptores mostrando un efecto agonista al del MPA.

Estos resultados sugieren que además del concepto clásico por el cual el RE α es necesario para inducir la expresión del RP, una interacción física nuclear entre ambos receptores sería necesaria para activar respuestas genómicas mediadas por el RP. Por otra parte, estos resultados demuestran que los efectos inhibitorios del RU 486 son debido a fenómenos posteriores a dicha interacción.

- Demostramos la participación del estroma tumoral HI, en particular los CAFs HI, en la fosforilación y activación del RP.
- La expresión del RE α y del RP, se vió incrementada en células epiteliales tumorales en co-cultivo con CAFs.

- Demostramos en cultivos primarios, que señales proliferativas mediadas por el estroma tumoral, pudieron ser revertidas por el tratamiento con ICI o E2.

Los resultados indican que el RE α , además del RP, sería relevante también en la regulación de la proliferación celular mediada por el estroma tumoral.

Capítulo II

- En los estudios de *microarrays* de ADN con tumores C4-HD creciendo con MPA, o en ausencia del mismo, detectamos un perfil de expresión génica diferencial regulado por el progestágeno.
- Un número mayor de genes se encontraron significativamente expresados en el tumor C4-HD sin MPA, en comparación al tumor creciendo en presencia del mismo.

Estos datos sugieren que el crecimiento tumoral HD, estaría acompañado por pérdida de funciones más que por ganancias. Ó, que la regresión tumoral por la ausencia del MPA implica la puesta en marcha de nuevas funciones.

- Encontramos diferentes ejemplos de genes asociados con arresto del ciclo celular, apoptosis, y mecanismos de remodelación del endotelio vascular, en el tumor C4-HD sin MPA. Mientras que en el tumor creciendo en presencia del MPA, vimos una expresión significativa del FGF-2.

Estos resultados indican, por un lado, una coherencia entre los genes sobreexpresados en ausencia del MPA y la falta de estímulos proliferativos mediados por la hormona en el tumor C4-HD. Y además, nos hace suponer que uno de los mecanismos por los cuales el MPA estimula la proliferación celular en este tumor, podría ser vía la síntesis del FGF-2.

- Detectamos un perfil de expresión génica diferencial entre tumores C4-HD y C4-HI, lo que luego fue profundizado con el análisis particular de las poblaciones estromales y epiteliales de cada tumor.

- Pudimos establecer diferencias entre los parénquimas de tumores C4-HD y C4-HI, en sus patrones de expresión génica.
- Genes relacionados a procesos metabólicos y a factores quimiotácticos, se encontraron sobreexpresados en el epitelio HI. Mientras que genes relacionados a ciclo celular y a la vía de señalización por Wnt, aparecieron sobreexpresados en el epitelio HD.
- Confirmamos que el estroma del tumor C4-HI es diferente del estroma del tumor C4-HD, en su patrón de expresión génica. Alta expresión de metaloproteasas y genes relacionados a mecanismos de reparación de heridas y quimiotaxis, se encontraron en el estroma C4-HI.

Estos resultados sustentan la hipótesis de la participación del estroma en la adquisición del fenotipo HI. Ya que cambios en el compartimiento estromal podrían causar cambios en las señales parácrinas que modifiquen el comportamiento del tumor.

Conclusión general

En este trabajo de tesis demostramos que una diferencia importante entre el tumor C4-HI y el tumor C4-HD radica en la expresión del RE α . Este se encuentra altamente expresado y activado en los HI, mientras que en el tumor HD, el tratamiento con MPA induce la expresión y activación del receptor. Esto implica que existirían niveles del RP constitutivamente expresados en el tumor C4-HD, es decir no regulados por el RE α . Sin embargo, el tratamiento con E2 puede aumentar más aun los niveles del RP, indicando que podría haber un *pool* de RP basalmente expresado y otro inducible por el RE α . A lo largo de la tesis quisimos investigar qué rol cumple el RE α en este modelo experimental. Los resultados obtenidos apuntan a que no sería meramente una función pasiva de incrementar el *pool* del RP, sino que sería necesaria una interacción física entre ambos receptores para estimular la proliferación celular. Si bien esta interacción a nivel citoplasmático ha sido descrita por otros autores, nuestros resultados sugieren que existiría una interacción nuclear entre el RE α y el RP. Condiciones de crecimiento celular están asociadas a mayor colocalización entre ambos, mientras que situaciones de inhibición celular estarían asociadas a una disminución en esta colocalización, exceptuando los efectos del RU 486 que se comportaría como un agonista progestacional en estas primeras etapas y su acción

antagonista se daría inhibiendo luego la expresión génica de por ej, ciclina D1. Estudios en curso determinarán si esta colocalización es necesaria para la activación del gen de ciclina D1, clave en la regulación de la proliferación celular en este modelo.

Por otra parte, hemos demostrado que los RE α , además de los RP, participan en el crecimiento tumoral mediado por el estroma, sugiriendo que este podría ser también el responsable de mantener un RE α activado. Otra posibilidad es que cambios intrínsecos en la célula tumoral HI, sean los responsables de mantener al RE α activado, y que el estroma participe sólo en la activación del RP. Sabemos que la vía de Akt es de suma importancia para el crecimiento del tumor C4-HI *in vivo*, que el Akt es capaz de fosforilar al RE α , y que el RE α es indispensable para el crecimiento tumoral. Aún falta determinar el orden de esta cadena de eventos.

Estos resultados, en conjunto con aquellos reportados en la tesis doctoral de Caroline Lamb, sugieren que el estroma de los tumores C4-HD debía ser diferente al estroma del tumor C4-HI. En los estudios de *microarrays* de ADN, demostramos por primera vez diferencias entre ambos componentes estromal y epitelial a nivel de expresión génica. El estudio de proteínas claves nos permitirá dilucidar qué diferencias existen entre las células epiteliales de los tumores HI con respecto a las de los HD, que les permiten a las primeras, reclutar un estroma diferencialmente activado y capaz a su vez de favorecer el crecimiento HI. El PDGFC parecería ser un buen candidato. Este conocimiento permitirá el abordaje de terapéuticas de apoyo para no sólo combinar tratamientos cuyos blancos sean el RE α y el RP, sino también aquellos jerárquicamente implicados de la interacción epitelio-estroma tumoral.

PARTE VI

APÉNDICE

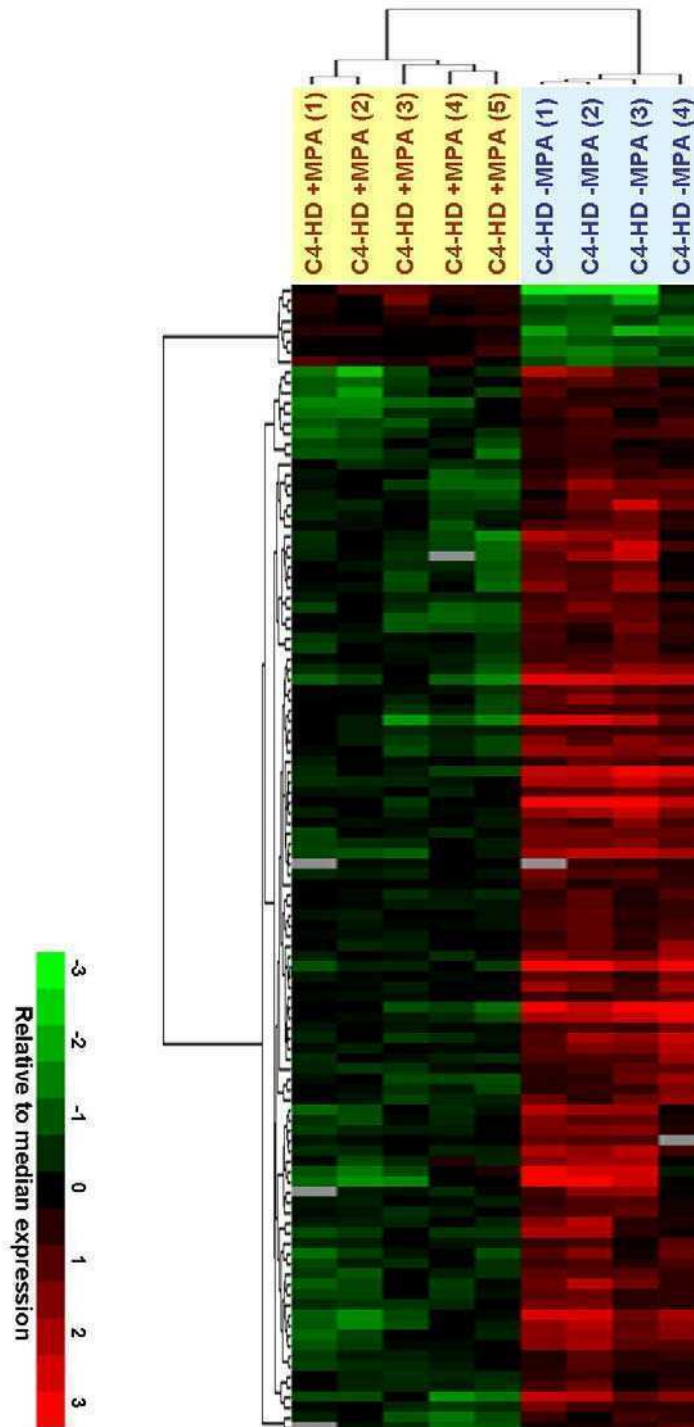


Figura 7.1. Agrupamiento de tumores C4-HD +MPA y C4-HD -MPA según sus patrones de expresión génica. Utilizamos los 112 genes, que luego del análisis por *SAM*, mostraron diferencias significativas en su expresión entre las muestras experimentales en presencia o ausencia del MPA. Mediante las herramientas informáticas *Cluster* y *JavaTreeView*, pudimos agrupar las muestras tumorales y visualizar los resultados, respectivamente. Cada columna representa una muestra experimental, las filas representan los genes que se obtuvieron luego del análisis, y cada celda refleja la mediana centrada de la intensidad de fluorescencia (\log_2 Cy5/Cy3) del gen correspondiente en el *array* apropiado. La intensidad de cada celda, representa la expresión relativa de cada gen en cada muestra experimental. Celdas en negro: genes que no cambian respecto a la mediana, celdas en rojo: genes positivamente expresados, celdas en verde: genes negativamente expresados, celdas en gris: datos perdidos para ese gen.

Tabla 3.2. Genes diferencialmente expresados en tumores C4-HD en presencia o ausencia de MPA

Genes sobreexpresados en presencia de MPA	Gene symbol	Fold	Genes sobreexpresados en ausencia de MPA	Gene symbol	Fold
fibroblast growth factor 2	Fgf2	3,54	aquaporin 5	Aqp5	10,40
potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	Kcnmb4	2,53	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 8	Chst8	7,34
similar to carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 13	LOC381796	2,41	relaxin 1	Rln1	6,15
3-oxoacid CoA transferase 1	Oxct1	2,12	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Gadd45a	4,97
SoxLZ/Sox6 leucine zipper binding protein in testis	Solt	1,87	cannabinoid receptor 2 (macrophage)	Cnr2	4,81
glycosyltransferase 25 domain containing 1	Glt25d1	1,82	transmembrane protein 86A	Tmem86a	4,23
cDNA sequence BC005764	BC005764	1,64	cystinosis, nephropathic	Ctns	4,14
protease, serine, 16 (thymus)	Prss16	1,63	gamma-glutamyltransferase-like activity 1	Ggtla1	3,88
			cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 25	Cyp3a25	3,73
			stanniocalcin 2	Stc2	3,63
			growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	Gadd45g	3,55
			heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	Hs3st3b1	3,46
			heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 6	Hs3st6	3,03
			protein kinase C, mu	Prkcm	2,98
			gelsolin	Gsn	2,68
			solute carrier family 12, member 4	Slc12a4	2,67
			ring finger and KH domain containing 3	Rkhd3	2,67
			peptidyl arginine deiminase, type II	Padi2	2,65
			myosin, heavy polypeptide 14	Myh14	2,64
			aspartoacylase (aminoacylase) 2	Aspa	2,63
			angiopoietin-like 4	Angptl4	2,44
			hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	2,26
			muscle and microspikes RAS	Mras	2,13
			propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	Pcca	2,13
			Memo1 mediator of cell motility 1	Memo1	2,07
			myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	Myh9	2,06
			inhibitor of DNA binding 2	Id2	2,05
			solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), member 5	Slc5a5	2,04
			dickkopf-like 1	Dkk1	2,03
			dihydrouridine synthase 2-like (SMM1, S. cerev)	Dus2l	2,00
			tripartite motif protein 24	Trim24	1,96
			inhibitor of DNA binding 3	Id3	1,94
			muscle and microspikes RAS	Mras	2,13
			interleukin 7 receptor	Il7r	1,92
			3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	Hmgcl	1,92
			amiloride binding protein 1 (amine oxidase, copper-containing)	Abp1	1,92
			solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	Slc30a1	1,90
			Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like1	Rapgef1	1,89
			Bcl2-like 14 (apoptosis facilitator)	Bcl2l14	1,86
			oxysterol binding protein-like 3	Osbpl3	1,83
			lung carcinoma myc related oncogene 1	Lmyc1	1,80
			GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	Glipr1	1,80
			dual specificity phosphatase 4	Dusp4	1,79
			oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A	Obfc2a	1,78
			transmembrane protein 213	Tmem213	1,77
			ATPase, Na+/K+ transporting, beta 3 polypeptide	Atp1b3	1,76
			oxidative stress induced growth inhibitor 1	Osgin1	1,75
			scavenger receptor class B, member 2	Scarb2	1,74
			phosphatidylinositol transfer protein, alpha	Pitpna	1,74
			potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3	Kcns3	1,73
			solute carrier family 25, member 36	Slc25a36	1,72
			Trp53 inducible protein 11	Trp53i11	1,71
			DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	Dnajb4	1,70
			purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	P2rx5	1,70
			transcription factor 12	Tcf12	1,67
			TNF receptor-associated factor 3 interacting protein1	Traf3ip1	1,67
			CD24a antigen	Cd24a	1,66

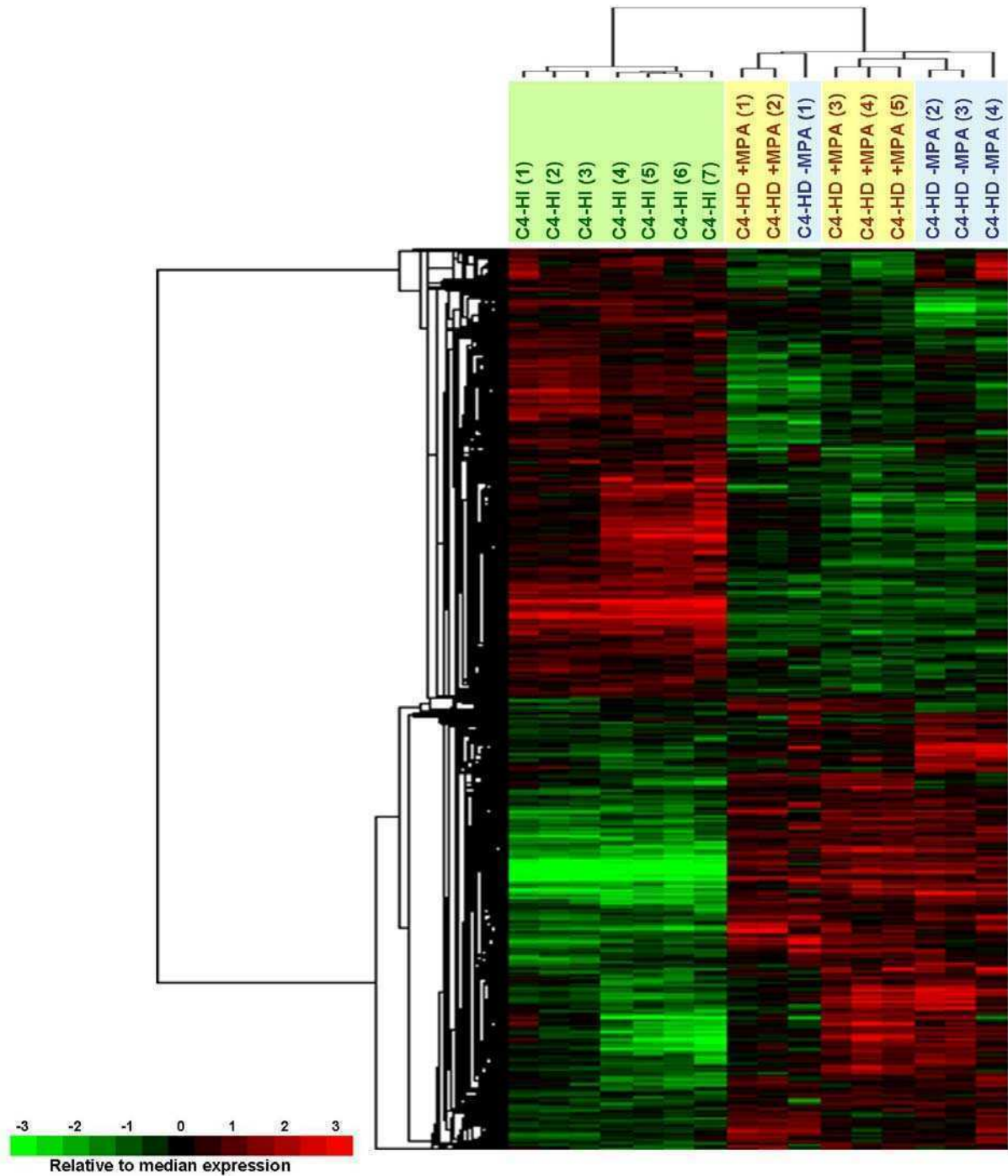


Figura 7.2. Agrupamiento de tumores C4-HI, C4-HD +MPA y C4-HD -MPA, según sus patrones de expresión génica. Utilizamos los 6418 genes, que luego del análisis por *SAM*, mostraron diferencias significativas en su expresión entre las muestras experimentales. Mediante las herramientas informáticas *Cluster* y *JavaTreeview*, pudimos agrupar las muestras tumorales y visualizar los resultados, respectivamente. Cada columna representa una muestra experimental, las filas representan los genes que se obtuvieron luego del análisis, y cada celda refleja la mediana centrada de la intensidad de fluorescencia (\log_2 Cy5/Cy3) del gen correspondiente en el *array* apropiado. La intensidad de cada celda, representa la expresión relativa de cada gen en cada muestra experimental. Celdas en negro: genes que no cambian respecto a la mediana, celdas en rojo: genes positivamente expresados, celdas en verde: genes negativamente expresados, celdas en gris: datos perdidos para ese gen.

VI. Apéndice

Tabla 3.3. Genes diferencialmente expresados entre tumores C4-HI y C4-HD creciendo con MPA

Genes sobreexpresados en tumores C4-HI	Gene symbol	Fold	Genes sobreexpresados en tumores C4-HD +MPA	Gene symbol	Fold
sclerostin domain containing 1	Sostdc1	127.4	chloride channel calcium activated 3	Clca3	60,06
melanoma antigen	Mela	31.5	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	Cyp2f2	44,33
solute carrier family 47, member 1	Slc47a1	12.9	transmembrane protein 16A	Tmem16a	36,62
aquaporin 5	Aqp5	9.4	defensin beta 1	Defb1	26,43
inactive X specific transcripts	Xist	8.6	alkaline phosphatase 2, liver	Akp2	25,95
G protein-coupled receptor 177	Gpr177	8.5	matrix Gla protein	Mgp	21,28
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	Tnfrsf19	8.1	peptide YY	Pyy	20,25
ceruloplasmin	Cp	7.6	melanoma associated antigen (mutated) 1-like 1	Mum111	18,75
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	7.4	oncogene induced transcript 1	Oit1	16,39
platelet-derived growth factor, C polypeptide	Pdgfc	6.9	reproductive homeobox 2	Rhox2	16,31
fructose biphosphatase 2	Fbp2	6.4	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	Calca	16,18
roundabout homolog 1 (Drosophila)	Robo1	6.0	fibrinogen, gamma polypeptide	Fgg	15,04
insulin induced gene 1	Insig1	5.6	myosin, light polypeptide 7, regulatory	Myl7	14,44
adenylate cyclase 2	Adcy2	5.5	keratin complex 1, acidic, gene 15	Krt1-15	13,34
six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	Steap1	5.5	scinderin	Scin	12,94
chemokine orphan receptor 1	Cmkor1	5.4	intelectin a	Itlna	12,07
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	Serpina3g	5.1	mannosidase 1, alpha	Man1a	11,86
transmembrane protease, serine 2	Tmprss2	4.9	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	Kcnmb4	11,81
latrophilin 2	Lphn2	4.9	myeloid leukemia factor 1	Mlf1	5,39
glycoprotein m6b	Gpm6b	4.9	fibroblast growth factor 2	Fgf2	5,28
serum amyloid A 3	Saa3	4.8	complement component 4B (Chido blood group)	C4b	5,24
neurobeachin	Nbea	4.7	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	Celsr1	5,22
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)	Cdkn1b	4.6	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	Indo	5,17
polo-like kinase 2 (Drosophila)	Plk2	4.5	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	Pde2a	5,13
insulin-like growth factor 2 receptor	Igf2r	4.3	FMS-like tyrosine kinase 1	Flt1	5,09
neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	Neto2	4.3	solute carrier family 26, member 4	Slc26a4	5,04
adrenergic receptor kinase, beta 2	Adrbk2	4.3	ADP-ribosyltransferase 3	Art3	5,00
synaptotagmin-like 2	Syt2	4.1	acyl-CoA thioesterase 5	Acot5	4,92
aortic preferentially expressed gene 1	Apeg1	3.9	ADP-ribosylation factor 4-like	Arfl4	4,91
carboxypeptidase X 2 (M14 family)	Cpxm2	3.9	glutathione peroxidase 2	Gpx2	4,87
TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1	Traf3ip1	3.9	gamma-aminobutyric acid (GABA-C) receptor, subunit rho 1	Gabbr1	4,83
calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 3	Cacna2d3	3.8	NK6 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)	Nkx6-3	4,80
neuronal guanine nucleotide exchange factor	Ngef	3.8	apolipoprotein F	Apof	4,79
SET and MYND domain containing 3	Smyd3	3.8	homeo box B13	Hoxb13	4,78
single-stranded DNA binding protein 2	Ssbp2	3.7	glutathione S-transferase, theta 2	Gstt2	4,44
small cell adhesion glycoprotein	Smagp	3.7	polycystic kidney disease 2-like 1	Pkd21l1	4,44
anthrax toxin receptor 1	Antxr1	3.7	apoptosis-associated tyrosine kinase	Aatk	4,38
transcription elongation factor A (SII), 3	Tcea3	3.7	ribosomal protein S6 kinase-like 1	Rps6k1l	4,34
angiopoietin 2	Angpt2	3.3	desmuslin	Dmn	4,33
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	3.1	peroxisome proliferator activated receptor binding protein	Pparbp	4,33
phospholipase C, beta 1	Plcb1	3.1	protein kinase C, mu	Prkcm	4,18
low density lipoprotein receptor-related protein 11	Lrp11	3.1	growth hormone receptor	Ghr	2,93
matrix metalloproteinase 3	Mmp3	3.0	matrix metalloproteinase 2	Mmp2	2,87
matrix metalloproteinase 13	Mmp13	2.5	coagulation factor III	F3	2,57
beta-gamma crystallin domain containing 3	Crybg3	2.5	procollagen, type VIII, alpha 1	Col8a1	2,57
pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1	Plekhg1	2.5	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	Zkscan1	2,56
runx related transcription factor 2	Runx2	2.5	carbonyl reductase 2	Cbr2	2,56
syndecan 4	Sdc4	2.4	EGL nine homolog 2 (C. elegans)	Egln2	2,55
cold inducible RNA binding protein	Cirbp	2.4	platelet-derived growth factor receptor-like	Pdgfrl	2,55
cyclin-dependent kinase 6	Cdk6	2.4	hepatocyte nuclear factor 4, gamma	Hnf4g	2,08
matrix metalloproteinase 8	Mmp8	2.2	phosphatase and tensin homolog	Pten	2,05
S100 calcium binding protein A4	S100a4	1.9	dynamins 1	Dnm1	2,03
stromal cell derived factor 2	Sdf2	1.8	acyl-CoA thioesterase 1	Acot1	2,03
matrix metalloproteinase 9	Mmp9	1.8	breast cancer anti-estrogen resistance 3	Bcar3	1,97
connective tissue growth factor	Ctgf	1.6	granzyme A	Gzma	1,97
vascular endothelial growth factor B	Vegfb	1.5	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	Hif1an	1,77

Tabla 3.4. Genes diferencialmente expresados entre tumores C4-HI y C4-HD -MPA

Genes sobreexpresados en tumores C4-HI	Gene symbol	Fold	Genes sobreexpresados en tumores C4-HD -MPA	Gene symbol	Fold
sclerostin domain containing 1	Sostdc1	105.8	chloride channel calcium activated 3	Clca3	77,94
melanoma antigen	Mela	29.5	transmembrane protein 16A	Tmem16a	36,72
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	7.5	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 25	Cyp3a25	32,89
G protein-coupled receptor 177	Gpr177	7.0	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	Cyp2f2	25,57
ceruloplasmin	Cp	7.0	melanoma associated antigen (mutated) 1-like 1	Mum111	20,85
fructose biphosphatase 2	Fbp2	6.6	mannosidase 1, alpha	Man1a	20,33
roundabout homolog 1 (Drosophila)	Robo1	6.0	alkaline phosphatase 2, liver	Akp2	19,81
insulin induced gene 1	Insig1	5.9	peptide YY	Pyy	18,09
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	Tnfrsf19	5.4	reproductive homeobox 2	Rhox2	17,11
six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	Steap1	5.3	scinderin	Scin	15,12
serum amyloid A 3	Saa3	5.1	keratin complex 1, acidic, gene 15	Krt1-15	14,71
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)	Cdkn1b	5.0	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 8	Chst8	12,85
leucine rich repeat neuronal 6A	Lrrn6a	5.0	oncoprotein induced transcript 1	Oit1	12,18
platelet-derived growth factor, C polypeptide	Pdgfc	4.9	solute carrier family 35, member F3	Slc35f3	12,16
inactive X specific transcripts	Xist	4.9	protein kinase C, mu	Prkcm	12,05
arginase 1, liver	Arg1	4.6	myosin, light polypeptide 7, regulatory	My17	11,88
chemokine orphan receptor 1	Cmkor1	4.6	relaxin 1	Rln1	11,87
neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	Neto2	4.5	cingulin-like 1	Cgn11	10,49
adenylate cyclase 2	Adcy2	4.3	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	Glul	10,33
DIX domain containing 1	Dixdc1	4.3	defensin beta 1	Defb1	10,16
neurobeachin	Nbea	4.2	procollagen C-endopeptidase enhancer protein	Pcolce	10,03
Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	Cited1	4.2	bone morphogenetic protein 3	Bmp3	7,25
carboxypeptidase X 2 (M14 family)	Cpxm2	4.1	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	Gadd45g	6,66
insulin-like growth factor 2 receptor	Igf2r	3.3	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	Calca	5,64
single-stranded DNA binding protein 2	Ssbp2	3.2	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Gadd45a	5,31
CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	Ccrn4l	3.2	Von Willebrand factor homolog	Vwf	4,06
anthrax toxin receptor 1	Antxr1	3.2	epithelial stromal interaction 1 (breast)	Epsti1	4,01
ubiquitin specific peptidase 3	Usp3	3.2	fibroblast growth factor 15	Fgf15	3,77
glycoprotein m6b	Gpm6b	3.1	gene regulated by estrogen in breast cancer protein	Greb1	3,77
aortic preferentially expressed gene 1	Apeg1	3.1	nuclear antigen Sp100	Sp100	3,57
angiopoietin 2	Angpt2	3.1	synaptonemal complex central element protein 2	Syce2	3,54
matrix metalloproteinase 3	Mmp3	3.1	matrix metalloproteinase 2	Mmp2	3,53
odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila)	Odz1	2.5	platelet-derived growth factor receptor-like	Pdgfrl	3,51
wingless-related MMTV integration site 6	Wnt6	2.5	apoptosis-associated tyrosine kinase	Aatk	3,51
acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	Acs13	2.4	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	Mst1	3,28
matrix metalloproteinase 10	Mmp10	2.4	ATPase, class I, type 8B, member 1	Atp8b1	3,27
cAMP responsive element binding protein 5	Creb5	2.3	prion protein	Prnp	3,26
secreted frizzled-related sequence protein 2	Sfrp2	2.3	glutathione peroxidase 2	Gpx2	3,25
runx related transcription factor 2	Runx2	2.3	tocopherol (alpha) transfer protein	Ttpa	3,02
nuclear factor I/B	Nfib	2.3	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	3,02
wingless related MMTV integration site 10a	Wnt10a	2.3	ornithine decarboxylase, structural 1	Odc1	3,01
angiopoietin-like 6	Angptl6	2.2	tryptase alpha/beta 1	Tpsab1	2,86
proteolipid protein 2	Plp2	2.2	early growth response 1	Egr1	2,85
thioesterase superfamily member 2	Them2	2.2	calbindin 2	Calb2	2,85
chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	Chaf1b	2.2	coagulation factor III	F3	2,79
chemokine (C-X-C motif) receptor 6	Cxcr6	2.2	growth hormone receptor	Ghr	2,73
vascular endothelial growth factor A	Vegfa	2.1	hepatocyte nuclear factor 4, gamma	Hnf4g	2,72
transforming growth factor alpha	Tgfa	2.1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	Aldh1a1	2,69
matrix metalloproteinase 25	Mmp25	1.9	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	Mst1r	2,32
matrix metalloproteinase 9	Mmp9	1.7	phosphatase and tensin homolog	Pten	2,21
connective tissue growth factor	Ctgf	1.6	nuclear receptor co-repressor 2	Ncor2	2,08
bone morphogenetic protein 2	Bmp2	1.5	Max protein	Max	2,08
Fanconi anemia, complementation group L	Fancl	1.5	Trp53 inducible protein 11	Trp53i11	1,99
mitochondrial ribosome recycling factor	Mrrf	1.5	mast cell protease 4	Mcpt4	1,99
cyclin I	Ccni	1.5	estrogen related receptor, alpha	Esrra	1,99

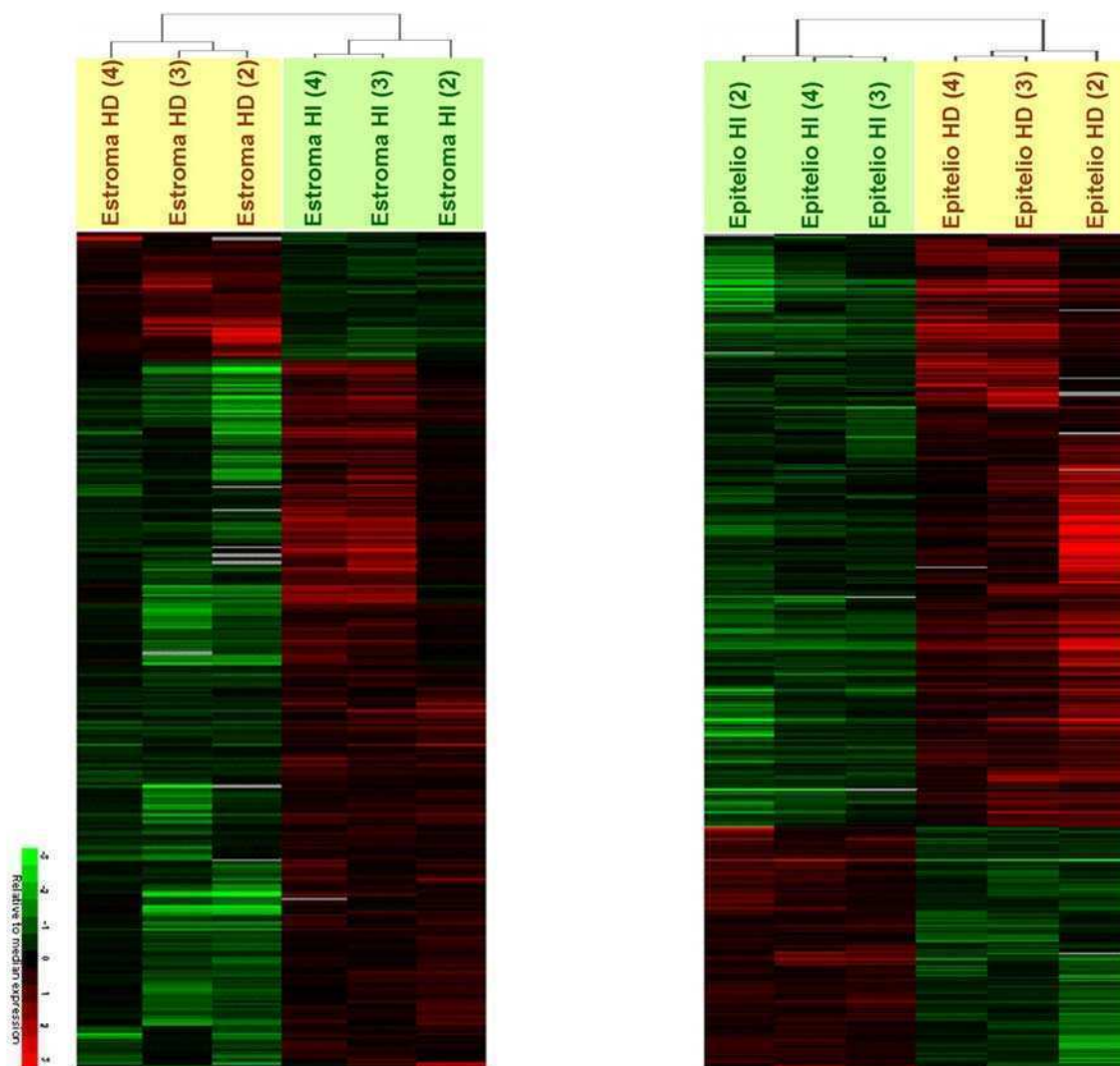


Figura 7.3. Agrupamiento de las muestras estromales y epiteliales obtenidas por *LCM* a partir de tumores C4-HI y C4-HD +MPA, según sus patrones de expresión génica. Utilizamos los 413 genes específicos del estroma y los 1100 genes específicos del epitelio, obtenidos luego de comparar los genes que mostraron diferencias significativas en su expresión en cada compartimento tumoral por *SAM*. Mediante las herramientas informáticas *Cluster* y *JavaTreeView*, pudimos agrupar las muestras estromales (izquierda) y epiteliales (derecha), y visualizar los resultados respectivamente. Cada columna representa una muestra experimental, las filas representan los genes que se obtuvieron luego del análisis, y cada celda refleja la mediana centrada de la intensidad de fluorescencia (\log_2 Cy5/Cy3) del gen correspondiente en el *array* apropiado. La intensidad de cada celda, representa la expresión relativa de cada gen en cada muestra experimental. Celdas en negro: genes que no cambian respecto a la mediana, celdas en rojo: genes positivamente expresados, celdas en verde: genes negativamente expresados, celdas en gris: datos perdidos para ese gen.

Tabla 3.6. Genes específicamente expresados en el estroma HD o HI

<i>Genes sobreexpresados en el estroma HI</i>	<i>Fold</i>	<i>Genes sobreexpresados en el estroma HD</i>	<i>Fold</i>
matrix metalloproteinase 10	6,06	stimulated by retinoic acid gene 6	13,9
carboxypeptidase X 2 (M14 family)	5,78	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B	8,35
programmed cell death 1	5,31	kinesin family member 5C	7,50
killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2	5,10	glycosylation dependent cell adhesion molecule 1	6,18
angiopoietin 2	4,92	RIKEN cDNA 0610027O18 gene	5,11
T cell receptor gamma chain	4,73	fem-1 homolog c (C.elegans)	4,14
chemokine (C-X-C motif) receptor 6	4,45	RIKEN cDNA 4930542N07 gene	3,97
EH-domain containing 3	4,40	expressed sequence AI481500	3,74
RIKEN cDNA 1100001H23 gene	4,34	hypothetical protein 8430427K15	3,24
cDNA sequence BC034097	4,22	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	3,08
CD48 antigen	4,14	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	2,99
killer cell lectin-like receptor, subfamily D, member 1	4,10	Down syndrome critical region homolog 6 (human)	2,88
matrix metalloproteinase 13	3,99	adducin 2 (beta)	2,85
RIKEN cDNA 0610007L05 gene	3,99	laminin, alpha 2	2,78
cholesterol 25-hydroxylase	3,96	tektin 2	2,50
interleukin 12 receptor, beta 1	3,95	thyroid hormone receptor associated protein 2	2,43
nidogen 2	3,91	protein kinase, lysine deficient 4	2,42
matrix metalloproteinase 9	3,86	RasGEF domain family, member 1A	2,27
procollagen, type XIII, alpha 1	3,85	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isomerase 3	2,21
RIKEN cDNA 0610012K22 gene	3,84	suppressor of cytokine signaling 2	2,18
DNA segment, Chr 7, Brigham & Women's Genetics 0421 expressed	3,76	RIKEN cDNA 2310061A22 gene	2,13
RIKEN cDNA 2210407C18 gene	3,76	RIKEN cDNA 6720477E09 gene	2,11
hexosaminidase B	3,66	adiponutrin	2,06
tissue inhibitor of metalloproteinase 3	3,61	RIKEN cDNA 1700066C05 gene	1,99
elastin microfibril interfacer 3	3,60	RIKEN cDNA 3110043A19 gene	1,98
B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b	3,59	cDNA sequence BC052066	1,96
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G, member 1	3,52	cDNA sequence BC028975	1,93
CD244 natural killer cell receptor 2B4	3,49	solute carrier family 35, member E3	1,92
cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	3,43	syntaxin 5A	1,92
protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	3,37	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5	1,90
CD79B antigen	3,37	torsin family 1, member B	1,90
cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	3,29	spinocerebellar ataxia 2 homolog (human)	1,88
CD8 antigen, alpha chain	3,25	F-box and leucine-rich repeat protein 3a	1,87
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 8	3,21	RIKEN cDNA 6330437E22 gene	1,86
cell adhesion molecule 1	3,11	RB1-inducible coiled-coil 1	1,86
interleukin 1 beta	3,07	profilin family, member 4	1,85
immunoglobulin superfamily, member 7	3,06	elongation factor RNA polymerase II	1,82
immunoglobulin superfamily, member 6	3,05	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1	1,82
acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	3,04	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)-like	1,82
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 5	3,03	RIKEN cDNA 5730453I16 gene	1,81
G-protein coupled receptor 25	2,97	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	1,77
hepatitis A virus cellular receptor 2	2,95	RIKEN cDNA 1300007L22 gene	1,76
integrin beta 7	2,90	SH2-B PH domain containing signaling mediator 1	1,68
matrix metalloproteinase 3	2,85	RIKEN cDNA A530016O06 gene	1,68
cathepsin S	2,84	membrane protein, palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3)	1,66
integrin alpha X	2,84	RIKEN cDNA 4930572I07 gene	1,64
allograft inflammatory factor 1	2,76	ATPase, Ca+++-sequestering	1,63
CD72 antigen	2,73	cDNA sequence BC014695	1,61
immunity-associated protein	2,67	DNA segment, Chr 13, Wayne State University 123, expressed	1,57
procollagen, type IV, alpha 1	2,58	RIKEN cDNA 2300002G24 gene	1,57
apelin	2,53	RIKEN cDNA 2900084F20 gene	1,55
claudin 7	2,52	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 39	1,53
Rho GTPase activating protein 15	2,52	cullin-associated and neddylation-dissociated 2 (putative)	1,51
mitogen activated protein kinase kinase kinase 8	2,44	tocopherol (alpha) transfer protein	
integrin alpha 8	2,34	ciliary neurotrophic factor	1,50
glycoprotein, synaptic 2	2,34	solute carrier family 37 (glycerol-6-phosphate transporter), member 4	1,49
progesterone receptor	2,36		
fibroblast growth factor inducible 15	2,27		
CD3 antigen, gamma polypeptide	2,27		
leukocyte cell-derived chemotaxin 2	2,19		
desmoplakin	2,18		
CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	2,14		
interferon gamma inducible protein 30	2,08		
tumor necrosis factor	1,70		

Tabla 3.9. Genes específicamente expresados en el epitelio HD o HI

Genes sobreexpresados en el epitelio HI	Fold	Genes sobreexpresados en el epitelio HD	Fold
inactive X specific transcripts	17,03	mannosidase 1, alpha	17,9
RIKEN cDNA 5031439A09 gene	9,21	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	17,3
six transmembrane epithelial antigen of the prostate	6,86	solute carrier organic anion transporter family, member 3a1	15,9
synaptotagmin-like 2	6,19	defensin beta 1	15,5
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	6,10	nucleoporin 62	14,4
platelet-derived growth factor, C polypeptide	5,68	FMS-like tyrosine kinase 1	14,1
transmembrane 4 superfamily member 1	5,64	RIKEN cDNA A930031E15 gene	14,0
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	5,38	copine VIII	12,7
stanniocalcin 2	5,36	intelectin	11,6
transmembrane protease, serine 2	4,85	RIKEN cDNA 1300004K21 gene	11,5
mex3 homolog B (C. elegans)	4,56	ORM1-like 3 (S. cerevisiae)	10,9
runt related transcription factor 2	4,02	Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila)	10,0
neuronal guanine nucleotide exchange factor	3,88	pore forming protein-like	9,60
histocompatibility 2, class II, locus Mb1	3,85	serologically defined colon cancer antigen 1	8,87
DIX domain containing 1	3,77	protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein	8,44
leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	3,59	protein kinase C, nu	8,26
odontogenic, ameloblast associated	3,56	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	8,15
thymosin, beta 4, X chromosome	3,49	phosphoglucomutase 5	8,06
RIKEN cDNA 5033430115 gene	3,41	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8A	7,72
LIM and cysteine-rich domains 1	3,27	ADP-ribosyltransferase 3	7,62
phospholipid scramblase 4	3,26	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	7,21
RUN and FYVE domain containing 1	3,23	zinc finger protein 265	7,17
stromal cell derived factor 2	3,12	FK506 binding protein 9	7,17
histocompatibility 2, class II antigen E alpha	2,97	splicing factor 3b, subunit 2	7,16
chemokine orphan receptor 1	2,86	Emu1 gene	7,06
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	2,84	homeo box C6	6,84
methyltransferase-like 1 (S. cerevisiae)			
protocadherin beta 17	2,76	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	6,80
serum-inducible kinase	2,74	scinderin	6,63
leucine-rich repeat-containing 8	2,61	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1	6,61
RIKEN cDNA 2310037P21 gene	2,59	chromobox homolog 1 (Drosophila HP1 beta)	6,58
interleukin 1 receptor-like 1 ligand	2,56	ADP-ribosyltransferase 1	6,49
RIKEN cDNA 2900075A18 gene	2,56	speckle-type POZ protein	6,05
deafness, autosomal dominant 5 homolog (human)	2,55	complement component 4 (within H-2S)	5,76
anthrax toxin receptor 1	2,48	damage specific DNA binding protein 2	5,69
CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	2,46	insulin-like growth factor I receptor	5,68
calcium channel, voltage dependent, alpha2/delta subunit 3	2,46	mitochondrial ribosomal protein S24	5,64
ribosomal protein L7	2,43	apolipoprotein B48 receptor	5,60
hexosaminidase A	2,41	peroxiredoxin 4	5,49
protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator	2,36	ovary testis transcribed	5,42
RAB28, member RAS oncogene family	2,27	myeloid leukemia factor 1	5,22
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	2,22	deleted in neuroblastoma 5	4,92
protein inhibitor of activated STAT 1	2,22	apoptosis-associated tyrosine kinase	4,87
insulin-like growth factor 2 receptor	2,19	T-cell leukemia, homeobox 2	4,74
ras homolog gene family, member U	2,18	Kirsten rat sarcoma oncogene 2, expressed	4,43
transmembrane protein 9	2,17	topoisomerase (DNA) II alpha	4,26
amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, 2	2,16	small proline-rich protein 2A	4,13
destrin	2,16	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	4,01
importin 8	2,14	Kruppel-like factor 13	4,00
ring finger protein (C3HC4 type) 19	2,14	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha II polypeptide	3,88
Down syndrome critical region gene 3	2,12	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	3,86
CD97 antigen	2,12	F-box and WD-40 domain protein 7, archipelago homolog (Drosophila)	3,81
death-associated protein	2,10	claudin 15	3,71
F-box and WD-40 domain protein 1B	2,06	caldesmon 1	3,57
immediate early response 3	2,05	peroxisome proliferator activated receptor binding protein	3,57
RAB24, member RAS oncogene family	2,04	angiopoietin-like 4	3,42
prostaglandin E synthase	2,04	fibroblast growth factor 15	3,30
CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	2,02	baculoviral IAP repeat-containing 2	3,23
catenin, beta like 1	1,99	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	3,20
interleukin 6 signal transducer	1,98	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2	3,06
serologically defined colon cancer antigen 10	1,91	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	3,02
cyclin G2	1,89	platelet-derived growth factor receptor-like	2,95
cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	1,87	procollagen, type XI, alpha 2	2,83
cytosolic ovarian carcinoma antigen 1	1,85	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	2,83
RAB9, member RAS oncogene family	1,71	cyclin D1	2,66
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)	1,71	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	2,41
		phosphatase and tensin homolog	1,65

Tabla 3.12. Genes compartidos entre estroma y epitelio tumoral

Genes sobreexpresados en tumores HI	Fold		Genes sobreexpresados en tumores HD	Fold	
	Estroma	Epitelio		Estroma	Epitelio
sclerostin domain containing 1	43.8	199	chloride channel calcium activated 3	369	543
melanoma antigen	34.6	36.7	reproductive homeobox 2	29.1	36.8
ceruloplasmin	9.5	7.0	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	27.6	56.9
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	8.3	6.1	peptide YY	25.1	29.0
interferon gamma	6.9	2.9	keratin complex 1, acidic, gene 15	23.6	24.9
aquaporin 5	6.6	5.3	oncprotein induced transcript 1	21.8	45.5
similar to macrophage activation 2	6.5	3.0	alkaline phosphatase 2, liver	12.9	12.6
formyl peptide receptor, related sequence 2	6.4	2.9	homeo box C9	12.4	43.5
histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	6.0	3.0	bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1	11.9	19.9
SLAM family member 8	5.9	5.0	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2	10.8	14.4
signal-regulatory protein beta 1	5.7	2.6	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	10.7	8.8
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	4.8	2.1	solute carrier family 26, member 4	9.5	10.4
interferon gamma induced GTPase	4.8	3.3	chemokine (C-C motif) ligand 27	9.1	8.2
EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	4.7	4.4	PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing B	8.7	12.8
wingless related MMTV integration site 10a	4.6	3.1	kinesin family member 1B	8.6	12.4
microsomal glutathione S-transferase 3	4.3	5.1	solute carrier family 35, member F3	8.4	9.4
toll-like receptor 2	4.2	2.7	RIKEN cDNA 3830417A13 gene	8.2	28.4
expressed sequence AI427122	4.22	4.31	vitelliform macular dystrophy 2-like 3	8.2	10.5
palmitoyl-protein thioesterase 1	4.2	2.1	tripartite motif protein 29	8.2	14.0
histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	4.2	3.1	stimulated by retinoic acid gene 8	7.7	14.1
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12	4.1	8.4	keratin complex 1, acidic, gene 1	7.6	8.9
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5	4.1	4.5	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	7.3	12.7
odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila)	4.0	5.0	ankyrin repeat and KH domain containing 1	7.1	8.2
chemokine (C-C motif) ligand 3	3.9	3.7	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	7.0	10.6
solute carrier family 14 (urea transporter), member 1	3.9	3.3	RIKEN cDNA C130026I21 gene	6.9	10.1
G protein-coupled receptor 1	3.9	3.0	interleukin 11 receptor, alpha chain 1	6.6	7.2
SET and MYND domain containing 3	3.8	5.5	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 25	6.4	5.5
claudin 4	3.8	3.1	CEA-related cell adhesion molecule 1	6.2	4.7
fructose bisphosphatase 2	3.7	4.5	hypothetical LOC546232	6.2	5.8
aspartylglucosaminidase	3.7	2.7	matrilin 2	5.9	6.0
annexin A3	3.7	3.5	glutathione peroxidase 2	5.8	5.9
ubiquitin specific peptidase 3	3.7	4.9	ets homologous factor	5.7	6.8
interferon inducible GTPase 2	3.6	3.1	myosin, light polypeptide 7, regulatory	5.6	6.2
phospholipase C, beta 1	3.6	7.5	carbonyl reductase 2	5.5	4.2
DNA-damage-inducible transcript 4-like	3.5	6.4	histone 3, H2ba	5.5	9.0
histocompatibility 2, class II, locus DMA	3.5	1.9	endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 2	5.4	9.3
cellular retinoic acid binding protein I	3.5	2.7	nuclear factor I/A	5.19	6.44
acid phosphatase 5, tartrate resistant	3.5	1.8	Fibrinogen, gamma polypeptide	4.7	28.3
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	3.10	4.05	Von Willebrand factor homolog	4.28	6.19
lactamase, beta 2	2.85	2.96	fibroblast growth factor 2	4.14	6.86
mitogen activated protein kinase kinase 6	2.73	4.20	matrix metalloproteinase 2	4.10	5.54
interleukin 18 receptor 1	2.64	3.60	insulin-like growth factor binding protein 6	3.99	5.02
serum/glucocorticoid regulated kinase	2.51	3.51	early growth response 1	3.68	3.16
phosphatidylinositol glycan, class P	2.48	4.12	cysteine dioxygenase 1, cytosolic	3.52	2.98
syndecan binding protein (syntenin) 2	2.42	2.11	transcription factor 1	3.42	4.87
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	2.38	2.66	transferrin receptor 2	3.30	14.38
nerve growth factor, beta	2.31	2.06	junction adhesion molecule 4	3.20	2.39
neurobeachin	2.31	5.65	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	3.17	3.70
serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	2.19	3.54	reticulocalbin 1	3.00	15.56
matrix metalloproteinase 25	2.15	1.97	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1	2.92	8.10
integrin alpha 6	2.11	2.10	kelch-like 13 (Drosophila)	2.84	8.13
BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3	2.09	1.77	procollagen C-endopeptidase enhancer protein	2.75	9.99
cyclin B2	2.07	2.52	FGFR1 oncogene partner 2	2.67	2.38
cystatin B	2.06	2.34	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	2.39	11.47
p21 (CDKN1A)-activated kinase 1	2.05	2.23	Jun oncogene	2.30	2.37
metastasis associated 3	2.03	2.24	cingulin-like 1	2.13	14.41
RAP2C, member of RAS oncogene family	1.97	1.82	procollagen, type VIII, alpha 1	1.99	8.69
wingless-related MMTV integration site 6	1.97	2.29	signal transducer and activator of transcription 3	1.88	2.57
			lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	1.80	6.57

PARTE VI I

BI BLI OGRAFI A

- '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. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
- Ace,C.I. and Okulicz,W.C. (2004). Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 54.
- Actis,A.M., Caruso,S.P., and Levin,E. (1994). Estrogen receptor isoforms and progestin hormone dependence in a mouse mammary tumor model. *Int. J. Cancer* 58, 668-671.
- 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.
- Alves,P.M., Faure,O., Graff-Dubois,S., Cornet,S., Bolonakis,I., Gross,D.A., Miconnet,I., Chouaib,S., Fizazi,K., Soria,J.C., Lemonnier,F.A., and Kosmatopoulos,K. (2006). STEAP, a prostate tumor antigen, is a target of human CD8+ T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 1515-1523.
- Anderberg,C., Li,H., Fredriksson,L., Andrae,J., Betsholtz,C., Li,X., Eriksson,U., and Pietras,K. (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 69, 369-378.
- Arai,K., Takano,S., Teratani,T., Ito,Y., Yamada,T., and Nozawa,R. (2008). S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Curr. Cancer Drug Targets.* 8, 243-252.
- Ardi,V.C., Van den Steen,P.E., Opendakker,G., Schweighofer,B., Deryugina,E.I., and Quigley,J.P. (2009). Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 25854-25866.
- Arnold,S.F., Obourn,J.D., Jaffe,H., and Notides,A.C. (1994). Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 8, 1208-1214.
- Arnold,S.F., Vorojeikina,D.P., and Notides,A.C. (1995). Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *J. Biol. Chem.* 270, 30205-30212.
- Arnoni,V., Bottino,M.C., Hewitt,S.C., Molinolo A, Gutkind,S., Lanari C, and Novaro,V. (2007). Involvement of PI3K/Akt and Erk1/2 pathways on the regulation of estrogen and progesterone receptor expression in murine mammary tumors. 98th AACR Annual Meeting-- Apr 14-18, 2007; Los Angeles, CA.
- 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.
- Balasenthil,S., Barnes,C.J., Rayala,S.K., and Kumar,R. (2004). Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett.* 567, 243-247.

VII. Bibliografia

- Ballare,C., Uhrig,M., Bechtold,T., Sancho,E., Di Domenico,M., Migliaccio,A., Auricchio,F., and Beato,M. (2003). Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 23, 1994-2008.
- Barcellos-Hoff,M.H. and Ravani,S.A. (2000). Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res.* 60, 1254-1260.
- Baulieu,E.E. (1978). Cell membrane, a target for steroid hormones. *Mol. Cell Endocrinol.* 12, 247-254.
- Beato,M., Herrlich,P., and Schutz,G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857.
- 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.
- Beck,C.A., Zhang,Y., Weigel,N.L., and Edwards,D.P. (1996). Two types of anti-progestins have distinct effects on site-specific phosphorylation of human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 1209-1217.
- Behrens,D., Gill,J.H., and Fichtner,I. (2007). Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 274, 19-29.
- Beral,V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-427.
- Berkenstam,A., Glaumann,H., Martin,M., Gustafsson,J.A., and Norstedt,G. (1989). Hormonal regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in T47Dco and MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 3, 22-28.
- Bhati,R., Patterson,C., Livasy,C.A., Fan,C., Ketelsen,D., Hu,Z., Reynolds,E., Tanner,C., Moore,D.T., Gabrielli,F., Perou,C.M., and Klauber-Demore,N. (2008). Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *Am. J. Pathol.* 172, 1381-1390.
- Bhowmick,N.A. and Moses,H.L. (2005). Tumor-stroma interactions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 97-101.
- Bhowmick,N.A., Neilson,E.G., and Moses,H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- Bjornstrom,L., Kilic,E., Norman,M., Parker,M.G., and Sjoberg,M. (2001). Cross-talk between Stat5b and estrogen receptor-alpha and -beta in mammary epithelial cells. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 93-106.
- Blanco-Aparicio,C., Renner,O., Leal,J.F., and Carnero,A. (2007). PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28, 1379-1386.
- Bocchinfuso,W.P. and Korach,K.S. (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 2, 323-334.
- 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. (2004). Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem.* 40, 105-120.
- Boonyaratanakornkit,V. and Edwards,D.P. (2007). Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin. Reprod. Med.* 25, 139-153.

VII. Bibliografia

- Boonyaratanakornkit,V., McGowan,E., Sherman,L., Mancini,M.A., Cheskis,B.J., and Edwards,D.P. (2007). The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol. Endocrinol.* *21*, 359-375.
- 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.
- Bottcher,R.T. and Niehrs,C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr. Rev.* *26*, 63-77.
- Bottino,M.C., Cerliani,J.P., Rojas,P., Giulianelli,S., Soldati,R., Mondillo,C., Pignataro,O., Calvo,J.C., Gutkind,S., Amornphimolthan,P., Molinolo,A.A., Luthy,I.A., and Lanari,C. (2009). Classical membrane progesterone receptors in murine mammary carcinomas: Agonistic effects of progestins and RU-486 mediating rapid non-genomic effects. *Endocr Relat Cancer*. - en revisión.
- Bourdeau,V., Deschenes,J., Metivier,R., Nagai,Y., Nguyen,D., Bretschneider,N., Gannon,F., White,J.H., and Mader,S. (2004). Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1411-1427.
- Bray,J.D., Jelinsky,S., Ghatge,R., Bray,J.A., Tunkey,C., Saraf,K., Jacobsen,B.M., Richer,J.K., Brown,E.L., Winneker,R.C., Horwitz,K.B., and Lyttle,C.R. (2005). Quantitative analysis of gene regulation by seven clinically relevant progestins suggests a highly similar mechanism of action through progesterone receptors in T47D breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *97*, 328-341.
- 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.
- Burkitt,K., Chun,S.Y., Dang,D.T., and Dang,L.H. (2009). Targeting both HIF-1 and HIF-2 in human colon cancer cells improves tumor response to sunitinib treatment. *Mol. Cancer Ther.*
- Butte,A. (2002). The use and analysis of microarray data. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 951-960.
- Campbell,R.A., Bhat-Nakshatri,P., Patel,N.M., Constantinidou,D., Ali,S., and Nakshatri,H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* *276*, 9817-9824.
- 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.
- Carter,A.C., Sedransk,N., Kelley,R.M., Ansfield,F.J., Ravdin,R.G., Talley,R.W., and Potter,N.R. (1977). Diethylstilbestrol: recommended dosages for different categories of breast cancer patients. Report of the Cooperative Breast Cancer Group. *JAMA* *237*, 2079-8.
- Casey,T., Bond,J., Tighe,S., Hunter,T., Lintault,L., Patel,O., Eneman,J., Crocker,A., White,J., Tessitore,J., Stanley,M., Harlow,S., Weaver,D., Muss,H., and Plaut,K. (2009). Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *114*, 47-62.
- Castoria,G., Migliaccio,A., Bilancio,A., Di Domenico,M., de Falco,A., Lombardi,M., Fiorentino,R., Varricchio,L., Barone,M.V., and Auricchio,F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* *20*, 6050-6059.
- Catalano,S., Mauro,L., Marsico,S., Giordano,C., Rizza,P., Rago,V., Montanaro,D., Maggiolini,M., Panno,M.L., and Ando,S. (2004). Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 19908-19915.
- Celis,J.E., Moreira,J.M., Cabezon,T., Gromov,P., Friis,E., Rank,F., and Gromova,I. (2005). Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid

VII. Bibliografia

in high risk breast cancer patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions. *Mol. Cell Proteomics*. 4, 492-522.

Cheang,M.C., van de,R.M., and Nielsen,T.O. (2008). Gene expression profiling of breast cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 67-97.

Chen,D., Pace,P.E., Coombes,R.C., and Ali,S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol. Cell Biol.* 19, 1002-1015.

Chiaradonna,F., Balestrieri,C., Gaglio,D., and Vanoni,M. (2008). RAS and PKA pathways in cancer: new insight from transcriptional analysis. *Front Biosci.* 13, 5257-5278.

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.

Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Chometon,G. and Jendrossek,V. (2009). Targeting the tumour stroma to increase efficacy of chemo- and radiotherapy. *Clin. Transl. Oncol.* 11, 75-81.

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.

Cicatiello,L., Addeo,R., Sasso,A., Altucci,L., Petrizzi,V.B., Borgo,R., Cancemi,M., Caporali,S., Caristi,S., Scafoglio,C., Teti,D., Bresciani,F., Perillo,B., and Weisz,A. (2004). Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol. Cell Biol.* 24, 7260-7274.

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.

Coleman,R.E. (2005). Bisphosphonates in breast cancer. *Ann. Oncol.* 16, 687-695.

Conneely,O.M., Mulac-Jericevic,B., and Lydon,J.P. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68, 771-778.

Cork,D.M., Lennard,T.W., and Tyson-Capper,A.J. (2008). Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10, 207.

Cotran,R.S., Kumar,V., Collins,T., and Robbins,S.L. (1999). *Robbins Pathologic Basis of Disease*. W B Saunders Co).

Couse,J.F., Curtis,H.S., and Korach,K.S. (2000). Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 287-296.

Couse,J.F., Lindzey,J., Grandien,K., Gustafsson,J.A., and Korach,K.S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613-4621.

Crawford,Y., Kasman,I., Yu,L., Zhong,C., Wu,X., Modrusan,Z., Kaminker,J., and Ferrara,N. (2009). PDGF-C Mediates the Angiogenic and Tumorigenic Properties of Fibroblasts Associated with Tumors Refractory to Anti-VEGF Treatment. *Cancer Cell* 15, 21-34.

VII. Bibliografia

- Cretu,A., Sha,X., Tront,J., Hoffman,B., and Liebermann,D.A. (2009). Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer Ther.* 7, 268-276.
- Daniel,A.R., Faivre,E.J., and Lange,C.A. (2007). Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 21, 2890-2906.
- Daniel,A.R., Knutson,T.P., and Lange,C.A. (2009). Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Mol. Cell Endocrinol.* 308, 47-52.
- 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.
- Davanloo,P., Rosenberg,A.H., Dunn,J.J., and Studier,F.W. (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 2035-2039.
- Davies,S.R., Watkins,G., Mansel,R.E., and Jiang,W.G. (2007). Differential expression and prognostic implications of the CCN family members WISP-1, WISP-2, and WISP-3 in human breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 14, 1909-1918.
- De Amicis,F., Zupo,S., Panno,M.L., Malivindi,R., Giordano,F., Barone,I., Mauro,L., Fuqua,S.A., and Ando,S. (2009). Progesterone receptor B recruits a repressor complex to a half-PRE site of the estrogen receptor alpha gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 23, 454-465.
- de Candia,P., Benera,R., and Solit,D.B. (2004). A role for Id proteins in mammary gland physiology and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 92, 81-94.
- 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.
- Dillon,R.L., White,D.E., and Muller,W.J. (2007). The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 26, 1338-1345.
- 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., Hagan,C.R., Knutson,T.P., Daniel,A.R., and Lange,C.A. (2009). Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. *Endocr. Relat Cancer* 16, 351-361.
- Duffy,M.J. (2005). Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin. Chem.* 51, 494-503.
- 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.
- Edwards,D.P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol* 67, 335-376.
- Edwards,D.P., Altmann,M., DeMarzo,A., Zhang,Y., Weigel,N.L., and Beck,C.A. (1995). Progesterone receptor and the mechanism of action of progesterone antagonists. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 449-458.

VII. Bibliografía

- Edwards,D.P., Wardell,S.E., and Boonyaratanakornkit,V. (2002). Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 173-186.
- Eeckhoute,J., Carroll,J.S., Geistlinger,T.R., Torres-Arzayus,M.I., and Brown,M. (2006). A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes Dev.* 20, 2513-2526.
- Eisen,M.B. and Brown,P.O. (1999). DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 303, 179-205.
- Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O., and Botstein,D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14863-14868.
- Elizalde,P., Guerra,F., Lanari,C., Pazos,P., Kornblihtt,A., and Charreau,E. (2000). Amplificación del oncogen c-erbB-2 en adenocarcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona. *Medicina (B. Aires)* 54, 555.
- 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
- Elizalde,P.V., Lanari,C., Molinolo,A.A., Guerra,F.K., Balana,M.E., Simian,M., Iribarren,A.M., and Charreau,E.H. (1998). Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67, 305-317.
- Ellmann,S., Sticht,H., Thiel,F., Beckmann,M.W., Strick,R., and Strissel,P.L. (2009). Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 2405-2426.
- Fabris,V.T., Benavides,F., Conti,C., Merani,S., and Lanari,C. (2005). Cytogenetic findings, Trp53 mutations, and hormone responsiveness in a medroxyprogesterone acetate induced murine breast cancer model. *Cancer Genet. Cytogenet.* 161, 130-139.
- 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.
- Faivre,E.J. and Lange,C.A. (2007). Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.* 27, 466-480.
- Fernandez-Valdivia,R., Mukherjee,A., Creighton,C.J., Buser,A.C., DeMayo,F.J., Edwards,D.P., and Lydon,J.P. (2008). Transcriptional response of the murine mammary gland to acute progesterone exposure. *Endocrinology* 149, 6236-6250.
- Finak,G., Bertos,N., Pepin,F., Sadekova,S., Souleimanova,M., Zhao,H., Chen,H., Omeroglu,G., Meterissian,S., Omeroglu,A., Hallett,M., and Park,M. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat. Med.* 14, 518-527.
- Findlay,D.M., Michelangeli,V.P., Moseley,J.M., and Martin,T.J. (1981). Calcitonin binding and degradation by two cultured human breast cancer cell lines (MCF 7 and T 47D). *Biochem. J.* 196, 513-520.
- Forster,C., Makela,S., Warri,A., Kietz,S., Becker,D., Hultenby,K., Warner,M., and Gustafsson,J.A. (2002). Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15578-15583.

VII. Bibliografia

- Franks,L.M. and Teich,N.M. (1997). Introduction to Cellular and Molecular Biology of Cancer., L.M.Franks and N.M.Teich, eds. Oxford University Press).
- Frasor,J., Danes,J.M., Komm,B., Chang,K.C., Lyttle,C.R., and Katzenellenbogen,B.S. (2003). Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144, 4562-4574.
- Fuller,A.P., Palmer-Toy,D., Erlander,M.G., and Sgroi,D.C. (2003). Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 8, 335-345.
- Galie,M., Sorrentino,C., Montani,M., Micossi,L., Di Carlo,E., D'Antuono,T., Calderan,L., Marzola,P., Benati,D., Merigo,F., Orlando,F., Smorlesi,A., Marchini,C., Amici,A., and Sbarbati,A. (2005). Mammary carcinoma provides highly tumourigenic and invasive reactive stromal cells. *Carcinogenesis* 26, 1868-1878.
- Gass,E.K., Leonhardt,S.A., Nordeen,S.K., and Edwards,D.P. (1998). The antagonists RU486 and ZK98299 stimulate progesterone receptor binding to deoxyribonucleic acid in vitro and in vivo, but have distinct effects on receptor conformation. *Endocrinology* 139, 1905-1919.
- Giangrande,P.H., Kimbrel,E.A., Edwards,D.P., and McDonnell,D.P. (2000). The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol. Cell Biol.* 20, 3102-3115.
- Gill,J.H., Kirwan,I.G., Seargent,J.M., Martin,S.W., Tijani,S., Anikin,V.A., Mearns,A.J., Bibby,M.C., Anthoney,A., and Loadman,P.M. (2004). MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas. *Neoplasia.* 6, 777-785.
- Gillespie,M.T., Thomas,R.J., Pu,Z.Y., Zhou,H., Martin,T.J., and Findlay,D.M. (1997). Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breast cancers. *Int. J. Cancer* 73, 812-815.
- Giordano,C., Cui,Y., Barone,I., Ando,S., Mancini,M.A., Berno,V., and Fuqua,S.A. (2009). Growth factor-induced resistance to tamoxifen is associated with a mutation of estrogen receptor alpha and its phosphorylation at serine 305. *Breast Cancer Res. Treat.*
- 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. (2008a). 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, 2518-2531.
- Giulianelli,S.J., Herschkowitz,J.I., Patel,V., Molinolo,A.A., Gutkind,S., Perou,C.M., and Lanari,C. (2008b). Gene expression profiles in epithelial and stromal cells from murine mammary tumors with different hormone dependence. 99th AACR Annual Meeting, San Diego, CA. USA.
- Gonzalez,L., Zambrano,A., Lazaro-Trueba,I., Lopez,E., Gonzalez,J.J., Martin-Perez,J., and Aranda,A. (2009). Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene* 28, 1298-1308.
- Goswami,S., Sahai,E., Wyckoff,J.B., Cammer,M., Cox,D., Pixley,F.J., Stanley,E.R., Segall,J.E., and Condeelis,J.S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 65, 5278-5283.
- Gouon-Evans,V., Rothenberg,M.E., and Pollard,J.W. (2000). Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development* 127, 2269-2282.
- Green,S., Kumar,V., Krust,A., Walter,P., and Chambon,P. (1986a). Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 2, 751-758.
- Green,S., Walter,P., Greene,G., Krust,A., Goffin,C., Jensen,E., Scrace,G., Waterfield,M., and Chambon,P. (1986b). Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J. Steroid Biochem.* 24, 77-83.

VII. Bibliografia

- Greene,G.L., Gilna,P., Waterfield,M., Baker,A., Hort,Y., and Shine,J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154.
- Greiser,C.M., Greiser,E.M., and Doren,M. (2005). Menopausal hormone therapy and risk of breast cancer: a meta-analysis of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Hum. Reprod. Update.* 11, 561-573.
- Guo,B., Godzik,A., and Reed,J.C. (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* 276, 2780-2785.
- Hagan,C.R., Faivre,E.J., and Lange,C.A. (2009). Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids* 74, 568-572.
- Hagihara,K., Wu-Peng,X.S., Funabashi,T., Kato,J., and Pfaff,D.W. (1994). Nucleic acid sequence and DNase hypersensitive sites of the 5' region of the mouse progesterone receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1093-1101.
- Hall,J.M. and McDonnell,D.P. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-5578.
- Hamada,T., Tashiro,K., Tada,H., Inazawa,J., Shirozu,M., Shibahara,K., Nakamura,T., Martina,N., Nakano,T., and Honjo,T. (1996). Isolation and characterization of a novel secretory protein, stromal cell-derived factor-2 (SDF-2) using the signal sequence trap method. *Gene* 176, 211-214.
- Hammes,S.R. and Levin,E.R. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr. Rev.* 28, 726-741.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hansen,C. and Braman,J. (1993). *Strategies* 6, 50-51.
- Hao,L., Zhang,C., Qiu,Y., Wang,L., Luo,Y., Jin,M., Zhang,Y., Guo,T.B., Matsushima,K., and Zhang,Y. (2007). Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett.* 253, 34-42.
- Hato,T., Tabata,M., and Oike,Y. (2008). The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc. Med.* 18, 6-14.
- Helguero,L.A., Viegas,M., Asaithamby,A., Shyamala,G., Lanari,C., and Molinolo,A.A. (2003). Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res. Treat.* 79, 379-390.
- Herschkowitz,J.I., Simin,K., Weigman,V.J., Mikaelian,I., Usary,J., Hu,Z., Rasmussen,K.E., Jones,L.P., Assefnia,S., Chandrasekharan,S., Backlund,M.G., Yin,Y., Khramtsov,A.I., Bastein,R., Quackenbush,J., Glazer,R.I., Brown,P.H., Green,J.E., Kopelovich,L., Furth,P.A., Palazzo,J.P., Olopade,O.I., Bernard,P.S., Churchill,G.A., Van Dyke,T., and Perou,C.M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.
- Hewitt,S.C. and Korach,K.S. (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction.* 125, 143-149.
- Hofseth,L.J., Raafat,A.M., Osuch,J.R., Pathak,D.R., Slomski,C.A., and Haslam,S.Z. (1999). Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84, 4559-4565.

VII. Bibliografia

- Hong,S.H., Nah,H.Y., Lee,J.Y., Gye,M.C., Kim,C.H., and Kim,M.K. (2004). Analysis of estrogen-regulated genes in mouse uterus using cDNA microarray and laser capture microdissection. *J. Endocrinol.* *181*, 157-167.
- Horwitz,K.B., Koseki,Y., and McGuire,W.L. (1978). Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* *103*, 1742-1751.
- Horwitz,K.B. and McGuire,W.L. (1979). Estrogen control of progesterone receptor induction in human breast cancer: role of nuclear estrogen receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.* *117*, 95-110.
- Hosack,D.A., Dennis,G., Jr., Sherman,B.T., Lane,H.C., and Lempicki,R.A. (2003). Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* *4*, R70.
- Hu,M. and Polyak,K. (2008). Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur. J. Cancer* *44*, 2760-2765.
- Hughes,D.E., Dai,A., Tiffée,J.C., Li,H.H., Mundy,G.R., and Boyce,B.F. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat. Med.* *2*, 1132-1136.
- Hunter,D.J., Kraft,P., Jacobs,K.B., Cox,D.G., Yeager,M., Hankinson,S.E., Wacholder,S., Wang,Z., Welch,R., Hutchinson,A., Wang,J., Yu,K., Chatterjee,N., Orr,N., Willett,W.C., Colditz,G.A., Ziegler,R.G., Berg,C.D., Buys,S.S., McCarty,C.A., Feigelson,H.S., Calle,E.E., Thun,M.J., Hayes,R.B., Tucker,M., Gerhard,D.S., Fraumeni,J.F., Jr., Hoover,R.N., Thomas,G., and Chanock,S.J. (2007). A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat. Genet.* *39*, 870-874.
- Hyder,S.M. and Stancel,G.M. (2002). Inhibition of progesterone-induced VEGF production in human breast cancer cells by the pure antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Lett.* *181*, 47-53.
- Imanishi,Y., Hu,B., Jarzynka,M.J., Guo,P., Elishaev,E., Bar-Joseph,I., and Cheng,S.Y. (2007). Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the alpha(5)beta(1) integrin-mediated pathway. *Cancer Res.* *67*, 4254-4263.
- 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).
- Ismail,P.M., DeMayo,F.J., Amato,P., and Lydon,J.P. (2004). Progesterone induction of calcitonin expression in the murine mammary gland. *J. Endocrinol.* *180*, 287-295.
- Iwasaki,K., Underwood,B., Herman,M., Dinda,S., Kodali,S., Kloosterboer,H.J., Hurd,C., and Moudgil,V.K. (1999). Effects of antiprogestins on the rate of proliferation of breast cancer cells. *Mol. Cell Biochem.* *198*, 141-149.
- 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.
- Jacobsen,B.M., Richer,J.K., Schittone,S.A., and Horwitz,K.B. (2002). New Human Breast Cancer Cells to Study Progesterone Receptor Isoform Ratio Effects and Ligand-independent Gene Regulation. *J. Biol. Chem.* *277*, 27793-27800.
- Jacobsen,B.M., Schittone,S.A., Richer,J.K., and Horwitz,K.B. (2005). Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol. Endocrinol.* *19*, 574-587.
- Jeong,J.W., Lee,K.Y., Kwak,I., White,L.D., Hilsenbeck,S.G., Lydon,J.P., and DeMayo,F.J. (2005). Identification of murine uterine genes regulated in a ligand-dependent manner by the progesterone receptor. *Endocrinology* *146*, 3490-3505.

VII. Bibliografia

- Jeong,J.W., Lee,K.Y., Lydon,J.P., and DeMayo,F.J. (2006). Steroid hormone regulation of Clca3 expression in the murine uterus. *J. Endocrinol.* *189*, 473-484.
- Jiang,J., Sarwar,N., Peston,D., Kulinskaya,E., Shousha,S., Coombes,R.C., and Ali,S. (2007). Phosphorylation of estrogen receptor-alpha at Ser167 is indicative of longer disease-free and overall survival in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* *13*, 5769-5776.
- Jiang,T. and Qiu,Y. (2003). Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 15789-15793.
- Joel,P.B., Smith,J., Sturgill,T.W., Fisher,T.L., Blenis,J., and Lannigan,D.A. (1998a). pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol. Cell Biol.* *18*, 1978-1984.
- Joel,P.B., Traish,A.M., and Lannigan,D.A. (1998b). Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 13317-13323.
- Jordan,V.C. and Brodie,A.M. (2007). Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids* *72*, 7-25.
- Joshi,N., Johnson,L.L., Wei,W.Q., Abnet,C.C., Dong,Z.W., Taylor,P.R., Limburg,P.J., Dawsey,S.M., Hawk,E.T., Qiao,Y.L., and Kirsch,I.R. (2006). Gene expression differences in normal esophageal mucosa associated with regression and progression of mild and moderate squamous dysplasia in a high-risk Chinese population. *Cancer Res.* *66*, 6851-6860.
- Joyce,J.A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* *7*, 513-520.
- Kalluri,R. and Zeisberg,M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 392-401.
- Kang,H., Escudero-Esparza,A., Douglas-Jones,A., Mansel,R.E., and Jiang,W.G. (2009). Transcript analyses of stromal cell derived factors (SDFs): SDF-2, SDF-4 and SDF-5 reveal a different pattern of expression and prognostic association in human breast cancer. *Int. J. Oncol.* *35*, 205-211.
- Kastner,P., Krust,A., Turcotte,B., Stropp,U., Tora,L., Gronemeyer,H., and Chambon,P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* *9*, 1603-1614.
- Kato,S., Pinto,M., Carvajal,A., Espinoza,N., Monso,C., Sadarangani,A., Villalon,M., Brosens,J.J., White,J.O., Richer,J.K., Horwitz,K.B., and Owen,G.I. (2005). Progesterone increases tissue factor gene expression, procoagulant activity, and invasion in the breast cancer cell line ZR-75-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *90*, 1181-1188.
- Kayed,H., Jiang,X., Keleg,S., Jesnowski,R., Giese,T., Berger,M.R., Esposito,I., Lohr,M., Friess,H., and Kleeff,J. (2007). Regulation and functional role of the Runt-related transcription factor-2 in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* *97*, 1106-1115.
- Keely,P.J., Wu,J.E., and Santoro,S.A. (1995). The spatial and temporal expression of the alpha 2 beta 1 integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis. *Differentiation* *59*, 1-13.
- Keydar,I., Chen,L., Karby,S., Weiss,F.R., Delarea,J., Radu,M., Chaitcik,S., and Brenner,H.J. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur. J. Cancer* *15*, 659-670.
- Kim,B.G., Kim,H.J., Park,H.J., Kim,Y.J., Yoon,W.J., Lee,S.J., Ryoo,H.M., and Cho,J.Y. (2006a). Runx2 phosphorylation induced by fibroblast growth factor-2/protein kinase C pathways. *Proteomics.* *6*, 1166-1174.

VII. Bibliografia

- Kim,H.J., Chung,H., Yoo,Y.G., Kim,H., Lee,J.Y., Lee,M.O., and Kong,G. (2007). Inhibitor of DNA binding 1 activates vascular endothelial growth factor through enhancing the stability and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol. Cancer Res.* 5, 321-329.
- Kim,M.Y., Woo,E.M., Chong,Y.T., Homenko,D.R., and Kraus,W.L. (2006b). Acetylation of estrogen receptor α by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol. Endocrinol.* 20, 1479-1493.
- 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.
- Klinge,C.M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251.
- Klotz,D.M., Hewitt,S.C., Ciana,P., Raviscioni,M., Lindzey,J.K., Foley,J., Maggi,A., DiAugustine,R.P., and Korach,K.S. (2002). Requirement of estrogen receptor- α in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J. Biol. Chem.* 277, 8531-8537.
- 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.
- Kordon,E., Lanari,C., Molinolo,A.A., Elizalde,P.V., Charreau,E.H., and Pasqualini,C.D. (1991). Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int. J. Cancer* 49, 900-905.
- Kos,M., O'Brien,S., Flouriot,G., and Gannon,F. (2000). Tissue-specific expression of multiple mRNA variants of the mouse estrogen receptor α gene. *FEBS Lett.* 477, 15-20.
- Kos,M., Reid,G., Denger,S., and Gannon,F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ER α gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* 15, 2057-2063.
- Kraus,W.L., Montano,M.M., and Katzenellenbogen,B.S. (1994). Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 8, 952-969.
- 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.
- Kuiper,G.G. and Gustafsson,J.A. (1997). The novel estrogen receptor- β subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* 410, 87-90.
- Kurita,T., Lee,K., Saunders,P.T., Cooke,P.S., Taylor,J.A., Lubahn,D.B., Zhao,C., Makela,S., Gustafsson,J.A., Dahiya,R., and Cunha,G.R. (2001). Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biol. Reprod.* 64, 272-283.
- Kurita,T., Lee,K.J., Cooke,P.S., Taylor,J.A., Lubahn,D.B., and Cunha,G.R. (2000). Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol. Reprod.* 62, 821-830.
- Labriola,L., Salatino,M., Proietti,C.J., Pecci,A., Coso,O.A., Kornblihtt,A.R., Charreau,E.H., and Elizalde,P.V. (2003). Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.* 23, 1095-1111.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

VII. Bibliografia

- Lafleur,M.A., Drew,A.F., de Sousa,E.L., Blick,T., Bills,M., Walker,E.C., Williams,E.D., Waltham,M., and Thompson,E.W. (2005). Upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer xenografts: a major induction of stromal MMP-13. *Int. J. Cancer* *114*, 544-554.
- Lahooti,H., Thorsen,T., and Aakvaag,A. (1998). Modulation of mouse estrogen receptor transcription activity by protein kinase C delta. *J. Mol. Endocrinol.* *20*, 245-259.
- Lamb,C., Simian,M., Molinolo,A., Pazos,P., and Lanari,C. (1999). Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* *70*, 133-142.
- Lamb,C.A., Helguero,L.A., Fabris,V., Lucas,C., Molinolo,A.A., and Lanari,C. (2003). Differential effects of raloxifene, tamoxifen and fulvestrant on a murine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* *79*, 25-35.
- 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.
- 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., Lamb,C.A., Fabris,V.T., Helguero,L.A., Soldati,R., Bottino,M.C., Giulianelli,S., Cerliani,J.P., Wargon,V., and Molinolo,A. (2009). The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* *16*, 333-350.
- 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., Shen,T., and Horwitz,K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 1032-1037.
- Lanigan,F., O'Connor,D., Martin,F., and Gallagher,W.M. (2007). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol. Life Sci.* *64*, 3159-3184.
- Lannigan,D.A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* *68*, 1-9.
- Lazennec,G., Thomas,J.A., and Katzenellenbogen,B.S. (2001). Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *77*, 193-203.
- Lechpammer,M. and Sgroi,D.C. (2004). Laser Capture Microdissection: a rising tool in genetic profiling of cancer. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* *4*, 429-430.
- Leonhardt,S.A. and Edwards,D.P. (2002). Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* *227*, 969-980.
- Lewis,J.S., Meeke,K., Osipo,C., Ross,E.A., Kidawi,N., Li,T., Bell,E., Chandel,N.S., and Jordan,V.C. (2005a). Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J. Natl. Cancer Inst.* *97*, 1746-1759.
- Lewis,J.S., Osipo,C., Meeke,K., and Jordan,V.C. (2005b). Estrogen-induced apoptosis in a breast cancer model resistant to long-term estrogen withdrawal. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* *94*, 131-141.

VII. Bibliografia

- Likhite, V.S., Stossi, F., Kim, K., Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. (2006). Kinase-Specific Phosphorylation of the Estrogen Receptor Changes Receptor Interactions with Ligand, DNA, and Coregulators Associated with Alterations in Estrogen and Tamoxifen Activity. *Mol. Endocrinol.*
- 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.
- Lim, K.B., Ng, C.Y., Ong, C.K., Ong, C.S., Tran, E., Nguyen, T.T., Chan, G.M., and Huynh, H. (2001). Induction of apoptosis in mammary gland by a pure anti-estrogen ICI 182780. *Breast Cancer Res. Treat.* *68*, 127-138.
- Lin, E.Y. and Pollard, J.W. (2004). Macrophages: modulators of breast cancer progression. *Novartis. Found. Symp.* *256*, 158-168.
- Lin, X., Yu, Y., Zhao, H., Zhang, Y., Manela, J., and Tonetti, D.A. (2006). Overexpression of PKC α is required to impart estradiol inhibition and tamoxifen-resistance in a T47D human breast cancer tumor model. *Carcinogenesis* *27*, 1538-1546.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., and Farr, A.L. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265-275.
- Ma, X.J., Dahiya, S., Richardson, E., Erlander, M., and Sgroi, D.C. (2009). Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* *11*, R7.
- Maffini, M.V., Soto, A.M., Calabro, J.M., Ucci, A.A., and Sonnenschein, C. (2004). The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J. Cell Sci.* *117*, 1495-1502.
- Maia, C.J., Socorro, S., Schmitt, F., and Santos, C.R. (2008). STEAP1 is over-expressed in breast cancer and down-regulated by 17 β -estradiol in MCF-7 cells and in the rat mammary gland. *Endocrine.* *34*, 108-116.
- Marin-Hernandez, A., Gallardo-Perez, J.C., Ralph, S.J., Rodriguez-Enriquez, S., and Moreno-Sanchez, R. (2009). HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini. Rev. Med. Chem.* *9*, 1084-1101.
- Marsaud, V., Gougelet, A., Maillard, S., and Renoir, J.M. (2003). Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ER α), differentially affect ER α extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* *17*, 2013-2027.
- Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., McLemore, M.S., Olivo, S.E., and Stoica, A. (2000). A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* *141*, 4503-4511.
- Martin, M.B., Saceda, M., and Lindsey, R.K. (1993). Regulation of estrogen receptor expression in breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* *330*, 143-153.
- Matsugi, S., Hamada, T., Shioi, N., Tanaka, T., Kumada, T., and Satomura, S. (2007). Serum carboxypeptidase A activity as a biomarker for early-stage pancreatic carcinoma. *Clin. Chim. Acta* *378*, 147-153.
- 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.

VII. Bibliografia

- 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.
- Micke, P. and Ostman, A. (2005). Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 9, 1217-1233.
- Midgley, V.C. and Khachigian, L.M. (2004). Fibroblast growth factor-2 induction of platelet-derived growth factor-C chain transcription in vascular smooth muscle cells is ERK-dependent but not JNK-dependent and mediated by Egr-1. *J. Biol. Chem.* 279, 40289-40295.
- 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. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J*. 19, 5406-5417.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15, 1292-1300.
- 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.
- Miller, L.D. and Liu, E.T. (2007). Expression genomics in breast cancer research: microarrays at the crossroads of biology and medicine. *Breast Cancer Res.* 9, 206.
- Miyagawa, S., Katsu, Y., Watanabe, H., and Iguchi, T. (2004). Estrogen-independent activation of erbBs signaling and estrogen receptor alpha in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Oncogene* 23, 340-349.
- Miyata, Y., Iwata, T., Maruta, S., Kanda, S., Nishikido, M., Koga, S., and Kanetake, H. (2007). Expression of matrix metalloproteinase-10 in renal cell carcinoma and its prognostic role. *Eur. Urol.* 52, 791-797.
- Molinolo, A., Simian, M., Vanzulli, S., Pazos, P., Lamb, C., and Lanari, C. (1998). Involvement of EGF in medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary gland hyperplasia and its role in MPA-induced mammary tumors in BALB/c mice. *Cancer Lett.* 126, 49-57.
- 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.
- Montano, M.M., Jaiswal, A.K., and Katzenellenbogen, B.S. (1998). Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta. *J. Biol. Chem.* 273, 25443-25449.
- 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.
- Mook, S., Schmidt, M.K., Weigelt, B., Kreike, B., Eekhout, I., van de Vijver, M.J., Glas, A.M., Floore, A., Rutgers, E.J., and 't Veer, L.J. (2009). The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age. *Ann. Oncol.*

VII. Bibliografia

- 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.
- Mulac-Jericevic,B., Lydon,J.P., DeMayo,F.J., and Conneely,O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9744-9749.
- Mulac-Jericevic,B., Mullinax,R.A., DeMayo,F.J., Lydon,J.P., and Conneely,O.M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289, 1751-1754.
- Murata,M., Yudo,K., Nakamura,H., Chiba,J., Okamoto,K., Suematsu,N., Nishioka,K., Beppu,M., Inoue,K., Kato,T., and Masuko,K. (2009). Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes: role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation. *J. Orthop. Res.* 27, 50-57.
- Murphy,L.C., Niu,Y., Snell,L., and Watson,P. (2004). Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha expression is associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen. *Clin. Cancer Res.* 10, 5902-5906.
- Murphy,L.C., Skliris,G.P., Rowan,B.G., Al Dhaheri,M., Williams,C., Penner,C., Troup,S., Begic,S., Parisien,M., and Watson,P.H. (2009). The relevance of phosphorylated forms of estrogen receptor in human breast cancer in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 114, 90-95.
- Nawaz,Z., Stancel,G.M., and Hyder,S.M. (1999). The pure antiestrogen ICI 182,780 inhibits progestin-induced transcription. *Cancer Res.* 59, 372-376.
- Nephew,K.P., Long,X., Osborne,E., Burke,K.A., Ahluwalia,A., and Bigsby,R.M. (2000). Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. *Biol. Reprod.* 62, 168-177.
- Nielsen,B.S., Rank,F., Illemann,M., Lund,L.R., and Dano,K. (2007). Stromal cells associated with early invasive foci in human mammary ductal carcinoma in situ coexpress urokinase and urokinase receptor. *Int. J. Cancer* 120, 2086-2095.
- Normanno,N., Di Maio,M., De Maio,E., De Luca,A., de Matteis,A., Giordano,A., and Perrone,F. (2005). Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12, 721-747.
- Novaro,V., Roskelley,C.D., and Bissell,M.J. (2003). Collagen-IV and laminin-1 regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.* 116, 2975-2986.
- Ohyama,H., Zhang,X., Kohno,Y., Alevizos,I., Posner,M., Wong,D.T., and Todd,R. (2000). Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization. *Biotechniques* 29, 530-536.
- Okulicz,W.C., Evans,R.W., and Leavitt,W.W. (1981). Progesterone regulation of the occupied form of nuclear estrogen receptor. *Science* 213, 1503-1505.
- 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.
- Onguchi,T., Han,K.Y., Chang,J.H., and Azar,D.T. (2009). Membrane type-1 matrix metalloproteinase potentiates basic fibroblast growth factor-induced corneal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 174, 1564-1571.

VII. Bibliografia

Orimo,A., Gupta,P.B., SgROI,D.C., Arenzana-Seisdedos,F., Delaunay,T., Naeem,R., Carey,V.J., Richardson,A.L., and Weinberg,R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.

Orimo,A. and Weinberg,R.A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5, 1597-1601.

Osborne,C.K., Coronado-Heinsohn,E.B., Hilsenbeck,S.G., McCue,B.L., Wakeling,A.E., McClelland,R.A., Manning,D.L., and Nicholson,R.I. (1995). Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 746-750.

Osipo,C., Liu,H., Meeke,K., and Jordan,V.C. (2004). The consequences of exhaustive antiestrogen therapy in breast cancer: estrogen-induced tumor cell death. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 229, 722-731.

Osipo,C., Meeke,K., Cheng,D., Weichel,A., Bertucci,A., Liu,H., and Jordan,V.C. (2007). Role for HER2/neu and HER3 in fulvestrant-resistant breast cancer. *Int. J. Oncol.* 30, 509-520.

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.

Pace,P., Taylor,J., Suntharalingam,S., Coombes,R.C., and Ali,S. (1997). Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 272, 25832-25838.

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 Chromosomes Cancer* 1992 Nov;5(4):410]. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 14-20.

Parkin,D.M. (2004). International variation. *Oncogene* 23, 6329-6340.

Paruthiyil,S., Parmar,H., Kerekatte,V., Cunha,G.R., Firestone,G.L., and Leitman,D.C. (2004). Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.* 64, 423-428.

Peekhaus,N.T., Chang,T., Hayes,E.C., Wilkinson,H.A., Mitra,S.W., Schaeffer,J.M., and Rohrer,S.P. (2004). Distinct effects of the antiestrogen Faslodex on the stability of estrogen receptors-alpha and -beta in the breast cancer cell line MCF-7. *J. Mol. Endocrinol.* 32, 987-995.

Peluso,J.J. and Pappalardo,A. (1999). Progesterone maintains large rat granulosa cell viability indirectly by stimulating small granulosa cells to synthesize basic fibroblast growth factor. *Biol. Reprod.* 60, 290-296.

Perou,C.M., Jeffrey,S.S., van de,R.M., Rees,C.A., Eisen,M.B., Ross,D.T., Pergamenschikov,A., Williams,C.F., Zhu,S.X., Lee,J.C., Lashkari,D., Shalon,D., Brown,P.O., and Botstein,D. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9212-9217.

Perou,C.M., Sorlie,T., Eisen,M.B., van de,R.M., Jeffrey,S.S., Rees,C.A., Pollack,J.R., Ross,D.T., Johnsen,H., Akslen,L.A., Fluge,O., Pergamenschikov,A., Williams,C., Zhu,S.X., Lonning,P.E., Borresen-Dale,A.L., Brown,P.O., and Botstein,D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Petz,L.N. and Nardulli,A.M. (2000). Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Mol. Endocrinol.* 14, 972-985.

Petz,L.N., Ziegler,Y.S., Loven,M.A., and Nardulli,A.M. (2002). Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143, 4583-4591.

VII. Bibliografia

- Petz,L.N., Ziegler,Y.S., Schultz,J.R., Kim,H., Kemper,J.K., and Nardulli,A.M. (2004). Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 113-122.
- Piccart,M., Parker,L.M., and Pritchard,K.I. (2003). Oestrogen receptor downregulation: an opportunity for extending the window of endocrine therapy in advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* 14, 1017-1025.
- 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.
- Pintucci,G., Yu,P.J., Sharony,R., Baumann,F.G., Saponara,F., Frasca,A., Galloway,A.C., Moscatelli,D., and Mignatti,P. (2003). Induction of stromelysin-1 (MMP-3) by fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in FGF-2/-microvascular endothelial cells requires prolonged activation of extracellular signal-regulated kinases-1 and -2 (ERK-1/2). *J. Cell Biochem.* 90, 1015-1025.
- Poon,E., Harris,A.L., and Ashcroft,M. (2009). Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert. Rev. Mol. Med.* 11, e26.
- Porter,W., Saville,B., Hoivik,D., and Safe,S. (1997). Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 11, 1569-1580.
- Pratap,J., Lian,J.B., Javed,A., Barnes,G.L., van Wijnen,A.J., Stein,J.L., and Stein,G.S. (2006). Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 589-600.
- Proietti,C., Salatino,M., Rosembliht,C., Carnevale,R., Pecci,A., Kornbliht,A.R., Molinolo,A.A., Frahm,I., Charreau,E.H., Schillaci,R., and Elizalde,P.V. (2005). Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 4826-4840.
- Quackenbush,J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.* 32 *Suppl*, 496-501.
- Quiles,I., Millan-Arino,L., Subtil-Rodriguez,A., Minana,B., Spinedi,N., Ballare,C., Beato,M., and Jordan,A. (2009). Mutational analysis of progesterone receptor functional domains in stable cell lines delineates sets of genes regulated by different mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 23, 809-826.
- Radisky,D.C., Kenny,P.A., and Bissell,M.J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J. Cell Biochem.* 101, 830-839.
- Radisky,E.S. and Radisky,D.C. (2007). Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 8, 279-287.
- Richer,J.K., Jacobsen,B.M., Manning,N.G., Abel,M.G., Wolf,D.M., and Horwitz,K.B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277, 5209-5218.
- Rider,V., Carlone,D.L., and Foster,R.T. (1997). Oestrogen and progesterone control basic fibroblast growth factor mRNA in the rat uterus. *J. Endocrinol.* 154, 75-84.
- Rivas,M.A., Carnevale,R.P., Proietti,C.J., Rosembliht,C., Beguelin,W., Salatino,M., Charreau,E.H., Frahm,I., Sapia,S., Brouckaert,P., Elizalde,P.V., and Schillaci,R. (2008). TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* 314, 509-529.
- Robertson,J.F. (2001). Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator--future possibilities in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79, 209-212.
- Robertson,J.F. (2007). Fulvestrant (Faslodex) -- how to make a good drug better. *Oncologist.* 12, 774-784.

VII. Bibliografia

- Robertson,J.F., Nicholson,R.I., Bundred,N.J., Anderson,E., Rayter,Z., Dowsett,M., Fox,J.N., Gee,J.M., Webster,A., Wakeling,A.E., Morris,C., and Dixon,M. (2001). Comparison of the short-term biological effects of 7alpha-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)-nonyl]estra-1,3,5, (10)-triene-3,17beta-diol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Cancer Res.* *61*, 6739-6746.
- 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.
- Roemer,S.C., Donham,D.C., Sherman,L., Pon,V.H., Edwards,D.P., and Churchill,M.E. (2006). Structure of the progesterone receptor-deoxyribonucleic acid complex: novel interactions required for binding to half-site response elements. *Mol. Endocrinol.* *20*, 3042-3052.
- Rogatsky,I., Trowbridge,J.M., and Garabedian,M.J. (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J. Biol. Chem.* *274*, 22296-22302.
- Rosenberg Zand,R.S., Grass,L., Magklara,A., Jenkins,D.J., and Diamandis,E.P. (2000). Is ICI 182,780 an antiprogesterin in addition to being an antiestrogen? *Breast Cancer Res. Treat.* *60*, 1-8.
- Ross,D.T., Scherf,U., Eisen,M.B., Perou,C.M., Rees,C., Spellman,P., Iyer,V., Jeffrey,S.S., van de,R.M., Waltham,M., Pergamenschikov,A., Lee,J.C., Lashkari,D., Shalon,D., Myers,T.G., Weinstein,J.N., Botstein,D., and Brown,P.O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat. Genet.* *24*, 227-235.
- Rossouw,J.E., Anderson,G.L., Prentice,R.L., LaCroix,A.Z., Kooperberg,C., Stefanick,M.L., Jackson,R.D., Beresford,S.A., Howard,B.V., Johnson,K.C., Kotchen,J.M., and Ockene,J. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* *288*, 321-333.
- 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.
- Russo,J., Moral,R., Balogh,G.A., Mailo,D., and Russo,I.H. (2005). The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *7*, 131-142.
- Russo,J. and Russo,I.H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *102*, 89-96.
- Sadlonova,A., Bowe,D.B., Novak,Z., Mukherjee,S., Duncan,V.E., Page,G.P., and Frost,A.R. (2009). Identification of Molecular Distinctions Between Normal Breast-Associated Fibroblasts and Breast Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Microenviron.*
- Saitoh,M., Ohmichi,M., Takahashi,K., Kawagoe,J., Ohta,T., Doshida,M., Takahashi,T., Igarashi,H., Mori-Abe,A., Du,B., Tsutsumi,S., and Kurachi,H. (2005). Medroxyprogesterone acetate induces cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 expression via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor-kappaB cascade in human breast cancer cells. *Endocrinology* *146*, 4917-4925.
- Samalecos,A. and Gellersen,B. (2008). Systematic expression analysis and antibody screening do not support the existence of naturally occurring progesterone receptor (PR)-C, PR-M, or other truncated PR isoforms. *Endocrinology* *149*, 5872-5887.
- Santen,R.J., Santner,S.J., Pauley,R.J., Tait,L., Kaseta,J., Demers,L.M., Hamilton,C., Yue,W., and Wang,J.P. (1997). Estrogen production via the aromatase enzyme in breast carcinoma: which cell type is responsible? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *61*, 267-271.
- Santner,S.J., Pauley,R.J., Tait,L., Kaseta,J., and Santen,R.J. (1997). Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *82*, 200-208.

VII. Bibliografia

- Santos,S.J., Aupperlee,M.D., Xie,J., Durairaj,S., Miksicek,R., Conrad,S.E., Leipprandt,J.R., Tan,Y.S., Schwartz,R.C., and Haslam,S.Z. (2009). Progesterone receptor A-regulated gene expression in mammary organoid cultures. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *115*, 161-172.
- Sartorius,C.A., Groshong,S.D., Miller,L.A., Powell,R.L., Tung,L., Takimoto,G.S., and Horwitz,K.B. (1994). New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B- receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Res.* *54*, 3868-3877.
- Sarwar,N., Kim,J.S., Jiang,J., Peston,D., Sinnett,H.D., Madden,P., Gee,J.M., Nicholson,R.I., Lykkesfeldt,A.E., Shousha,S., Coombes,R.C., and Ali,S. (2006). Phosphorylation of ERalpha at serine 118 in primary breast cancer and in tamoxifen-resistant tumours is indicative of a complex role for ERalpha phosphorylation in breast cancer progression. *Endocr. Relat Cancer* *13*, 851-861.
- Sauve,K., Lepage,J., Sanchez,M., Heveker,N., and Tremblay,A. (2009). Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res.* *69*, 5793-5800.
- Savoldi,G., Ferrari,F., Ruggeri,G., Sobek,L., Albertini,A., and Di Lorenzo,D. (1995). Progesterone agonists and antagonists induce down- and up-regulation of estrogen receptors and estrogen inducible genes in human breast cancer cell lines. *Int. J. Biol. Markers* *10*, 47-54.
- Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W., and Brown,P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* *270*, 467-470.
- 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.
- Schott,D.R., Shyamala,G., Schneider,W., and Parry,G. (1991). Molecular cloning, sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor. *Biochemistry* *30*, 7014-7020.
- Schultz,G.S. and Wysocki,A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound. Repair Regen.* *17*, 153-162.
- Schultz,J.R., Petz,L.N., and Nardulli,A.M. (2003). Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell Endocrinol.* *201*, 165-175.
- Selman,P.J., van Garderen,E., Mol,J.A., and van den Ingh,T.S. (1995). Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. *Vet. Q.* *17*, 128-133.
- Selvamurugan,N., Kwok,S., and Partridge,N.C. (2004). Smad3 interacts with JunB and Cbfa1/Runx2 for transforming growth factor-beta1-stimulated collagenase-3 expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 27764-27773.
- Selvamurugan,N., Shimizu,E., Lee,M., Liu,T., Li,H., and Partridge,N.C. (2009). Identification and characterization of Runx2 phosphorylation sites involved in matrix metalloproteinase-13 promoter activation. *FEBS Lett.* *583*, 1141-1146.
- Sexton,P.M., Findlay,D.M., and Martin,T.J. (1999). Calcitonin. *Curr. Med. Chem.* *6*, 1067-1093.
- Shaw,L.E., Sadler,A.J., Pugazhendhi,D., and Darbre,P.D. (2006). Changes in oestrogen receptor-alpha and -beta during progression to acquired resistance to tamoxifen and fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *99*, 19-32.
- Shen,T., Horwitz,K.B., and Lange,C.A. (2001). Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6122-6131.

VII. Bibliografia

- Shigemura,K., Isotani,S., Wang,R., Fujisawa,M., Gotoh,A., Marshall,F.F., Zhau,H.E., and Chung,L.W. (2009). Soluble factors derived from stroma activated androgen receptor phosphorylation in human prostate LNCaP cells: roles of ERK/MAP kinase. *Prostate* 69, 949-955.
- Shore,P. (2005). A role for Runx2 in normal mammary gland and breast cancer bone metastasis. *J. Cell Biochem.* 96, 484-489.
- Sikder,H.A., Devlin,M.K., Dunlap,S., Ryu,B., and Alani,R.M. (2003). Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 525-530.
- Simian,M., Molinolo,A., and Lanari,C. (2006). Involvement of matrix metalloproteinase activity in hormone-induced mammary tumor regression. *Am. J. Pathol.* 168, 270-279.
- Singer,C.F., Gschwantler-Kaulich,D., Fink-Retter,A., Haas,C., Hudelist,G., Czerwenka,K., and Kubista,E. (2008). Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts. *Breast Cancer Res. Treat.* 110, 273-281.
- 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.
- Skildum,A., Faivre,E., and Lange,C.A. (2005). Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Endocrinol.* 19, 327-339.
- Soldati,R.C., Wargon,V., Cerliani,J.P., Giulianelli,S., Vanzulli,S., Gorostiaga,M.A., Bolado,J., do Campo,P., Molinolo,A., Vollmer,G., and Lanari,C. (2009). Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role of ER α and ER β ? *Breast Cancer Research and Treatment.* - Aceptado.
- Sommer,A., Hoffmann,J., Lichtner,R.B., Schneider,M.R., and Parczyk,K. (2003). Studies on the development of resistance to the pure antiestrogen Faslodex in three human breast cancer cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 33-47.
- Song,R.X., Mor,G., Naftolin,F., McPherson,R.A., Song,J., Zhang,Z., Yue,W., Wang,J., and Santen,R.J. (2001). Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17 β -estradiol. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1714-1723.
- Song,R.X. and Santen,R.J. (2003). Apoptotic action of estrogen. *Apoptosis.* 8, 55-60.
- Sorlie,T., Perou,C.M., Tibshirani,R., Aas,T., Geisler,S., Johnsen,H., Hastie,T., Eisen,M.B., van de,R.M., Jeffrey,S.S., Thorsen,T., Quist,H., Matese,J.C., Brown,P.O., Botstein,D., Eystein,L.P., and Borresen-Dale,A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10869-10874.
- Sorlie,T., Tibshirani,R., Parker,J., Hastie,T., Marron,J.S., Nobel,A., Deng,S., Johnsen,H., Pesich,R., Geisler,S., Demeter,J., Perou,C.M., Lonning,P.E., Brown,P.O., Borresen-Dale,A.L., and Botstein,D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8418-8423.
- Soto,A.M. and Sonnenschein,C. (2004). The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *Bioessays* 26, 1097-1107.
- Soto,A.M. and Sonnenschein,C. (2005). Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization. *J. Biosci.* 30, 103-118.
- Sternlicht,M.D., Lochter,A., Simpson,C.J., Huey,B., Rougier,J.P., Gray,J.W., Pinkel,D., Bissell,M.J., and Werb,Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98, 137-146.

VII. Bibliografia

- Stighall,M., Manetopoulos,C., Axelson,H., and Landberg,G. (2005). High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 115, 403-411.
- Stirone,C., Duckles,S.P., and Krause,D.N. (2003). Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 284, E184-E192.
- Stoica,A., Saceda,M., Fakhro,A., Joyner,M., and Martin,M.B. (2000). Role of insulin-like growth factor-I in regulating estrogen receptor-alpha gene expression. *J. Cell Biochem.* 76, 605-614.
- Stoica,G.E., Franke,T.F., Wellstein,A., Morgan,E., Czubayko,F., List,H.J., Reiter,R., Martin,M.B., and Stoica,A. (2003). Heregulin-beta1 regulates the estrogen receptor-alpha gene expression and activity via the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 22, 2073-2087.
- Strom,A., Hartman,J., Foster,J.S., Kietz,S., Wimalasena,J., and Gustafsson,J.A. (2004). Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 1566-1571.
- Studebaker,A.W., Storci,G., Werbeck,J.L., Sansone,P., Sasser,A.K., Tavolari,S., Huang,T., Chan,M.W., Marini,F.C., Rosol,T.J., Bonafe,M., and Hall,B.M. (2008). Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer Res.* 68, 9087-9095.
- 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.
- Tejada,M.L., Yu,L., Dong,J., Jung,K., Meng,G., Peale,F.V., Frantz,G.D., Hall,L., Liang,X., Gerber,H.P., and Ferrara,N. (2006). Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor alpha signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 2676-2688.
- Tholozan,F.M., Gribbon,C., Li,Z., Goldberg,M.W., Prescott,A.R., McKie,N., and Quinlan,R.A. (2007). FGF-2 release from the lens capsule by MMP-2 maintains lens epithelial cell viability. *Mol. Biol. Cell* 18, 4222-4231.
- Thomas,D.B. (1991). Oral contraceptives and breast cancer: review of the epidemiologic literature. *Contraception* 43, 597-642.
- Thomas,D.B. (1993). Oral contraceptives and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 359-364.
- Thomas,E.K., Cancelas,J.A., Zheng,Y., and Williams,D.A. (2008a). Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. *Leukemia* 22, 898-904.
- Thomas,R.S., Sarwar,N., Phoenix,F., Coombes,R.C., and Ali,S. (2008b). Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *J. Mol. Endocrinol.* 40, 173-184.
- 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.
- Tremblay,G.B., Tremblay,A., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Labrie,F., and Giguere,V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.* 11, 353-365.
- Troester,M.A., Hoadley,K.A., Parker,J.S., and Perou,C.M. (2004). Prediction of toxicant-specific gene expression signatures after chemotherapeutic treatment of breast cell lines. *Environ. Health Perspect.* 112, 1607-1613.

VII. Bibliografía

- Tront,J.S., Hoffman,B., and Liebermann,D.A. (2006). Gadd45a suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer Res.* 66, 8448-8454.
- 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.
- Tusher,V.G., Tibshirani,R., and Chu,G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5116-5121.
- Tverberg,L.A., Gustafson,M.F., Scott,T.L., Arzumanova,I.V., Provost,E.R., Yan,A.W., and Rawie,S.A. (2000). Induction of calcitonin and calcitonin receptor expression in rat mammary tissue during pregnancy. *Endocrinology* 141, 3696-3702.
- Tyulmenkov,V.V. and Klinge,C.M. (2000). Selectivity of antibodies to estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) for detecting DNA-bound ERalpha and ERbeta in vitro. *Steroids* 65, 505-512.
- Vallejo,G., Ballare,C., Baranao,J.L., Beato,M., and Saragueta,P. (2005). Progestin 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.
- Van Gelder,R.N., von Zastrow,M.E., Yool,A., Dement,W.C., Barchas,J.D., and Eberwine,J.H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 1663-1667.
- Van Themsche,C., Alain,T., Kossakowska,A.E., Urbanski,S., Potworowski,E.F., and St Pierre,Y. (2004). Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *J. Immunol.* 173, 3605-3611.
- Vanzulli,S., Efeyan,A., Benavides,F., Helguero,L.A., 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, 749-758.
- Vega,F.M. and Ridley,A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 582, 2093-2101.
- 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.
- Vendrell,E., Ribas,M., Valls,J., Sole,X., Grau,M., Moreno,V., Capella,G., and Peinado,M.A. (2007). Genomic and transcriptomic prognostic factors in R0 Dukes B and C colorectal cancer patients. *Int. J. Oncol.* 30, 1099-1107.
- Viegas,M.H., Salatino,M., Goin,M., Peters,G., Labriola,L., Costa,d.c., Lanari,C., Charreau,E.H., and Elizalde,P.V. (1999). Differential expression of and responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in hormone-dependent and independent lines of mouse mammary tumors. *Cancer Detect. Prev.* 23, 375-386.
- Vilgelm,A., Lian,Z., Wang,H., Beauparlant,S.L., Klein-Szanto,A., Ellenson,L.H., and Di Cristofano,A. (2006). Akt-mediated phosphorylation and activation of estrogen receptor alpha is required for endometrial neoplastic transformation in Pten^{+/-} mice. *Cancer Res.* 66, 3375-3380.
- Vizoso,F.J., Gonzalez,L.O., Corte,M.D., Rodriguez,J.C., Vazquez,J., Lamelas,M.L., Junquera,S., Merino,A.M., and Garcia-Muniz,J.L. (2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br. J. Cancer* 96, 903-911.
- Wakeling,A.E., Dukes,M., and Bowler,J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51, 3867-3873.

VII. Bibliografia

Walter,M., Liang,S., Ghosh,S., Hornsby,P.J., and Li,R. (2009). Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 28, 2745-2755.

Walter,P., Green,S., Greene,G., Krust,A., Bornert,J.M., Jeltsch,J.M., Staub,A., Jensen,E., Scrace,G., Waterfield,M., and . (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 7889-7893.

Wang,B., Wood,I.S., and Trayhurn,P. (2008). PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 88-93.

Wang,Y., Klijn,J.G., Zhang,Y., Sieuwerts,A.M., Look,M.P., Yang,F., Talantov,D., Timmermans,M., Meijer-van Gelder,M.E., Yu,J., Jatkoe,T., Berns,E.M., Atkins,D., and Foekens,J.A. (2005). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365, 671-679.

Wargon,V., Helguero,L.A., Bolado,J., Rojas,P., Novaro,V., Molinolo,A., and Lanari,C. (2009). Reversal of antiprogesterin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*

Webb,P., Lopez,G.N., Uht,R.M., and Kushner,P.J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* 9, 443-456.

Wei,L.L., Gonzalez-Aller,C., Wood,W.M., Miller,L.A., and Horwitz,K.B. (1990). 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol Endocrinol* 4, 1833-1840.

Wei,L.L., Hawkins,P., Baker,C., Norris,B., Sheridan,P.L., and Quinn,P.G. (1996). An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progesterin-induced transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* 10, 1379-1387.

Wei,L.L. and Miner,R. (1994). Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res.* 54, 340-343.

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.

Weigel,N.L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J* 319, 657-667.

Weigel,N.L., Carter,T.H., Schrader,W.T., and O'Malley,B.W. (1992). Chicken progesterone receptor is phosphorylated by a DNA-dependent protein kinase during in vitro transcription assays. *Mol. Endocrinol.* 6, 8-14.

Weitsman,G.E., Li,L., Skliris,G.P., Davie,J.R., Ung,K., Niu,Y., Curtis-Snell,L., Tomes,L., Watson,P.H., and Murphy,L.C. (2006). Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res.* 66, 10162-10170.

White,R., Lees,J.A., Needham,M., Ham,J., and Parker,M. (1987). Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 1, 735-744.

Wickramasinghe,N.S., Manavalan,T.T., Dougherty,S.M., Riggs,K.A., Li,Y., and Klinge,C.M. (2009). Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 37, 2584-2595.

Wijayaratne,A.L. and McDonnell,D.P. (2001). The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J. Biol. Chem.* 276, 35684-35692.

VII. Bibliografia

- Wooster,R., Bignell,G., Lancaster,J., Swift,S., Seal,S., Mangion,J., Collins,N., Gregory,S., Gumbs,C., and Micklem,G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-792.
- Wu,J., Liang,Y., Nawaz,Z., and Hyder,S.M. (2005). Complex agonist-like properties of ICI 182,780 (Faslodex) in human breast cancer cells that predominantly express progesterone receptor-B: implications for treatment resistance. *Int. J. Oncol.* 27, 1647-1659.
- Xie,J., Bian,H., Qi,S., Xu,Y., Tang,J., Li,T., and Liu,X. (2008). Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of extracellular matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing. *Clin. Exp. Dermatol.* 33, 176-182.
- Yamaguchi,Y. (2007). Microenvironmental regulation of estrogen signals in breast cancer. *Breast Cancer* 14, 175-181.
- Yamaguchi,Y. and Hayashi,S. (2009). Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocr. J.* 56, 1-7.
- Yamaguchi,Y., Takei,H., Suemasu,K., Kobayashi,Y., Kurosumi,M., Harada,N., and Hayashi,S. (2005). Tumor-stromal interaction through the estrogen-signaling pathway in human breast cancer. *Cancer Res.* 65, 4653-4662.
- Yamashita,H., Nishio,M., Kobayashi,S., Ando,Y., Sugiura,H., Zhang,Z., Hamaguchi,M., Mita,K., Fujii,Y., and Iwase,H. (2005). Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 7, R753-R764.
- Zajchowski,D.A., Bartholdi,M.F., Gong,Y., Webster,L., Liu,H.L., Munishkin,A., Beauheim,C., Harvey,S., Ethier,S.P., and Johnson,P.H. (2001). Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res.* 61, 5168-5178.
- Zerbini,L.F. and Libermann,T.A. (2005). Life and death in cancer. GADD45 alpha and gamma are critical regulators of NF-kappaB mediated escape from programmed cell death. *Cell Cycle* 4, 18-20.
- Zhang,S., Li,X., Burghardt,R., Smith,R., III, and Safe,S.H. (2005). Role of estrogen receptor (ER) alpha in insulin-like growth factor (IGF)-I-induced responses in MCF-7 breast cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.* 35, 433-447.
- Zhang,Y., Zhao,H., Asztalos,S., Chisamore,M., Sitabkhan,Y., and Tonetti,D.A. (2009). Estradiol-induced regression in T47D:A18/PKCalpha tumors requires the estrogen receptor and interaction with the extracellular matrix. *Mol. Cancer Res.* 7, 498-510.
- Zhao,Y., Johansson,C., Tran,T., Bettencourt,R., Itahana,Y., Desprez,P.Y., and Konieczny,S.F. (2006). Identification of a basic helix-loop-helix transcription factor expressed in mammary gland alveolar cells and required for maintenance of the differentiated state. *Mol. Endocrinol.* 20, 2187-2198.
- Zoubir,M., Mathieu,M.C., Mazouni,C., Liedtke,C., Corley,L., Geha,S., Bouaziz,J., Spielmann,M., Drusche,F., Symmans,W.F., Delaloe,S., and Andre,F. (2008). Modulation of ER phosphorylation on serine 118 by endocrine therapy: a new surrogate marker for efficacy. *Ann. Oncol.* 19, 1402-1406.