

## Tesis Doctoral

# Estudio de la regulación de la expresión y activación de factores relevantes en la involución mamaria y el desarrollo tumoral. El rol del estrés mecánico en estos procesos

Quaglino, Ana

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Quaglino, Ana. (2009). Estudio de la regulación de la expresión y activación de factores relevantes en la involución mamaria y el desarrollo tumoral. El rol del estrés mecánico en estos procesos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Quaglino, Ana. "Estudio de la regulación de la expresión y activación de factores relevantes en la involución mamaria y el desarrollo tumoral. El rol del estrés mecánico en estos procesos". 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

**ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION Y  
ACTIVACION DE FACTORES RELEVANTES EN LA  
INVOLUCION MAMARIA Y EL DESARROLLO TUMORAL.  
EL ROL DEL ESTRÉS MECANICO EN ESTOS  
PROCESOS**

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

**Ana Quaglino**

Director de tesis: Dra. Edith C. Kordon

Consejero de estudios: Dr. Omar A. Coso

Instituto de Fisiología Biología Molecular y Neurociencias-CONICET

Buenos Aires, 2009

**ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION Y ACTIVACION DE FACTORES  
RELEVANTES EN LA INVOLUCION MAMARIA Y EL DESARROLLO TUMORAL.  
EL ROL DEL ESTRÉS MECANICO EN ESTOS PROCESOS**

**RESUMEN**

En la mama normal, LIF es el principal activador del factor de transcripción STAT3, responsable de inducir la apoptosis del epitelio secretorio durante la involución. En el cáncer de mama STAT3 se encuentra frecuentemente activo aunque su rol biológico es aún controversial. En este trabajo nos propusimos evaluar si el LIF producido localmente es responsable de la activación de STAT3 en tumores mamarios murinos. Por estudios *in vivo* e *in vitro* determinamos que LIF se sobre-expresa en estos tumores, donde actúa como principal activador de STAT3. Encontramos además que LIF ejerce un efecto opuesto en células normales y tumorales, inhibiendo e induciendo, respectivamente, la supervivencia celular. A continuación, decidimos evaluar si el estrés mecánico inducido por la acumulación de leche al final del amamantamiento dispara la expresión de factores relevantes en la involución y tumorigénesis mamaria. Para ello, diseñamos un dispositivo que permite “estirar” radialmente células creciendo en cultivo sobre membranas elásticas. Encontramos que el estímulo mecánico es capaz de disparar en células mamarias la activación de cascadas de señales y la expresión de genes fundamentales en la involución y el desarrollo tumoral. En conjunto, nuestros resultados brindan nuevas evidencias de la importancia de los factores locales en la regulación de procesos normales y patológicos de la glándula mamaria.

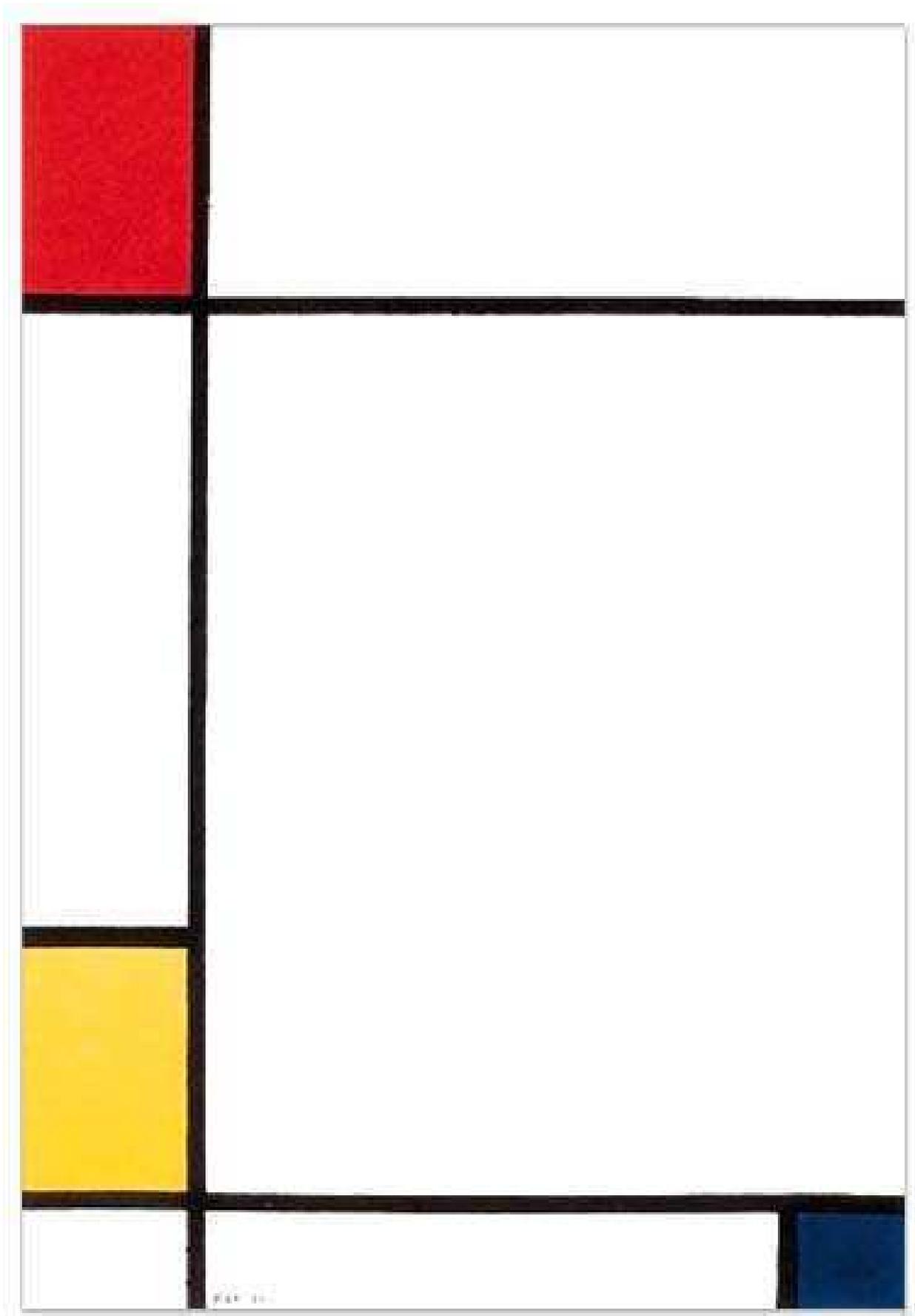
**Palabras claves: glándula mamaria, tumores mamarios LIF, STAT3, estrés mecánico**

**EXPRESSION AND ACTIVITY REGULATION OF FACTORS INVOLVED  
IN MAMMARY INVOLUTION AND TUMORIGENESIS.  
ROLE OF MECHANICAL STRESS IN THESE PROCESSES.**

**ABSTRACT**

It has been demonstrated that LIF induces epithelium apoptosis through STAT3 activation during mouse mammary gland involution. Although STAT3 is frequently activated in breast cancer, its biological role is controversial. In this work, we evaluated if locally produced LIF can be responsible for STAT3 activation in mouse mammary tumors. In *in vivo* and *in vitro* studies we observed that LIF is over-expressed in mouse mammary tumors, where it acts as the main STAT3 activator. Furthermore, we found that LIF has opposite effects on normal and tumor epithelial cells by inhibiting or inducing cell survival, respectively. Then, we decided to evaluate if cell stretching caused by milk accumulation after weaning, triggers the expression of relevant factors in mammary gland involution and tumorigenesis. To address this issue, we designed a practical device that radially stretches mammary epithelial cells growing on elastic membranes in culture. We found that mechanical strain is able to trigger signaling cascades activation and gene expression relevant in involution and tumor development. Together, these findings provide new evidence about the critical role of local factors in regulating normal and pathological processes in the mammary gland.

**Key words: Mammary gland, mammary tumors, LIF, STAT3, mechanical stress.**



**Piet Mondrian**

Composición con rojo, amarillo y azul, 1927

*Agnosco veteris vestigia flammae*

(Reconozco las huellas de una antigua llama)

Virgilio

el borde es un río..

Alicia Genovese, 1997

**A mis padres**

**A mi abuelo Alfredo**

# INDICE

	Páginas
<b>INTRODUCCION</b>	
<b>1. La Glándula Mamaria</b>	<b>1</b>
1.1- Historia evolutiva	1
1.2-Desarrollo normal de la glándula mamaria	1
1.2.1-Desarrollo y Diferenciación	2
1.2.2-La involución mamaria	5
1.2.3-Factores y cascada de señales en la involución mamaria	8
1.2.3.1-La vía JAK/STAT	8
De PRL/JAK/STAT5 a LIF/JAK/STAT3	12
STAT5A - Desarrollo lóbulo-alveolar y expresión de proteínas de la leche	12
STAT3 – El mediador esencial de la involución mamaria	13
El LIF es activador de STAT3 en el epitelio mamario	14
1.2.3.2-MAPKs	15
ERK 1 y 2	16
ERK1 y 2 en la glándula mamaria	17
JNK	18
JNK en la glándula mamaria	18
1.2.3.3-La vía de PI3K/AKT	20
La vía de PI3K/AKT en la glándula mamaria	22
1.2.3.4-Factores iniciadores de la involución mamaria	24
<b>2. Las señales mecánicas del micro-entorno y la función celular</b>	<b>25</b>
2.1 El estrés mecánico en la fisiología normal y patológica	26
2.1.2 El estrés mecánico en el corazón normal y patológico	26

	páginas
2.1.3 El estrés mecánico en otras patologías	29
2.2 Estrategias experimentales para el estudio del estrés mecánico <i>in vitro</i>	29
<b>3. El cáncer de mama</b>	<b>31</b>
3.1-Aspectos generales	31
3.2-Biología tumoral	32
3.2.1-Aspectos generales.	32
3.2.2-STAT3 en el cáncer.	33
3.2.3-STAT3 en tumores mamarios.	35
3.2.4-LIF en tumores mamarios.	37
3.3-Modelos tumorales utilizados	38
3.3.1-El modelo de tumores mamarios inducidos por el virus MMTV.	38
3.3.2-El modelo de tumores mamarios LM3.	39
<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>1. Ensayos en animales</b>	<b>41</b>
1.1 Ratones.	41
1.2 Tumores mamarios.	41
1.3 Extracción de tejidos mamario normal y tumoral.	42
<b>2. Cultivos celulares</b>	<b>42</b>
2.1 Cultivos primarios tumorales.	42
2.2 Medios condicionados de cultivos primarios tumorales.	43
2.3 Líneas celulares.	43
<b>3. Ensayos de estrés mecánico (<i>in vitro</i>)</b>	<b>43</b>
3.1 Dispositivo utilizado.	43

	páginas
3.2 Membranas de siliconas.	45
3.3 Protocolo de estimulación mecánica.	47
3.4 Análisis por microscopía de las células montadas en el dispositivo.	48
3.5 Medios condicionados de células expuestas a estrés mecánico.	48
<b>4. Preparación del material, Ensayos Bioquímicos y Moleculares</b>	<b>48</b>
4.1 Preparación de ARN.	48
4.2 Retrotranscripción y PCR.	49
4.3 Análisis de proteínas.	52
Preparación de extractos protéicos.	52
Análisis de Western Blot.	52
4.4 Análisis histológico: Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos.	55
Inmunohistoquímica	55
4.5 Inmunofluorescencia indirecta.	56
4.6 Ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA).	57
4.7 Ensayos de viabilidad celular - Tinción por cristal violeta.	57
4.8 Análisis de Apoptosis – Actividad de simil-caspasa 3.	58
4.9 Análisis estadístico.	58
<b>RESULTADOS</b>	
<b>Capítulo 1</b>	<b>60</b>
1.1 Expresión de LIF y activación de STAT3 en tumores mamarios murinos.	60
1.2 El LIF secretado por células mamarias tumorales es el principal responsable de inducir la activación de STAT3 en células mamarias.	67
1.3 El LIF secretado por células mamarias tumorales promueve la supervivencia en células tumorales mamarias. Vías involucradas.	73
<b>Capítulo 2</b>	<b>79</b>
2.1 Caracterización del dispositivo utilizado para ejercer estrés mecánico a	

	páginas
células en cultivo.	79
2.2 El estrés mecánico induce, en células epiteliales mamarias en cultivo, la activación de cascadas de señales y la expresión de genes involucrados en el proceso de involución.	85
2.2.1 El estrés mecánico induce la expresión de c-fos en células epiteliales	85
2.2.2 El estrés mecánico modula la activación de ERK1/2 y JNK en células epiteliales mamarias en cultivo.	88
2.2.3 El estrés mecánico modula la activación de AKT y STAT3 en células epiteliales mamarias en cultivo.	90
2.2.4 El estrés mecánico induce la expresión y secreción de LIF.	93
2.2.5 El estrés mecánico es un estímulo protector en células epiteliales mamarias.	95
2.2.6 El LIF presente en el medio condicionado por células epiteliales mamarias expuestas a estrés mecánico induce la fosforilación de STAT3 en células epiteliales mamarias en reposo.	96
 <b>DISCUSION</b>	
<b>Capítulo 1</b>	102
<b>1. El rol LIF en tumores mamarios murinos.</b>	102
1.1 ¿Quién activa a STAT3 en los tumores mamarios?	102
1.2 LIF activa a STAT3 en tumores mamarios.	105
1.3 ¿Cómo escapan las células tumorales a las señales de muerte de STAT3?	106
1.4 ¿Qué programas genéticos regula STAT3 que favorecen el desarrollo tumoral?	107
1.5 STAT 3, el micro-entorno y el sistema inmune.	109
1.6 Inhibidores de STAT3 como terapia anti-tumoral.	109
1.7 Una actualización sobre los roles de los STATs.	110

**Capítulo 2**

<b>2. Las señales mecánicas del micro-entorno celular modulan eventos asociados a la involución, en células epiteliales mamarias en cultivo.</b>	112
<b>2.1</b> El modelo utilizado para aplicar estrés mecánico a células creciendo en cultivo.	112
<b>2.2</b> El estrés mecánico induce en células epiteliales mamarias la expresión de genes y cascadas de señales involucrados en la involución.	114
<b>2.3</b> El estrés mecánico protege a las células epiteliales mamarias en cultivo.	118
<b>2.4</b> Conclusiones y perspectivas.	121
<b>ANEXO</b>	
Abreviaturas	127
Trabajos Publicados	130
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	131

## **1. La Glándula Mamaria**

### **1.1 Historia evolutiva**

La divergencia evolutiva entre los roedores y el ser humano ocurrió hace ya 75 millones de años (Pevzner and Tesler, 2003), sin embargo, es sorprendente la conservación de los aspectos fundamentales del desarrollo normal y tumorigénico de la glándula mamaria entre ambas especies (Cardiff, 2001). Es por eso que durante décadas se ha utilizado como modelo de estudio mamario humano a la glándula mamaria de roedores (ratas y ratones). Estos animales tienen muchas ventajas como modelo de estudio. Utilizando técnicas de manipulación génica y la tecnología de ratones *knock out*, se ha podido estudiar tanto el rol de una gran cantidad de genes así como también las cascadas de señales involucradas en las etapas del desarrollo mamario normal y tumoral.

### **1.2. El desarrollo normal de la glándula mamaria**

La glándula mamaria es un órgano secretorio complejo cuyo desarrollo morfológico y funcional se produce principalmente luego del nacimiento y en estadios bien definidos. Comienza en la pubertad, continúa durante la preñez y alcanza su mayor grado de diferenciación funcional en la etapa de lactancia. Al finalizar la lactancia se produce la involución post-lactancia, período en el cual la glándula mamaria retorna morfológica y funcionalmente a un estado similar al de una hembra virgen mediante una masiva muerte de las células epiteliales de los alvéolos y el posterior remodelado de la glándula. Este ciclo de proliferación, diferenciación y muerte se repite cíclicamente con cada preñez, y con mucha menor intensidad durante cada ciclo estral que atraviese la hembra (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000).

La masiva muerte del epitelio secretorio y el gran remodelado que atraviesa la glándula mamaria durante la involución, convierten a la mama en un órgano modelo para el estudio de procesos de desarrollo, diferenciación, mecanismos de muerte celular programada y procesos de remodelado tisular.

### 1.2.1 Desarrollo y Diferenciación

En el ratón, hay cinco pares de mamas subcutáneas ubicadas ventrolateralmente en ambos flancos del animal y distribuidas a lo largo de lo que se denomina “línea mamaria”, la cual abarca desde la región torácica hasta la región inguinal. Tanto en machos como en hembras, el desarrollo de esta glándula comienza entre los días 10 y 11 de desarrollo embrionario, cuando los brotes epiteliales proliferan y se ramifican invadiendo el mesénquima. Así, hacia el día 18 del desarrollo embrionario, se observa un árbol muy rudimentario de conductos, sumergidos en el estroma adiposo (almohadilla de grasa) y cuyo conducto principal se encuentra conectado al pezón. A partir de ese momento, el desarrollo mamario se arresta hasta las 3 semanas post-parto, momento en el cual comienza la pubertad en los ratones hembras (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000).

Por lo tanto, al momento del nacimiento, la glándula mamaria consiste en un parénquima epitelial formado por un pequeño árbol de conductos, donde cada rama está compuesta por una única capa de células epiteliales cuya cara apical rodea un lumen central y un estroma formado por un tejido conectivo denso constituido por fibroblastos, adipocitos, vasos sanguíneos y, en algunos casos, ganglios linfáticos con sus vasos correspondientes. Las células epiteliales que rodean al lumen se denominan luminales y por debajo de ellas se encuentran las células mioepiteliales que a su vez se apoyan sobre una membrana basal rica en laminina que separa el compartimiento epitelial del estromal. En la periferia de la almohadilla de grasa existe una cápsula fibrilar que funciona como barrera y determina el límite de la glándula (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000).

Durante la pubertad, en los machos, la testosterona actúa sobre las células del mesénquima inhibiendo el desarrollo de la glándula. En las hembras, en cambio, el aumento de los niveles de secreción de hormonas ováricas, con la contribución de la hormona de crecimiento, inducen la activación de cascadas de señales específicas y la activación de genes que promueven la etapa de crecimiento de los conductos. Este período se caracteriza por la formación, en los extremos terminales de los conductos, de unidades especializadas denominadas brotes terminales (*terminal end buds*, TEBs). Los TEBs son estructuras multicelulares organizadas en múltiples capas de células epiteliales con una capa más externa de células pluripotentes no diferenciadas denominadas “células del capuchón” (*cap cells*). Los

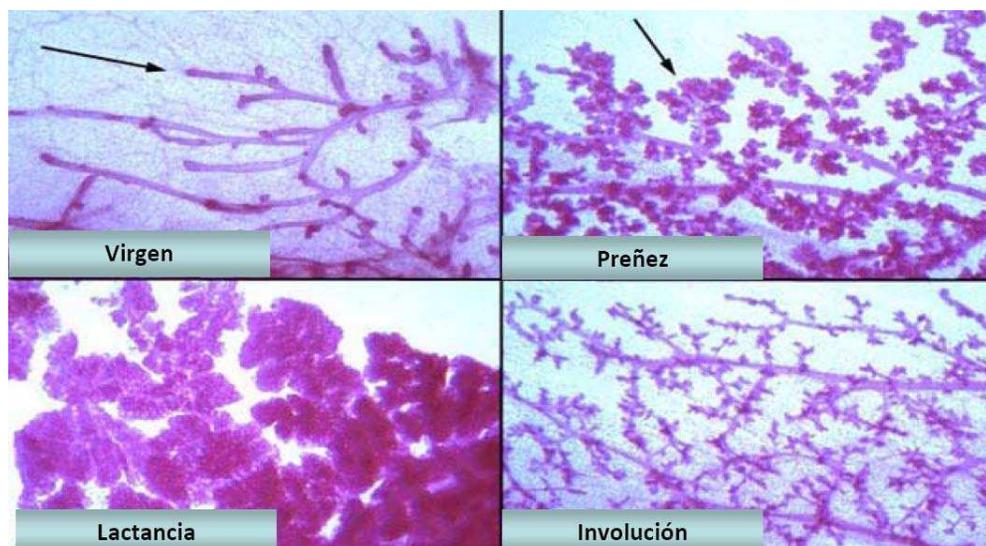
TEBs constituyen el frente de crecimiento de los conductos que invaden, se elongan y se ramifican en conductos secundarios y terciarios dentro de la almohadilla de grasa. Esta extensa actividad mitótica, estimulada por las hormonas ováricas e iniciada desde los TEBs, continúa hasta que la almohadilla de grasa es llenada por completo. Así, los estrógenos y la progesterona estimulan el desarrollo de los conductos y alvéolos en la glándula mamaria de las hembras durante cada etapa del ciclo reproductivo del ratón.

Al finalizar la pubertad, con el transcurso de los ciclos estrales, los TEBs dan lugar también a brotes alveolares que más tarde, durante el desarrollo, se transforman en los alveolos secretorios. Cuando ya no existe más lugar disponible para el crecimiento de los conductos en la almohadilla de grasa, los TEB regresionan y desaparecen y los conductos quedan en un estado de quiescencia (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000) **(Figura 1)**.

La preñez del ratón dura entre 19 y 21 días. Al comienzo, ocurre la proliferación masiva en los conductos y la formación de muchos brotes alveolares, promovida por los elevados niveles de estrógeno, progesterona, otras hormonas esteroideas ováricas y hormonas pituitarias. Entre ellas se encuentran las que regula el compromiso de las células epiteliales de un linaje ductal hacia uno alveolar (Ver vía JAK/STAT y STATs en la glándula mamaria más adelante). Durante esta etapa, se produce un incremento de las células epiteliales con respecto a los adipocitos y se forman capilares rodeando cada estructura alveolar. Durante la segunda mitad de la preñez los brotes alveolares se dividen y se diferencian a alvéolos, que son las unidades funcionales para la producción y secreción de leche. Estas estructuras, poseen también una capa de células epiteliales lumbinales y una capa de células mioepiteliales. Las células lumbinales de los alveolos serán luego las productoras de leche y las mioepiteliales funcionaran como elementos contráctiles para promover su expulsión hacia el exterior **(Figura 1)**.

Hacia el final de la preñez el lactógeno placentario y la prolactina, actuando a través de la activación de la vía JAK2/STAT5 (se describe con más detalle más adelante), estimulan la diferenciación alveolar y la lactogénesis. El estroma mamario ha sido reemplazado completamente por alvéolos que ocupan toda la almohadilla de grasa y a partir de este momento la glándula es capaz de producir leche.

La leche está compuesta por proteínas (diferentes caseínas,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, proteína ácida de suero (WAP), lactoferrina, transferrinas, inmunoglobulinas y enzimas lipogénicas entre otras); lípidos (principalmente triglicéridos) y lactosa (Kelly et al., 2002). Un día antes del parto las células epiteliales comienzan a secretar leche copiosamente y la liberación de oxitocina por parte de la hipófisis estimula la contracción de las células mioepiteliales alveolares expulsando el contenido alveolar hacia el exterior (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000). Hacia el final de la preñez y luego del parto, se produce una caída abrupta de los niveles circulantes de estrógeno y progesterona sistémicos. A partir de este momento la arquitectura funcional de la glándula se mantiene principalmente gracias a la prolactina, liberada desde la glándula pituitaria en respuesta al estímulo de succión de las crías, y a la colaboración de los glucocorticoides en el crecimiento alveolar y ductal y durante la lactogénesis (Reichardt et al., 2001; Topper and Freeman, 1980). El período de lactancia es el estadio de máxima diferenciación de la glándula mamaria y perdura por 3 semanas, cuando se produce la falta prolongada de succión debido a que las crías ya ingieren alimento sólido (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000) (**Figura 1**).



**Figura 1. Estructura de la glándula mamaria durante el desarrollo post-natal.** Se observa el árbol de conductos de una hembra adulta virgen (arriba a la izquierda, la flecha señala un brote terminal). Durante la preñez se observa el desarrollo de las estructuras lobulo-alveolares (flecha) que aumentan hasta alcanzar su máxima diferenciación y tamaño durante de lactancia donde se encuentran llenas de leche. Durante la involución, la mama regresa a un estado similar al de una hembra virgen, aunque un poco más ramificada y con algunos alvéolos. Fotografías tomadas a partir de montajes de glándula mamaria completa.

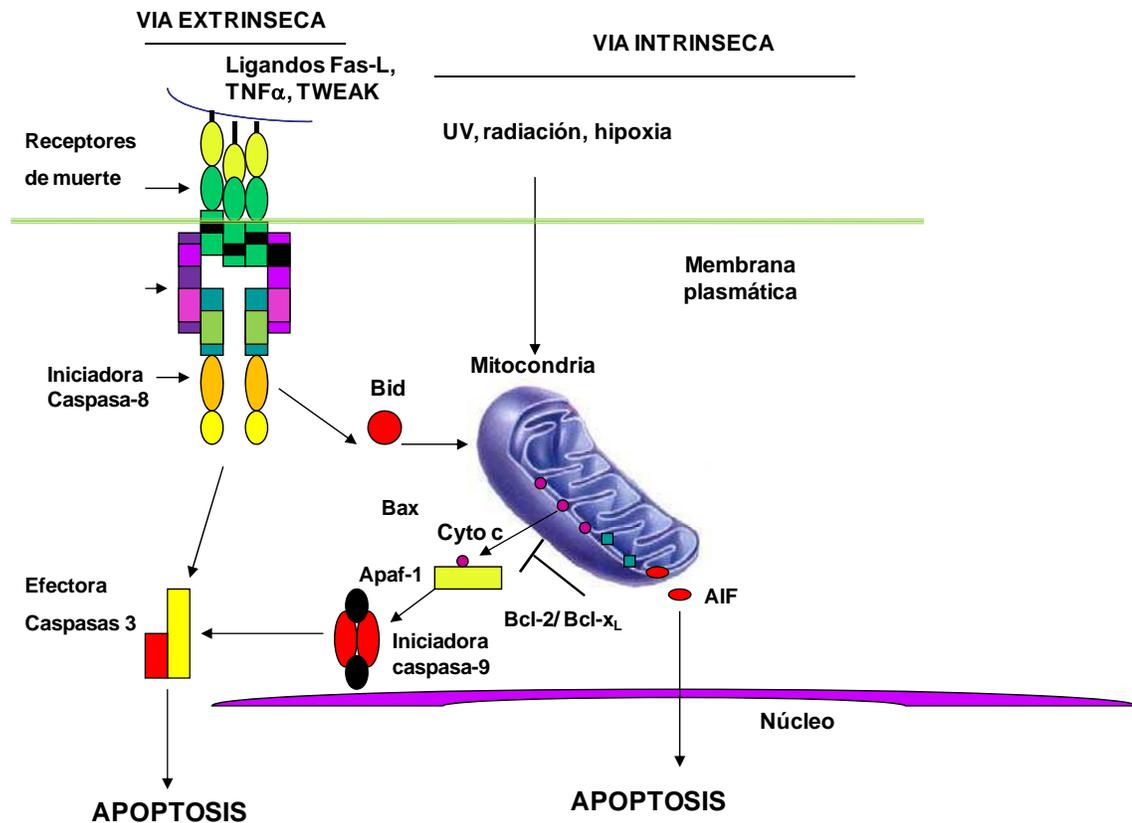
Adaptado de (<http://mammary.nih.gov/reviews/development/Development001>).

### 1.2.2 La involución mamaria

Al producirse el destete, se inicia el proceso de involución mamaria que, como se mencionó previamente, comprende la muerte del epitelio secretorio y el remodelado de la glándula. La muerte del epitelio secretorio se da a través de un tipo de muerte celular programada conocido como apoptosis que se caracteriza no producir respuesta inflamatoria (Earnshaw, 1999). Si bien la involución natural producida por la falta de succión de las crías, luego de tres semanas de lactancia, es un proceso lento y progresivo, como modelo experimental para el estudio de este estadio, se utilizan hembras a las que se les retiran las crías luego de 5-10 días de lactancia. En este modelo, el retiro abrupto de las crías, genera una involución sincronizada en la que ocurren los mismos eventos que en la involución natural (Quarrie et al., 1996) (**Figura 1**).

Al iniciarse la involución, se produce un cambio en la activación de cascadas de señales específicas y la regulación de la expresión de genes que inducen la apoptosis del epitelio secretorio. Este tipo de muerte celular, involucra la activación de una cascada de proteasas específicas denominadas caspasas, que pertenecen a una familia altamente conservada de cisteína-proteasas. Las primeras caspasas que se activan se conocen como caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y aquellas que llevan a cabo el proceso apoptótico, se denominan caspasas efectoras (3, 6 y 7). Una vez activadas las caspasas efectoras, el proceso de muerte se vuelve irreversible. A su vez, estas cascadas de caspasas pueden activarse, al menos, a través de 2 vías: la vía intrínseca o vía mitocondrial o a través de la vía extrínseca o de receptores de muerte. La activación de la vía intrínseca se caracteriza por requerir un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación al citosol de proteínas mitocondriales, como el Citocromo c lo cual desencadena la activación de las caspasas efectoras (**Figura 2**). La permeabilización de la membrana mitocondrial, es fundamental en la inducción de la apoptosis mediada por esta vía y se encuentra regulada, principalmente, por las proteínas de la familia Bcl-2. Dentro de esta familia, existen miembros anti-apoptóticos (Bcl-2 y Bcl-XL por ejemplo) y pro-apoptóticos (Bcl-Xc, Bax y Bad, por ejemplo). Mientras que la activación de la vía extrínseca se produce cuando ligandos específicos como TNF $\alpha$  o el ligando de Fas (Fas-L) se unen a los receptores de muerte (ej, TNFR1) ubicados en la membrana plasmática. La unión del ligando promueve la oligomerización de

estos receptores y el agrupamiento de dominios citoplasmáticos del receptor denominadas dominios de muerte, la consecuente asociación de la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte de FAD o *Fas-associated death domain*), el reclutamiento y activación de la caspasa iniciadora 8 y finalmente, la activación las caspasas efectoras (Gewies, 2003) (**Figura 2**).



**Figura 2. Vías extrínsecas e intrínsecas de inducción de apoptosis.** Esquema simplificado que representa algunas de las proteínas involucradas en la inducción de la apoptosis por la vía de receptores de muerte y la vía mitocondrial. Se indican algunas de las caspasas involucradas y se esquematiza la comunicación entre las dos vías mediada por Bid.

En particular, la muerte apoptótica del epitelio secretorio durante la involución, se produce, principalmente por la vía mitocondrial (Marti et al., 2001) aunque, durante las primeras 12 horas de involución, también se produce la activación de la vía extrínseca como consecuencia del significativo aumento de los ligandos de receptores de muerte  $TNF\alpha$ , TWEAK, FasL y TRAIL durante este período (Clarkson et al., 2004).

Durante la involución, a nivel histológico, se puede observar el aplanamiento de las células epiteliales alveolares debido al aumento de leche acumulada en el lumen alveolar. La muerte de las células epiteliales alveolares por apoptosis comienza desde muy temprano y alcanza un pico máximo a los 4 días luego del destete. Estas células apoptóticas son extruídas hacia el lumen y fagocitadas por las células epiteliales vecinas o por macrófagos que invaden la región, sin embargo, la estructura del epitelio permanece organizada. Hacia el tercer día de involución y a medida que las células alveolares van siendo removidas, se produce el colapso de los alvéolos en racimos de células epiteliales y se comienza a observar una gran presencia de adipocitos. El epitelio comienza a desorganizarse, aunque las estructuras alveolares aún se hallan presentes. El área ocupada por los adipocitos continúa creciendo mientras que disminuye aquella ocupada por células epiteliales y entre los días 6 y 8 ya ha ocurrido la mayor parte de la apoptosis y colapsan todos los alvéolos. La glándula continúa el proceso de remodelado hasta el día 21 aproximadamente, momento en el cual adquiere una estructura y grado de diferenciación similar al que poseía en el estado previo a la preñez, con la mayoría de su volumen ocupado por estroma (Richert et al., 2000).

Utilizando el modelo de involución forzada descrito anteriormente, se ha clasificado a la involución mamaria en 2 etapas: una etapa reversible y otra irreversible (Lund et al., 1996). La etapa reversible, abarca las primeras 48hs luego del destete y se caracteriza por el comienzo de la apoptosis de las células epiteliales alveolares. Si durante ese lapso reaparece el estímulo de succión, la muerte celular se detiene y la lactancia se re-establece. Otro modelo para inducir involución consiste en sellar con pegamento quirúrgico sólo algunos de los pezones de la hembra durante la lactancia, evitando la salida de leche, mientras se mantiene el amamantamiento a las crías por el resto de las mamas. Estos estudios demostraron que la etapa inicial es regulada por factores locales que inducen la muerte del

epitelio secretorio, cuya liberación es disparada por la acumulación de leche en cada mama de manera individual, y que resulta independiente de los niveles de hormonas circulantes (Kritikou et al., 2003; Li et al., 1997; Marti et al., 1997; Schere-Levy et al., 2003). La segunda fase de la involución mamaria, se inicia con la disminución de los niveles sistémicos de hormonas lactogénicas y resulta irreversible. Durante este período se produce la mayor cantidad de muerte del epitelio secretorio y también, debido al aumento de la actividad de metaloproteasas específicas (MMPs), se lleva a cabo el remodelado de la glándula (Lund et al., 1996).

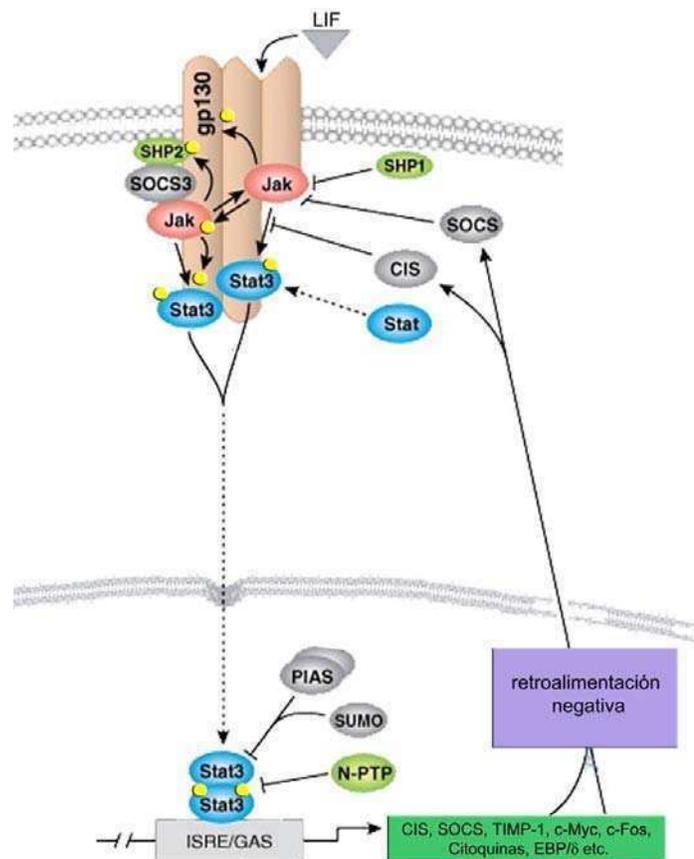
### **1.2.3 Factores y cascada de señales en la involución mamaria**

Los cambios más dramáticos en la morfología y función de la glándula mamaria ocurren durante la involución post-lactancia (Andres and Strange, 1999; Strange et al., 1995; Walker NI et al., 1989). En la última década, se han identificado a la vía JAK/STAT, la señalización disparada por los receptores de muerte (en particular TWEAK), la vía inducida por TGF $\beta$ 3 y la inhibición de la vía PI3K/ AKT como los componentes esenciales de la involución mamaria.

#### **1.2.3.1 La vía JAK/STAT**

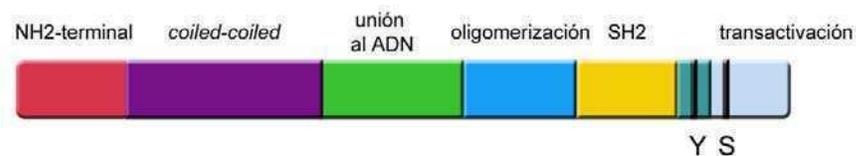
La familia de las quinasas JAK, comprende a las proteínas quinasas JAK1, JAK2, TYK2 y JAK3 que en su estado inactivo (des-fosforiladas) se las puede encontrar libres o asociadas a los dominios citoplasmáticos de receptores acoplados a tirosina-quinasa. La activación de las JAKs se produce cuando citoquinas (LIF, IL-6, IL-4, IL-13, OSM, CNT-F, CT-1 IFN $\gamma$  entre otras) u hormonas de crecimiento (GH, PRL, PDGF, Insulina, entre otros) se unen a sus respectivos receptores. En el caso de receptores con actividad de tirosina quinasa como los de PRL, PDGF e Insulina, el cambio conformacional producido por la unión del ligando induce la activación del dominio con actividad quinasa, promoviendo su auto-fosforilación en residuos tirosina específicos. Estos residuos de tirosina fosforilados del receptor, son reconocidos por las JAKs. En el caso de los receptores, en donde la JAK inactiva se encuentra constitutivamente asociada al dominio citoplasmático del receptor (LIF, IL-6, IL-4, IL-13, etc), la oligomerización inducida por la unión del ligando produce el

acercamiento de las JAKs promoviendo su autofosforilación y/o fosforilación cruzada en residuos de tirosina conservados. Ambos mecanismos de fosforilación en tirosina de las JAKs, induce su actividad catalítica y promueve a su vez que fosforilen en residuos tirosina al receptor creando sitios de interacción para otras proteínas que contengan dominios SH2 (dominios homólogos a la proteína src) (Rane and Reddy, 2000; Rawlings et al., 2004). Una vez que las JAKs fosforilan los residuos tirosina del receptor crean sitios de anclaje reconocidos por los dominios SH2 de los factores de transcripción STATs. El reclutamiento de los STATs al dominio del receptor permite que sean fosforilados por las JAKs en un residuo tirosina determinado y una vez fosforilados, los dímeros de STAT, se translocan al núcleo donde regulan las transcripción de genes específicos (Heinrich et al., 2003; Rane and Reddy, 2000; Rawlings et al., 2004; Schindler and Plumlee, 2008) (**Figura 3**)



**Figura 3. Vía de activación JAK/STAT.** Esquema del mecanismo de activación de STAT3. Los círculos amarillos indican fosforilaciones en tirosina de las moléculas en los diferentes componentes. Al activarse STAT3 se transloca al núcleo donde regula la expresión de genes con secuencias ISRE/GAS. Algunas de las proteínas codificadas por estos genes mediarán la regulación negativa de esta vía (por ej. las fosfatasas SOCS y CIS). Adaptado de [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Jak\\_Stat\\_IL\\_6.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Jak_Stat_IL_6.html).

La familia de factores de transcripción STAT se encuentra integrada en mamíferos por 7 miembros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6. Estos factores de transcripción en su forma des-fosforilada se encuentran mayoritariamente en el citoplasma formando complejos denominados “STATosomas” (Schindler and Plumlee, 2008). Los STATs poseen varios dominios estructurales y/o funcionales que a lo largo del N-terminal al C-terminal abarcan: un dominio de oligomerización bien conservado, que promueve la formación de dímeros homotípicos de los STATs defosforilados, favoreciendo la posterior fosforilación conjunta; un dominio *coiled-coil*, que permite la asociación con proteínas regulatorias y el cual también ha sido implicado en el control de proceso de exportación e importación al núcleo; un dominio de unión al ADN, también muy conservado y que media una fuerte unión a secuencias palindrómicas GAS (con excepción de STAT2) y el cual también ha sido implicado en la regulación del transporte al núcleo (**Figura 4**).



**Figura 4. Dominios estructurales de los STATs.** Esquema de la distribución de los diferentes dominios estructurales y funcionales en las moléculas de STATs: la porción NH2 terminal, dominio *coiled-coil*, dominio de unión al ADN, dominio de oligomerización, dominio SH2, (Y) que corresponde al sitio de fosforilación en tirosina y (S) al de fosforilación en serina y el dominio de transactivación.

La vía JAK/STAT es el mecanismo principal de señalización que utilizan diversas citoquinas y factores de crecimiento en la regulación de la proliferación, el estado de diferenciación, la migración celular y la muerte en múltiples procesos como la hematopoesis, el desarrollo del sistema inmune y la adipogénesis (Rawlings et al., 2004). En particular, en el epitelio mamario, es una de las vías críticas en determinar el estado de diferenciación, la supervivencia y la muerte por apoptosis. El inicio de la involución mamaria se caracteriza por un cambio en el patrón de fosforilación, de miembros específicos de la familia STAT: una disminución en los niveles de pSTAT5A y pSTAT5B y sus formas sin fosforilar y un marcado aumento de pSTAT3 (Li et al., 1997; Liu et al., 1996).

A pesar de que el mecanismo de señalización de la vía JAK/STAT es en teoría relativamente simple, las consecuencias biológicas de la activación de este camino de señalización se hacen más complejas por las múltiples interacciones que esta vía tiene con otras cascadas de señales (Heinrich et al., 2003; Rane and Reddy, 2000; Shuai, 2000). En primer lugar, los STATs pueden también ser fosforilados en tirosina, de manera independiente de JAK por receptores de tirosina quinasa, como el receptor del factor epidermal de crecimiento (EGFR), y por otras tirosina quinazas como c-Src (Rane and Reddy, 2000; Rawlings et al., 2004).

Otra modificación post-trasduccional que pueden sufrir los STATs (STAT1, STAT3 y STAT5A y B) es la fosforilación de un residuo serina. Aún es controversial cómo esta fosforilación regula la actividad de estos factores de transcripción, mientras algunos resultados sugieren que es necesaria para la formación del homodímero de STAT3 y su unión al ADN (Zhang et al., 1995). Por otro lado, hay trabajos que han demostrado que la fosforilación en serina de STAT3, modula negativamente su fosforilación en tirosina y su actividad transcripcional (Chung et al., 1997; Lim and Cao, 1999).

Aún no es claro cuál o cuáles son las quinazas de serina, responsables de esta fosforilación. Tanto STAT1 como STAT3 y STAT4 poseen un sitio de fosforilación conservado (-Pro-X-Ser-Pro-), propuesto para proteínas quinazas de serinas activadas por mitógenos (**Mitogen Activated Protein Kinases** o MAPKs), sugiriendo que las mismas participan en la fosforilación de estos STATs. Por otro lado, dependiendo del sistema estudiado y la citoquina o factor de crecimiento investigado se han encontrado varias quinazas involucradas en esta fosforilación (ej., p38: STATs 1, 3 & 4; ERK: STATs 3 & 5; JNK: STAT3), PKC $\delta$  (STAT1 & STAT3), mTOR (STAT3), NLK (STAT3), CaMKII e IKK $\epsilon$  (STAT1). Sin embargo, se han realizado muy pocos experimentos que avalen el rol de estas serina-quinazas en la regulación de la actividad transcripcional de los STATs.

La regulación de la señalización de los STATs se encuentra finamente regulada en términos de intensidad y duración de la señal a través de mecanismos entre los que se incluyen la familia de supresores de la señalización de citoquinas (SOCS), las proteínas inhibitorias de la apoptosis (PIAS) y fosfatasas en tirosina (PTPs) (Rane and Reddy, 2000; Xu and Qu, 2008). Los STATs se encuentran regulados por múltiples vías de tirosina quinazas y por ende resultan ser moléculas

claves donde convergen y se integran los efectos de diversos estímulos. Para agregar complejidad, actualmente existen evidencias que indican que los STATs podrían sufrir otro tipo de modificaciones post-traduccionales como metilación, acetilación y SUMOilación (Frank, 2007).

### **De PRL/JAK/STAT5 a LIF/JAK/STAT3**

Como mencionamos anteriormente, el inicio de la involución mamaria se caracteriza por un cambio en el patrón de fosforilación y activación, de miembros específicos de la familia STAT: una disminución en los niveles de pSTAT5A y pSTAT5B y sus formas sin fosforilar y el marcado aumento de pSTAT3.

### **STAT5A - Desarrollo lóbulo-alveolar y expresión de proteínas de la leche**

Durante la lactancia, la Prolactina (PRL) circulante, media su efecto a través de la unión de esta hormona a su receptor específico (RPRL). La dimerización del receptor de RPRL inducida por el ligando recluta y activa a la quinasa JAK2 la cual a su vez produce la fosforilación de STAT5A y STAT5B. Una vez fosforilados, estos factores se translocan al núcleo y regulan la expresión genes involucrados en la supervivencia y diferenciación de los lóbulos secretorios y genes que codifican para proteínas de la leche como WAP y  $\beta$ -caseína. La relevancia de la vía PRL/JAK2/STAT5 en el desarrollo lóbulo-alveolar y la lactancia salió a la luz a raíz a partir de varios trabajos en los que se utilizaron ratones *knock out*. Los ratones *knock out* para PRL y PRLR (Horseman et al., 1997; Ormandy et al., 1997) mostraron un fenotipo mamario muy similar a ratones *knock out*, específicos para JAK2 en glándula mamaria (Wagner et al., 2004) que se caracterizan por la falta de desarrollo lóbulo-alveolar y de lactancia. Esto también se observó en los ratones con pérdida en la expresión de STAT5A o de STAT5A y STAT5B (que tuvieron el mismo fenotipo). Así, se determinó que en conjunto, estos dos factores de transcripción median las respuestas a PRL y GH en la glándula mamaria (Teglund et al., 1998). Sin embargo, aunque en general los factores STAT5A y STAT5B presentan funciones redundantes en otros tejidos, sólo STAT5A es indispensable para la morfogénesis de la glándula mamaria y la producción de leche durante la lactancia.

Ratones *knock out* para STAT5a tuvieron reducido el desarrollo lóbulo-alveolar durante la preñez y la lactancia no pudo llevarse a cabo por falta de diferenciación aún en presencia de STAT5B. Es por esto que el estado de fosforilación de STAT5A es considerado como un indicador del estado de diferenciación del epitelio mamario (Liu et al., 1996; Watson, 2001; Watson and Khaled, 2008).

### **STAT3 – El mediador esencial de la involución mamaria**

La involución mamaria comienza al interrumpirse el amamantamiento con la activación de la vía LIF/JAK/STAT3 como principal responsable encontrada hasta el momento.

Inicialmente, el marcado aumento de los niveles de fosforilación de STAT3 en la involución mamaria, reveló su potencial rol durante este estadio. Debido a que la inactivación de STAT3 es letal para el embrión (Takeda et al., 1997), fue en estudios de delección condicional de STAT3 a través de la expresión específica de la recombinasa Cre en el epitelio mamario durante la lactancia (Selbert et al., 1998) que se demostró que STAT3 es esencial para el inicio de la apoptosis y el remodelado de la mama durante la involución (Chapman et al., 1999). Estos resultados fueron posteriormente confirmados por otro grupo de trabajo independiente, en ratones *knock out* para STAT3 (Humphreys et al., 2002). En ambos estudios la ausencia de STAT3 retrasó la fase de la involución por varios días, demostrando la importancia de la activación de este factor de transcripción en la inducción de la involución mamaria.

Con el objetivo de identificar qué factores eran relevantes en la activación de la vía JAK/STAT3 durante la involución mamaria, Hennighausen y su grupo analizaron el desarrollo de las glándulas mamarias de ratones *knock out* para IL-6. IL-6 pertenece a la familia de citoquinas de IL-6 junto LIF, OSM, IL-11, CT-1 y CNTF-1. IL-6 se une a su receptor IL6R $\alpha$  (gp80), recluta e induce la homodimerización de 2 subunidades transductoras de la señal (gp130) promoviendo la activación de la vía JAK/STAT3. Hennighausen y sus colaboradores, habían encontrado que tanto IL-6 como su receptor aumentaban su expresión durante la involución mamaria en los ratones *wild type*. Al momento de analizar las mamas de los ratones *knock out* para IL-6, observaron un retraso limitado en la involución

mamaria, que se caracterizaba por un pequeño retardo en la aparición de células apoptóticas en comparación con las mamas *wild type*. Llamativamente, los niveles de pSTAT3 resultaron similares a los de los ratones control (Zhao et al., 2002) indicando que IL-6 no tendría un rol principal en la activación de la vía JAK/STAT3 durante la involución mamaria.

### **El LIF es el activador de STAT3 en el epitelio mamario**

El LIF es una glicoproteína de secreción de 38 a 67 kDa que pertenece a la familia de citoquinas de la familia de IL-6 y su nombre deriva del efecto que se observó que tiene en la diferenciación de células leucémicas mieloides a macrófagos (Gearing et al., 1987). Esta citoquina se expresa en una gran variedad de tejidos adultos y despliega diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, el LIF regula las funciones endócrinas del eje hipotálamo-pituitario–adrenal, la unidad útero-placental, mantiene la pluri-potencialidad de células madres embrionarias, la diferenciación de la línea hematopoyética y la diferenciación neuronal (Bousquet and Melmed, 1999; Ernst et al., 1999; Gadiant and Patterson, 1999; Kim and Melmed, 1999; Schwartz et al., 1999; Taga and Kishimoto, 1997).

Es interesante que más allá de la redundancia funcional que existe entre los integrantes de la familia de IL-6 en varios tejidos, trabajos de nuestro grupo y el de Watson, identificaron al LIF como responsable fisiológico de la activación de la vía JAK/STAT3 en el epitelio mamario al inicio de la involución mamaria post-lactancia (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). En el primero de los trabajos, demostramos que el LIF y su receptor (LIFR) se expresan durante los diferentes estadios del desarrollo mamario. Encontramos que los niveles de expresión de LIF son altos durante el desarrollo temprano y la preñez, disminuyen hasta niveles indetectables durante la lactancia y aumentaban significativamente al inicio de la involución mamaria alcanzando un pico a las 48 horas luego del destete, sin observar modulación de los niveles de la subunidad específica de su receptor (gp190) Además, reportamos la capacidad del LIF para activar STAT3 en un estudio donde se observó que el implante de pellets de LIF indujo la fosforilación de STAT3 y la apoptosis del epitelio en mamas lactantes (Schere-Levy et al., 2003). Este trabajo aportó más evidencias de que la muerte del epitelio secretorio no depende

de los niveles de hormonas lactogénicas circulantes. En paralelo, el grupo de Watson observó que en las glándulas mamarias de ratones *knock out* para LIF, la involución sufría un retraso importante, con niveles de fosforilación de STAT3 indetectables y la muerte por apoptosis marcadamente disminuida (Kritikou et al., 2003).

Como se mencionó previamente, la activación de la vía JAK/STAT3 por parte de citoquinas inflamatorias puede ser modulada por múltiples interacciones con otras vías de señalización que se regulan marcadamente durante el desarrollo mamario. Entre ellas se encuentran la vía de las MAPKs y la vía de PI3K, que a su vez pueden estar mediadas por la activación de otros receptores como el EGFR y GR (Carpenter, 1999; Edwin et al., 2006; Lerner et al., 2003).

### 1.2.3.2 MAPKs

Las MAPKs son activadas por diversos tipos de estímulos y han sido asociadas al control de procesos celulares tan importantes como la proliferación celular, el crecimiento de la célula, la apoptosis y la diferenciación (Katz et al., 2007).

Las cuatro MAPKs mejor descritas son: ERK 1 y 2 (**Ex**tracellular signal-**R**elated **K**inases), JNK 1, 2 y 3 (**Jun** amino-terminal **K**inases), p38-MAPK y ERK 5 (Katz et al., 2007). Las MAPKs se activan al ser fosforiladas en tirosina y treonina por quinasas duales específicas, las quinasas de MAPK (MAPKK, MEKs), en un motivo conservado TXT (treonina, X, tirosina) de su dominio quinasa (**Figura 5**). La actividad de las quinasas de MAPKs se encuentra, a su vez, regulada por fosforilación en serina y treonina en un motivo conservado de su dominio quinasa, por las quinasas de quinasas de MAPK (MAPKKK o MEKKs), que son la capa más externa en la cascada de señalización. La activación de estas últimas se encuentra determinada por diferentes factores entre los que se encuentran otras quinasas y proteínas pequeñas que unen GTP (sGp). Las proteínas sGp de la vía ERK son las proteínas Ras (Dhillon and Kolch, 2002; Lee et al., 2002) mientras que los miembros de la familia Rho (Rac1, Cdc42, RhoA y RhoB) actúan en las vías de la p38 y JNK (Dong et al., 2002) (**Figura 5**). Las características de activación en capas es compartido por las 4 cascadas o módulos de MAPKs mencionados refiriéndose su nombre al componente de la capa más profunda. Enzimas específicas, denominadas

fosfatasas, hidrolizan estas proteínas fosforiladas finalizando la señal de activación de las mismas. A pesar de que cada una de estas cascadas comparte el patrón de activación, existen estrictas especificidades dentro de cada módulo de MAPKs (ERK, JNK o p38) preservándose un cierto grado de linealidad dentro de cada vía. Las MAPKKs son a menudo muy selectivas, y no entrecruzan miembros de diferentes unidades MAPK, en algunos casos MAPKKs pueden discriminar entre isoformas de un módulo dado (Mayor et al., 2007). Sin embargo, la comunicación cruzada entre distintos módulos de MAPKs más aún, entre distintos tipos de señalización, es muy frecuente.

## **ERK 1 y 2**

La vía de MAPK de ERK1/2 se activa generalmente, a través de receptores con actividad de quinasa en tirosina o de receptores acoplados a quinasas en tirosina como las JAKs, o de receptores acoplados a proteínas G. Las principales ERKs en mamíferos, ERK1 y ERK2, son activadas por las MAPKKs MEK1 y MEK2 al ser fosforiladas en el motivo conservado TEY específico de las ERKs.

Las proteínas blanco de ERK1/2 incluyen factores de transcripción (Elk-1, Ets 1 y 2, Sap1a, m-Myc, c-Fos), proteínas adaptadoras, enzimas quinasa (p90RskS6, fosfolipasa A2) y receptores de superficie celular y nuclear (como el receptor del factor de crecimiento epidermal y los receptores estrogénicos), entre otros. El estudio de las consecuencias fisiológicas mediadas por la señalización de ERK se ha visto facilitado por la disponibilidad de inhibidores farmacológicos de la acción de ERK, como el PD98059 y el U0126, entre otros. Estas moléculas actúan inhibiendo la actividad catalítica de las MAPKKs MEK1 y MEK2 pero, como sucede con la mayoría de los inhibidores farmacológicos, la especificidad del PD98059 no es absoluta ya que posee un potente efecto inhibitorio de la ciclo-oxigenasa 1 y 2 y además sobre los receptores de arilo (Reiners et al., 1998). Desde una perspectiva fisiológica, la señalización por ERK1/2 participa principalmente en procesos mitogénicos, en la diferenciación y migración celular (Katz et al., 2007).

En el caso de los receptores acoplados a quinasas en tirosina como los receptores de la familia de IL-6, en particular para gp130 y el LIFR $\alpha$ , la activación de ERK 1 y 2 se produce porque, al ser fosforiladas las subunidades del receptor, se

induce el reclutamiento de SHP2 (**SH2**-domain-containing tyrosine phosphatase) que al ser fosforilada en tirosina por las JAKs, interacciona con el complejo Grb2–SOS (growthfactor-receptor-bound protein/Son of Sevenless). El reclutamiento de SOS, que es un factor intercambiador de nucleótidos guanina al complejo receptor en la membrana, promueve el intercambio de GDP por GTP en la proteínas G pequeña Ras que se activa e induce la fosforilación de Raf (MAPKKK). Raf activada fosforila y activa a MEK (MAPKK) la cual a su vez, como describimos antes, continúa en la progresión de la cascada, activando a ERK 1 y 2 (Heinrich et al., 2003).

### **ERK1 y 2 en la glándula mamaria**

Cuando se analizaron los niveles de expresión y fosforilación de la MAPK ERK1/2 durante los diferentes estadios del desarrollo de la glándula mamaria, se observó que ERK1 y 2 se activaban de manera recíproca a STAT3. Los niveles de pERK1/2 eran altos durante el desarrollo temprano (hembra virgen), la preñez, la lactancia y disminuían significativamente al iniciarse la involución. Cuando se analizaron los niveles de pERK1/2 y pSTAT3 en las glándulas mamarias de ratones *knock out* para LIF, observaron una disminución de los niveles de pERK en etapas tempranas del desarrollo (virgen) y a pesar de los bajos niveles de pERK de las mamas en involución de los ratones *wild type*, los niveles de activación de ERK1/2 disminuían aún más en ausencia de LIF. Esto sugería que LIF al unirse a su receptor, estaba induciendo la activación de esta MAPK. Por otro lado, cuando compararon los niveles de fosforilación de ERK y STAT3 en mamas en involución de ratones *knock out* para STAT3, observaron que los niveles de pERK aumentaban dramáticamente (Kritikou et al., 2003), sugiriendo que STAT3 regula negativamente los niveles de pERK durante la involución y que la supresión de la activación de esta vía de supervivencia es necesaria para que se lleve a cabo normalmente la involución de la mama. Estos resultados, fueron parcialmente confirmados por estudios *in vitro*, con células epiteliales mamarias, en los cuales el tratamiento con LIF indujo un rápido aumento de los niveles de pERK1/2 y pSTAT3 sin embargo, mientras los niveles de pSTAT3 se mantenían durante horas, los de pERK1/2 disminuían rápidamente (Kritikou et al., 2003). Se han publicado varios trabajos que muestran más evidencias de la activación de ERK1/2 a través de citoquinas de la familia de IL-6 en mama, por ejemplo, en ratones *knock out* para IL-6 (Zhao et al.,

2002) o para la subunidad gp130 (compartida por los receptores de la familia de IL-6) (Zhao et al., 2004) los cuales tenían disminuidos los niveles de pERK comparados con aquellos de los ratones *wild type*.

En conjunto, estas observaciones indican que tanto LIF como IL-6 activan las vías de ERK y de MAPKs, e inducen la activación de STAT3, pero que, sin embargo, es necesario que los niveles de fosforilación de ERK1/2 disminuyan para que STAT3 pueda inducir la apoptosis del epitelio mamario. Además, dichas observaciones aportan evidencias de que STAT3 podría estar regulando negativamente la vía de supervivencia dada por la activación de las MAPKs ERK1/2.

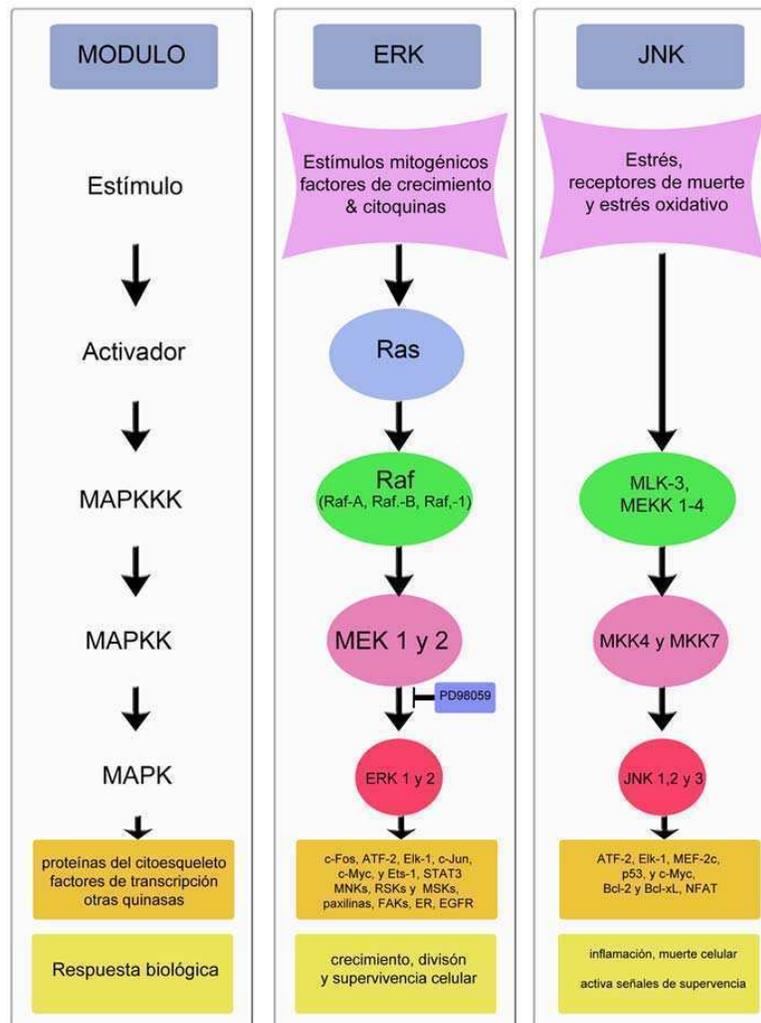
## **JNK**

Los miembros de la familia de JNK se activan generalmente en respuesta a estrés celular como hipertonicidad, radiación ultravioleta, shock térmico y por la acción de citoquinas pro-inflamatorias. Dentro de esta familia se encuentran JNK1 (conocida también como p46 o SAPK1 $\gamma$ ) y JNK2 (conocida también como p54 o SAPK1 $\alpha$ ), ambas de expresión ubicua y JNK3 (también conocida como p49 o SAPK1 $\beta$ ) que se expresa únicamente en cerebro. Los miembros de la familia JNK se activan por fosforilación dual de los motivos TPY y tienen como proteínas blanco principalmente a los factores de transcripción c-Jun, Elk-1, ATF2, DPC4, NFAT4, y p53. Se han diseñado también inhibidores farmacológicos de la vía de señalización de JNK que facilitan el estudio de la transducción de la señal. Un inhibidor muy utilizado es el SP600125, que inhibe directamente la actividad de las distintas quinasas JNK. *In vivo*, el camino de señalización de JNK participa principalmente en procesos de inflamación, tumorigénesis y apoptosis (Karin and Gallagher, 2005).

### **JNK en la glándula mamaria**

La participación de JNK durante la involución mamaria fue revelada por Marti y colaboradores al analizar la actividad enzimática de esta MAPK, sobre el reconocido sustrato c-Jun (Hibi et al., 1993) en extractos provenientes de glándulas mamarias murinas en estadio de lactancia o al tercer día luego del destete. Ellos detectaron unas cinco veces mayor actividad de JNK en los extractos provenientes

de mamas involucionando comparado con los niveles encontrados en mamas lactando. Posteriormente, observaron por inmuno-histoquímica que los niveles de fosforilación de c-Jun eran indetectables en las mamas lactando y aumentaban marcadamente, con localización nuclear, a partir de los dos días de involución en el compartimiento epitelial de las mamas (Marti et al., 1999). Varios años después, un trabajo realizado en ratas reveló que los niveles de fosforilación de JNK aumentaban marcadamente a partir de las 8 horas luego del destete junto con los niveles de p-c-Jun (Zaragoza et al., 2003). En conjunto estos resultados sugieren que la activación que JNK cumple un rol importante en las células epiteliales mamarias durante la involución y confirman a c-Jun como blanco de esta MAPK durante la involución. De manera acorde con un rol relevante en la regresión mamaria, en la gran mayoría de las células no tumorales, la activación de JNK resulta en la activación de miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 y en la liberación de Citocromo c de la mitocondria (Vasilevskaya and O'Dwyer, 2003).



**Figura 5. Cascada de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ERK y JNK.** Diagrama simplificado de las vías de activación de las MAPKs ERK y JNK y sus componentes. Las vías de señalización de MAPKs se pueden organizar en una cascada de módulos de activación: MAPKKK, MAPKK, MAPK y en la figura se muestran los componentes principales de cada módulo para cada MAPK y se encuentra señalado a qué nivel actúa el inhibidor PD98059.

### 1.2.3.3 La vía de PI3K/AKT

La fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K) IA cumple un rol central en una gran variedad de actividades mediadas por receptores de tirosina quinasas entre las que se incluyen el crecimiento, la proliferación, diferenciación, movilidad, metabolismo e inhibición de la apoptosis. Estas quinasas son heterodímeros formados por una subunidad catalítica p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  p110 $\delta$ ) y una subunidad reguladora (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\alpha$ , p55 $\gamma$ , and p50 $\alpha$ ) con dominios SH2 y SH3. Las tres subunidades

catalíticas conocidas se encuentran codificadas por diferentes genes y difieren marcadamente en su patrón de expresión. Las subunidades regulatorias 'α' se transcriben a partir del mismo gen pero utilizando promotores alternativos, mientras que p85β y p55γ se encuentran codificadas por genes diferentes (Manning and Cantley, 2007).

Cuando los factores de crecimiento, factores crecimiento tipo insulina y citoquinas, se unen a sus respectivos receptores y activan sus actividades quinasas, PI3K, a través de sus dominios SH2, se unen a sitios consenso P-YXXM presentes en los receptores tirosina quinasa o moléculas adaptadoras activadas, promoviendo el reclutamiento del heterodímero de PI3K a la membrana. La unión de p85 a fosfotirosinas genera cambios conformacionales en el heterodímero p85/p110 que llevan a la estimulación de la actividad enzimática de PI3K la cual promueve el agregado de un grupo fosfato en la posición D3 al fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP2) para formar fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). El PIP3 activa una cascada de señales que, a través de la activación de PDK1 y rictor-mTOR (TORC2)/PDK2, promueve la fosforilación de residuos serina y treonina específicos en las quinasas AKT, considerada el blanco principal de la cascada de PI3K (Hirsch et al., 2007; Manning and Cantley, 2007). AKT es una quinasa con actividad en residuos serina y treonina que presenta tres isoformas proteicas, AKT1, AKT2 y AKT3 con una homología estructural del 85%. AKT1 y AKT2 son prácticamente ubicuas, aunque AKT2 se expresa preferentemente en tejidos sensibles a insulina, como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. AKT3, por su parte, se expresa principalmente en cerebro, ovario y testículos.

En diferentes sistemas, se han identificado distintos blancos de fosforilación por AKT implicados en la supervivencia celular. AKT es capaz de bloquear la activación de la caspasa-9, de inducir el secuestro del factor de transcripción Forkhead (involucrado en la expresión de Fas ligando) y de fosforilar, y en consecuencia inactivar, a la proteína pro-apoptótica Bad. AKT fosforila, a su vez, a la quinasa IKK, responsable de la fosforilación del factor inhibidor de NFκB (IκB), regulando así positivamente la señal de supervivencia determinada por la activación de este factor de transcripción (Kane et al., 1999). AKT regula también la función de p53, activa a diversos factores de la transcripción y fosforila varias enzimas implicadas en la captación de la glucosa y en la síntesis de lípidos, glucógeno y

proteínas. Por lo tanto, la fosforilación de diversos sustratos mediada por AKT puede promover cambios a nivel de proliferación celular, supervivencia, metabolismo, diferenciación celular y motilidad, entre otras actividades (Manning and Cantley, 2007).

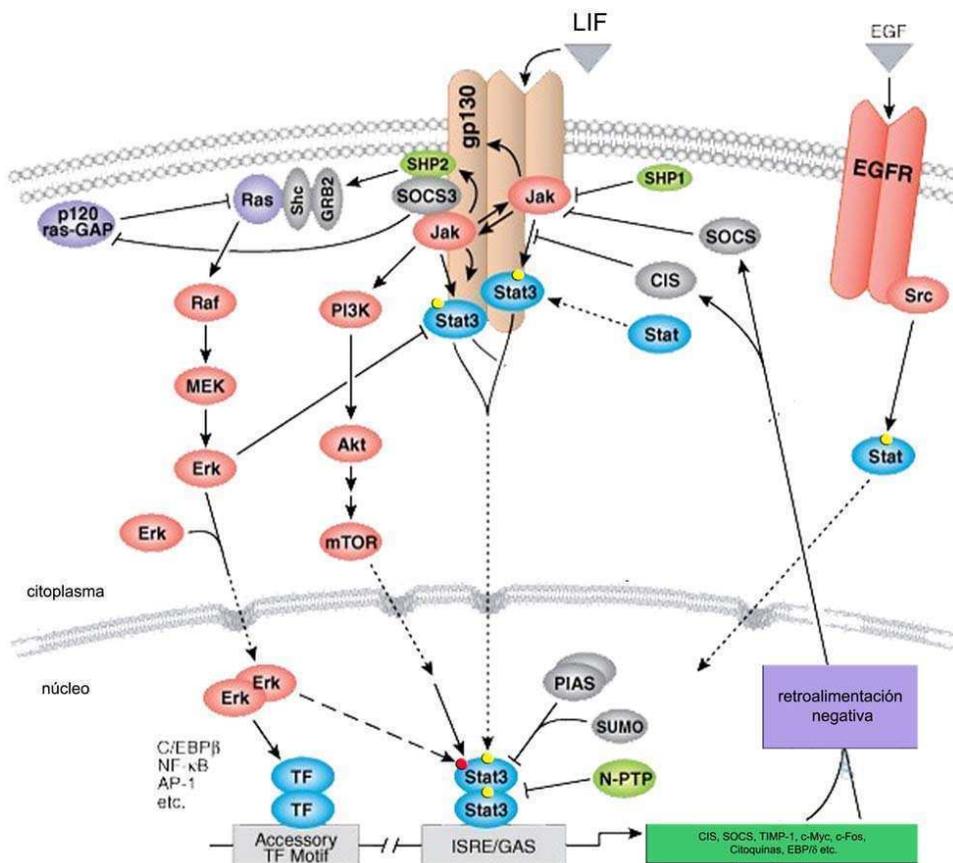
### **La vía de PI3K/AKT en la glándula mamaria**

El hecho de que AKT, en otros sistemas, se active en respuesta a un gran número de hormonas y factores de crecimiento entre los que se encuentra el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de tipo Insulina I (IGF-I), la hormona de crecimiento (GH), el ligando de RANK, Prolactina e integrinas y que la activación de AKT suprime la apoptosis inducida por un gran número de estímulos, sugirió que AKT podría ser una molécula señalizadora clave en el desarrollo y función de la glándula mamaria.

Fue el grupo de Anderson el que por primera vez analizó los niveles de activación de AKT en la mama y que testeó la hipótesis de que para que se inicie la apoptosis del epitelio mamario, los niveles de pAKT tenían que disminuir. Cuando analizaron los niveles de expresión y activación de AKT observaron que, mientras que los niveles de fosforilación de esta quinasa (AKT1 o AKT2) se encontraban altos durante la lactancia, disminuían marcadamente al segundo día de involución mamaria y se mantenían bajos a lo largo del resto de este período. Luego, al sobre-expresar una mutante constitutivamente activa de AKT bajo el promotor de MMTV, que se activa significativamente durante el período de lactancia en el epitelio mamario, observaron que se producía un retardo marcado en la aparición de células apoptóticas y en el remodelado de la glándula durante la involución (Schwertfeger et al., 2001). Estos resultados fueron confirmados por trabajos posteriores que utilizaron otros modelos de transgénicos que sobre-expresan AKT (Ackler et al., 2002; Hutchinson et al., 2001). Estos estudios, revelaron la importancia de la disminución de los niveles de activación de AKT en la transición entre lactancia e involución. Con el objetivo de dilucidar el mecanismo por el cual los niveles de pAKT disminuyen en esta transición, Watson y sus colaboradores examinaron los niveles de expresión de PTEN (una fosfatasa lipídica que desfosforila a PIP3 evitando la activación de AKT (Stambolic et al., 1998) y encontraron que los niveles de esta proteína se encuentran

bajos tanto en la lactancia como en la involución lo que sugiere que PTEN no es el mecanismo en mama responsable de regular negativamente los niveles de pAKT. Luego, al estudiar los niveles de activación de PI3K durante la transición encontraron que sus niveles disminuían marcadamente al iniciarse la involución mamaria. Debido a la activación recíproca que tienen AKT y el factor de transcripción STAT3 en la transición de lactancia a involución, analizaron las glándulas mamarias de ratones *knock out* para STAT3 y hallaron que los niveles de activación de AKT se mantenían altos al finalizar la lactancia mientras que sus niveles totales disminuían (Abell et al., 2005). Estas observaciones indican que los niveles de pAKT se encuentran regulados negativamente por STAT3 y que el nivel total de AKT se modula de manera independiente. A partir de estos resultados, Abell y sus colaboradores, especularon que una explicación posible para la disminución de la actividad de PI(3)K podía ser la alteración en la composición de sus subunidades. Al evaluar los niveles de expresión tanto de ARNm como de proteínas de las diferentes subunidades encontraron que, mientras las subunidades catalíticas no se regulaban, las subunidades regulatorias p55 $\alpha$  y p50 $\alpha$  aumentaban marcadamente mientras que p85 $\alpha$  disminuía al iniciarse la involución mamaria, indicando que se encuentran reguladas a nivel transcripcional y no por degradación proteolítica (Abell et al., 2005).

Hay varias cascadas de señalización que interactúan con la vía de supervivencia dada por PI(3)K/Akt. Una de ellas es la activación de quinasas de adhesiones focales (FAK) determinada por la interacción entre las integrinas de la superficie celular con las proteínas de la matriz extracelular como laminina o fibronectina. Cuando la integridad de las interacciones célula-matriz se pierden durante la involución, la falta de actividad de las FAKs podría interrumpir la señal de supervivencia dada por PI(3)K (Gilmore et al., 2000; Strange et al., 2001). En conjunto, estas observaciones proponen a pAKT como una molécula centinela de las señales de supervivencia y muerte en el epitelio mamario (Watson, 2006).



**Figura 6. Activación de la vía JAK/STAT e interacciones con otras vías.** Esquema del mecanismo de activación de la vía JAK/STAT y las interacciones que tiene con la vía de EGFR, la vía de MAPKs y la vía de PI3K/AKT. En círculos amarillos y rojos se indican los tipos de fosforilaciones que sufre STAT3. En amarillo las fosforilaciones en tirosina y en rojo las fosforilaciones en serina.

adaptado de [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Jak\\_Stat\\_IL\\_6.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Jak_Stat_IL_6.html).

### 1.2.4 Factores iniciadores de la involución mamaria

En los últimos 10 años, se han identificado los factores de expresión local que modulan las cascadas de señales que llevarán a la apoptosis del epitelio mamario y al posterior remodelado de la glándula. A pesar de que conocemos los actores claves en este proceso, aún se desconoce cuáles son las señales locales iniciales que disparan su expresión. Hay dos hipótesis sobre los posibles estímulos de la expresión de estos factores locales. La primer hipótesis propone que al producirse la acumulación de leche dentro de los alvéolos secretorios aumenta la concentración de factores pro-apoptóticos (que salen al exterior durante la lactancia) que resultan

ser los responsables de disparar la muerte del epitelio secretorio. La otra hipótesis es que la acumulación de leche al interrumpirse el amamantamiento produce un aumento de la presión intra-alveolar que estimula mecánicamente a las células epiteliales e induce la expresión de estos factores locales.

## **2. Las señales mecánicas del micro-entorno y la función celular**

Todas las células y los organismos a lo largo del espectro evolutivo, desde el más primitivo hasta el más complejo, son mecano-sensibles (Ingber, 2006). Las células sensan estímulos bioquímicos y biofísicos, los procesan internamente y responden específicamente de acuerdo con el tipo y función celular. Sin embargo, aunque se ha recabado muchísima información acerca de cómo los parámetros bioquímicos afectan el comportamiento y la función celular, el área del conocimiento que estudia los parámetros físicos es relativamente joven.

Históricamente, las investigaciones de los procesos celulares que traducen el estímulo mecánico en señales bioquímicas (mecano-transducción) han sido realizadas en células sensoriales, como las células pilosas del oído interno. Estas células especializadas han desarrollado, a lo largo de la evolución, estructuras celulares específicas que se encuentran adaptadas en traducir las señales físicas en señales bioquímicas (por ej. abriendo canales iónicos en respuesta a una fuerza aplicada) y han sido excelentes modelos para el estudio de la mecano-transducción. Luego, se descubrió que las señales de mecano-transducción tienen un rol crítico en el mantenimiento de varios tejidos que también se encuentran expuestos a estrés mecánico como el músculo, el hueso, el cartílago y los vasos sanguíneos. Es por ello que las investigaciones en este campo se ampliaron a diversos tipos celulares como miocitos, células endoteliales y células de músculo liso y esquelético. Hoy se sabe que la mecano-transducción se encuentra involucrada en un rango mucho más amplio de funciones celulares que va más allá de aquellas que realizan este grupo de células y tejidos especializados (Jalouk and Lammerding, 2009) y que señales del micro-entorno son esenciales para el desarrollo y el mantenimiento de las funciones tejido específicas en el organismo adulto (Nelson and Bissell, 2006). Un ejemplo interesante es aquel en donde se observó que la diferenciación de las células madres, puede ser conducida hacia destinos específicos según la geometría

y rigidez del sustrato donde estas células crecen y que las interacciones físicas intercelulares como la tensión y la adhesión son tan importantes en el desarrollo embrionario como lo son los gradientes de factores morfogénicos (Wozniak and Chen, 2009).

## **2.1 El estrés mecánico en la fisiología normal y patológica**

Dijimos que el proceso de mecano-transducción cumple un rol fundamental en la regulación de fenómenos fisiológicos en otros tejidos especializados que no se encuentran directamente involucrados con las funciones sensoriales. Por ejemplo, en el tejido óseo, la estimulación mecánica promueve la activación de cascadas de señales y la expresión temprana de genes que regulan el remodelado de la matriz en los osteoclastos y la actividad osteogénica de los osteoblastos (Hughes-Fulford, 2004). En la epidermis, el estrés mecánico induce la proliferación celular, engrosando la piel y produciendo hiperqueratinosis (Reichelt, 2007). El músculo esquelético y el músculo cardíaco responden a un aumento en la carga mecánica y el particular rol que tiene la mecano-transducción en el sistema cardiovascular resulta fascinante (Lammerding et al., 2004).

Actualmente se sabe que la morfología y vascularización cardíaca son influenciadas por el aumento de la presión por sobrecarga hemodinámica y por el estrés de producido por el flujo de líquido (*shear stress*) generado por el flujo sanguíneo. Por ejemplo, durante el embarazo o en el caso de los deportistas, la necesidad de un bombeo sanguíneo más eficiente estimula el crecimiento hipertrófico del músculo cardíaco (hipertrófia fisiológica) (Garcia-Cardena et al., 2001; Gimbrone et al., 2000; Haga et al., 2003; Li et al., 2005b).

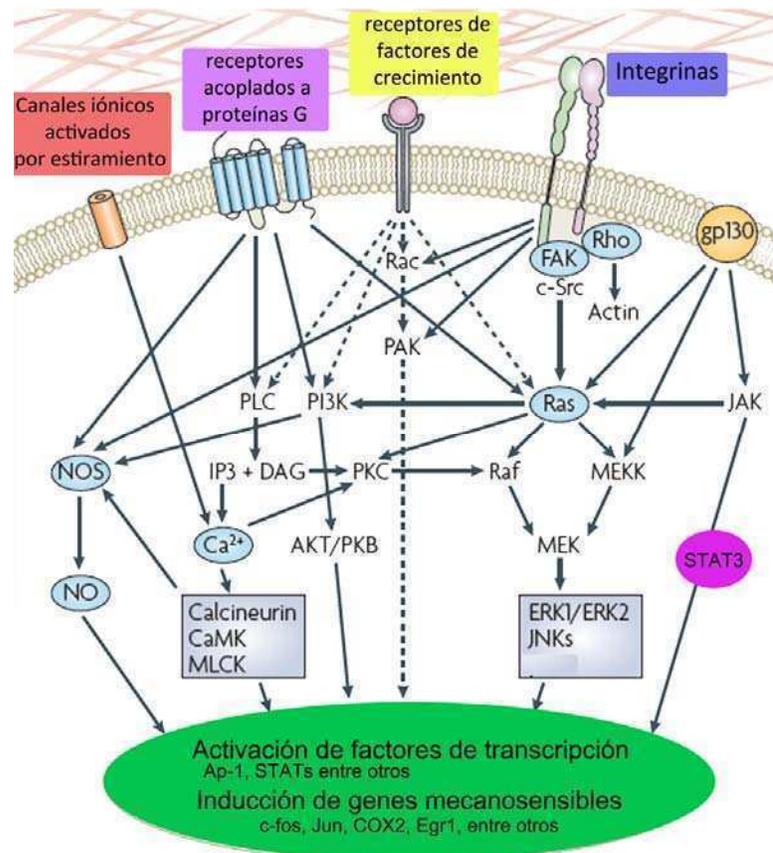
### **2.1.1 El estrés mecánico en el corazón normal y patológico**

La hipertrofia cardíaca es un mecanismo compensatorio que le permite al corazón lidiar con la demanda de bombeo sanguíneo que puede estar determinado tanto por situaciones fisiológicas como el embarazo o patológicas como la hipertensión, el infarto de miocardio o isquemia asociada con una enfermedad arterial coronaria, la insuficiencia valvular o estenosis, una miocarditis debida a algún

agente infeccioso, malformaciones congénitas y enfermedades hereditarias, entre otras. Los factores que disparan la hipertrofia cardíaca se pueden discriminar en dos tipos: mecanismos bio-mecánicos o sensibles al estiramiento y aquellos neuro-hormonales asociados a la liberación de hormonas, citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento. El estrés mecánico producido por la sobrecarga hemodinámica (alta presión sanguínea) es, desde el punto de vista clínico, el estímulo más importante en la inducción de la hipertrofia cardíaca. El aumento del estímulo mecánico induce a corto plazo en los cardiomiocitos una reactivación del "programa de expresión génica fetal", un grupo de genes que normalmente se expresan en el feto y que se encuentran reprimidos en el miocardio adulto. Se produce el aumento de la síntesis de proteínas específicas que le permitirán a los cardiomiocitos, aumentar de tamaño y sobrellevar la demanda metabólica que implica aumentar la eficiencia de contracción, disminuyendo así el estrés mecánico en la pared del músculo cardíaco (Heineke and Molkentin, 2006; Lammerding et al., 2004). Este proceso, sin embargo, produce a largo plazo un remodelado progresivo del miocardio, un aumento la fibrosis, la muerte por apoptosis de los cardiomiocitos y finalmente la falla cardíaca. Así, las células del músculo cardíaco, responden directamente al estiramiento o a la deformación mecánica a través de varias moléculas mecano-sensoras con respuestas transitorias o de largo plazo. Aunque el mecanismo mecano-sensorial específico aún se desconoce, se presume que los mecano-sensores incluyen canales iónicos sensibles al estiramiento, integrinas y proteínas asociadas a integrinas o receptores de membrana (receptores acoplados a proteína G o receptores de tipo I de Angiotensina II que pueden ser activados por estrés aún en ausencia de ligando). Estos mecano-sensores, activan múltiples cascadas de señales, que en general se superponen, entre las que se incluyen las de Ras/Rho y MAPK, activación de fosfolipasa C y señales mediadas por Calcio/Calcineurina así como también a ARNs pequeños (Barry et al., 2008).

Las citoquinas cumplen un rol importante en la inducción de la hipertrofia cardíaca. Las citoquinas hipertróficas más importantes son aquellas que pertenecen a la familia de IL-6 e incluyen a IL-6, el factor inhibitorio de leucemias (LIF) y cardiotrofina-1 (CT-1) que, como se ha mencionado previamente, utilizan a la subunidad receptora común, glicoproteína 130 (gp130) en combinación con receptores ligando específicos y median sus efectos a través de la activación de las vías JAK/STAT, MAPKs y PI(3)K. Estudios realizados en los noventa determinaron

que el estrés mecánico inducido por la sobrecarga hemodinámica inducen la expresión de LIF (Wang et al., 2001) y la activación del factor de transcripción STAT3 (Pan et al., 1999) tanto *in vivo* como *in vitro*. Varios trabajos luego demostraron que el estrés mecánico dispara *in vivo* e *in vitro*, la activación de cascadas de señales que inducen el crecimiento y el remodelado del miocardio. El estiramiento de cardiomiocitos *in vitro* modula a las cascadas de señales de las MAPKs ERK1/2 (Sadoshima and Izumo, 1993) y JNK (Komuro et al., 1996) y la vía de AKT (Kim et al., 2002) entre otras y regula la expresión de genes de respuesta temprana como c-fos, c-myc y c-jun (Barry et al., 2008) (**Figura 7**).



**Figura 7. Señales mecano-transductoras en el corazón.** La sobrecarga mecánica puede ser sensada por estas células a través de diversos grupos de mecano-trasductores anclados a la membrana entre los que se incluyen canales sensibles a estiramiento, receptores acoplados a proteína G, receptores de factores de crecimiento e integrinas. Esta sensibilidad mecánica es convertida en señales bioquímicas disparando la activación secuencial de varias cascadas de señales en el citoplasma. Las cascadas más importantes incluyen a los tres módulos de MPKs, la activación de Ras, la vía JAK/STAT y Rac, la vía del calcio (Ca<sup>2+</sup>) y el óxido nítrico (NO). En estas células la convergencia de estas vías resulta en la activación de factores de transcripción específicos, entre los que se encuentra STAT3, que al translocarse al núcleo regulan la transcripción específica de genes “mecanosensibles” entre los que se incluye c-fos. La suma neta de la reprogramación génica dicta la respuesta funcional del cardiomiocito al estrés mecánico. Adaptado de Jaalouk (Jalalouk, 2009)

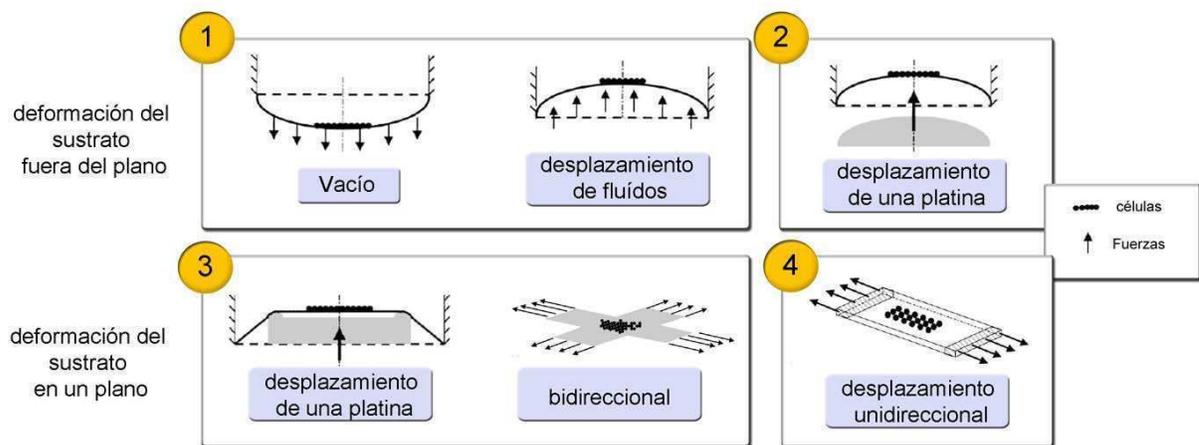
### **2.1.2 El estrés mecánico en otras patologías**

El estrés mecánico ha sido involucrado como disparador de un gran número de patologías. Por ejemplo, el estímulo mecánico promovido por el aumento de la presión intraocular en el ojo es el factor principal que promueve el proceso neurodegenerativo del ganglio de la retina (Resch et al., 2009). En el pulmón, el estrés mecánico causado por un aumento de la presión de aire o líquido (obstrucción, inflamación o edema) o por el aumento de la frecuencia respiratoria (hiperventilación) regula diferencialmente la expresión de genes, altera la expresión de proteínas de la matriz extracelular y dispara la respuesta (Faffe and Zin, 2009; Garcia et al., 2006).

### **2.2 Estrategias experimentales para el estudio del estrés mecánico *in vitro***

En estos últimos 20 años se han desarrollado una gran variedad de técnicas que permiten manipular, *in vitro*, el entorno mecánico de poblaciones celulares enteras o de células y biomoléculas de manera individual. Las diferentes aproximaciones experimentales difieren en varios aspectos importantes: los principios a través de los que operan, la fuerza y la resolución máxima que pueden alcanzar y, por último, la extensión del grado de deformación que pueden producir (acciones locales vs. globales). Aquellas técnicas que permiten manipular grupos de células o monocapas completas en 2 dimensiones, a diferencia de aquellas que trabajan con células o moléculas individuales (aspiración con micropipetas (Hochmuth, 2000), microagujas (Thoumine et al., 1999), microscopía de fuerza atómica (Oberhauser et al., 2002), pinzas magnéticas (Tanase et al., 2007), pueden ser realizadas sin utilizar instrumental muy sofisticado debido a que para deformar células en cantidad se necesitan fuerzas relativamente grandes, en el rango de los Newtons, que se aplican en áreas milimétricas, con resoluciones en el rango de los mN y los mm respectivamente. Estas últimas técnicas tienen la ventaja de ser fácilmente combinables con ensayos bioquímicos que hacen posible analizar cambios a niveles de proteínas y ARNm (Brown, 2000). Según el tipo celular con el que se trabaja, se han adaptado las técnicas que permiten deformar el sustrato sobre el cual las células crecen con el objetivo de simular las condiciones *in vivo*. Se han diseñado dispositivos que permiten aplicar una deformación mecánica estática o

cíclica (Van Vliet et al., 2003), por fuera del plano (**Figura 8, panel 1 y 2**), bidireccional (**Figura 8, panel 3**) o en una sola dirección (uniaxial) (**Figura 8, panel 4**) utilizando diversas estrategias. Por un lado, se encuentran aquellos dispositivos que utiliza presión de vacío o de fluidos para aplicar tensión o compresión de manera estática o cíclica a células creciendo sobre sustratos flexibles (**Figura 8, panel 1**). Estos se han desarrollado en distintos laboratorios y desde 1987 se encuentran disponibles comercialmente a través de la empresa Flexcell International (<http://www.flexcellint.com/>).



**Figura 8. Esquema las modalidades de dispositivos utilizadas para estudiar el efecto del estrés mecánico *in vitro*.** Métodos para alcanzar la distensión por fuera del plano de sustratos circulares por aplicación de vacío (ej. Flexcell®) y por desplazamiento positivo de fluidos (**1**) o desplazamiento de una pieza rígida (**2**). Estrategias para deformar el sustrato en un solo plano que incluyen aplicar tensión radial y circunferencial o tracción bidireccional (**3**) donde ambos sistemas teóricamente ejercen una tensión equibiaxial en la región central del sustrato, o por tracción unidireccional (**4**). En todos los casos se encuentran las versiones en donde la tracción se ejerce de manualmente o motorizada. Adaptado de Brown (Brown, 2000).

### **3. El cáncer de mama**

#### **3.1 Aspectos generales**

Cada año se diagnostican alrededor de 10 millones de casos de tumores malignos en hombres y mujeres en todo el mundo. De los casi 6 millones de tumores malignos que ocurrieron en las mujeres en el año 2007, el cáncer de mama se ubicó en el primer lugar, con 1,3 millones de casos, correspondientes al 27% de los tumores en países desarrollados y al 19% en países en desarrollo (Garcia M, 2007).

Entre el 2002 y el 2007, el incremento del número de casos nuevos de cáncer de mama en los países en desarrollo fue dos veces mayor que el observado en los países desarrollados. En Argentina se encuentran 75 casos cada 100.000 mujeres, una incidencia similar a la que tiene Uruguay y a las observadas en los Estados Unidos de América y Canadá (Lozano-Ascencio et al., 2009). A pesar de que la mortalidad por cáncer de mama en nuestro país ha tendido a disminuir levemente entre 1979 y el 2005, es la primera causa de muerte por cáncer dentro de la población femenina argentina y la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares en la población general (Lozano-Ascencio et al., 2009). Si consideramos a las mujeres entre 35 y 54 años el este tipo de cáncer es la primera causa de muerte de esta población (Matos et al., 1994).

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y actualmente existe suficiente información epidemiológica que sustenta la asociación de varios factores con el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Entre ellos se encuentran los relacionados con la biología reproductiva de la mujer. Así, se considera que incrementa la probabilidad de desarrollar esta enfermedad el no haber tenido hijos antes de los 30 años, la menopausia, la menarca temprana, los tratamientos hormonales (como consumo prolongado de anticonceptivos), las terapias de reemplazo hormonal, estrógenos y progestágenos. Por otro lado, también influyen factores genéticos como los antecedentes familiares, especialmente de madre o hermana y factores ambientales como la exposición a radiaciones y el estilo de vida (obesidad, el consumo de alcohol, el estrés, poca actividad física) (American Cancer Society 2009, [www.cancer.org](http://www.cancer.org))

## 3.2 Biología tumoral

### 3.2.1 Aspectos generales

Una célula atraviesa varios cambios genéticos y epigenéticos en el camino hacia la transformación maligna. Este proceso se encuentra acompañado por una pérdida progresiva de la homeostasis tisular y una alteración en la histo-arquitectura del tejido que culmina en la invasión de las células tumorales al parénquima y la metástasis a órganos distantes. La transformación y la metástasis tumoral son producidas por cambios genéticos intrínsecos de las células tumorales y por una respuesta integral del tejido u órgano a señales externas solubles como los factores de crecimiento, citoquinas y agentes quimio-atractivos. En esta “travesía” hacia la transformación maligna la célula va cambiando de un fenotipo benigno hasta llegar a una entidad invasiva o metastásica con varios pasos intermedios a lo largo del camino (Farber, 1984). El pasaje de un estadio al otro se caracteriza por la amplificación o inactivación de genes específicos, por la expresión de marcadores tumorales y por alteraciones características de la arquitectura tisular y celular (Jackson and Loeb, 1998). Actualmente se sabe que la homeostasis celular y tisular se encuentran reguladas por un proceso dinámico, conocido como mecanoreciprocidad, en el cual las células responden a variaciones en las propiedades mecánicas de la matriz que las rodea ajustando su tensión interna a través de la red de citoesqueleto y a la inversa, cambios en la tensión interna resultan en la alteración de la organización de la matriz extracelular (Ghosh et al., 2007; Paszek and Weaver, 2004; Polte et al., 2004). Las propiedades mecánicas de cada tipo celular se encuentran finamente reguladas por su matriz extracelular y son características para cada tipo celular y tisular. Entonces, cualquier alteración en esta relación puede conducir a un cambio en la forma y comportamiento de la célula. En conjunto, las alteraciones en el micro-entorno celular pueden de manera directa o indirecta cambiar el patrón de expresión génica de una célula, modificando su comportamiento celular (proliferación, migración celular), promoviendo la angiogénesis y modulando al sistema inmune, favoreciendo la progresión tumoral. (Bissell and Radisky, 2001; Nelson and Bissell, 2006; Park et al., 2000).

### 3.2.2 STAT3 en el cáncer

La familia de los STATs, como mencionamos anteriormente, son factores de transcripción conocidos por cumplir el rol de integrar las señales provenientes de receptores de citoquinas y factores de crecimiento necesarios para el crecimiento celular, la supervivencia, la diferenciación y la movilidad (Clevenger, 2004; Yu and Jove, 2004).

En células normales, no transformadas, la fosforilación en tirosina de STAT3 es transitoria mientras que en numerosas líneas celulares tumorales y en un gran número de tumores primarios, los STATs (en particular STAT3) se encuentran fosforilados en tirosina de manera permanente (Bromberg, 2002). STAT3 ha sido encontrado activo con alta frecuencia en tumores humanos entre los que se incluyen los carcinomas de células escamosas de cuello y cabeza, el cáncer de próstata, el cáncer de mama, el mieloma múltiple y varias leucemias (Bowman et al., 2000; Bromberg and Darnell, 2000; Bromberg et al., 1999; Buettner et al., 2002; Catlett-Falcone et al., 1999).

Las primeras evidencias directas que señalaron a STAT3 como un mediador central en la transformación neoplásica, provienen de estudios de sobre-expresión de un mutante constitutivamente activo de este factor de transcripción (STAT3C) el cual indujo la transformación de fibroblastos y les confirió la capacidad de formar tumores en ratones inmunosuprimidos (Bromberg et al., 1999). Varios estudios también indican que la transformación de oncogénica producida por diferentes tipos de virus como *v-abl* (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), *v-src* (gen del virus de sarcoma de Rous) (Bromberg et al., 1998) y *v-Sis*, que actúa como ligando de PDGFR (Garcia et al., 1997), es mediada por la activación STAT3. Por otro lado, el uso de ARN pequeños de interferencia (siARN), construcciones para dominantes negativos de STAT3 y el bloqueo de determinadas tirosina quinasas en células tumorales, se asocian con el arresto del crecimiento y la apoptosis celular (Hutzen et al., 2009; Kotha et al., 2006; Ling and Arlinghaus, 2005; Selander et al., 2004).

El hecho que sólo la activación de STAT3 en células fibroblásticas haya podido provocar la transformación maligna hizo pensar que los genes blanco de este factor de transcripción estarían involucrados en la adquisición de un comportamiento

neoplásico por parte de fibroblastos inmortalizados pero no-tumorigénicos (Alvarez and Frank, 2004). Analizando la expresión de genes por microarreglos de ADN, observaron que la presencia de STAT3C inducía un aumento en la expresión de más de 100 genes con relevancia fisiológica. (Alvarez et al., 2005). A partir de estos datos, tomaron tumores que presentaban altos niveles de activación de STAT3 provenientes de diferentes tejidos e identificaron aquellos genes que se sobre-expresaban tanto en las neoplasias como en las células transformadas por STAT3C. Como resultado de este análisis fueron encontrados 12 genes, denominados “la firma génica de STAT3”, que podrían ser responsables de conferir en conjunto todas las características atribuibles a una célula tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000). Por ejemplo, genes de respuesta inmediata como Egr-1 y JunB, asociados con la entrada al ciclo celular y ciclina D-1, que promueve la progresión del ciclo celular le confiere a la célula independencia de factores de crecimiento (Kijima et al., 2002; Masuda et al., 2002). Además, la supervivencia en condiciones inadecuadas, es otra característica de las células tumorales y Mcl-1, un gen anti-apoptótico, es otro de los genes regulados por STAT3 que cumple un rol clave en la resistencia a la apoptosis en diversos tipos de tumores humanos (Isomoto et al., 2005). Otros de los genes blanco de STAT3 que inhiben la apoptosis son Bcl-2, Bcl-xl y survivina (un miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAPs) (Aoki et al., 2003; Kanda et al., 2004; Kijima et al., 2002; Masuda et al., 2002).

En los últimos años se le ha empezado a dar más importancia al nicho de células madres en el desarrollo del cáncer y al rol crítico que tiene esta población responsable del recambio celular. En este sentido, dentro del grupo que constituye la firma génica de STAT3, se han encontrado genes asociados con la inhibición de la diferenciación como Klf-4 (*kruppel like factor -4*) y Bcl-6. Por otro lado, asociados a la invasión y la dispersión tumoral, encontraron que STAT3 regula la expresión del potente factor pro-angiogénico VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y diferentes metaloproteasas de matriz, (MMP-1 y MMPs-2) claramente involucradas en el proceso de invasión tumoral y metastasis (Itoh et al., 2006; Xie et al., 2004). En conjunto, estos resultados confirman el papel clave que juega STAT3 en el cáncer.

El hecho que no se hayan encontrado mutaciones en el gen que codifica para este factor de transcripción en tumores que surgen de manera espontánea, propone que la sobre-expresión y activación persistente de STAT3 observada en células

cancerosas, se debe a una sobre-expresión o desregulación positiva de la activación de las quinasas en tirosina que fosforilan a STAT3 y/ o a la sobre-expresión de las citoquinas y factores de crecimiento que activan a estas quinasas. Por otro lado, la activación persistente de STAT3 podría deberse también a defectos en los mecanismos de regulación negativa de la activación de este factor que involucren a la familia de supresores de señalización por citoquinas (SOCS), a las proteínas inhibitoras de STAT3 (PIAS) y al mecanismo de degradación por proteasoma dependiente de ubiquitinación (Bromberg, 2002). Al respecto, varias tirosina quinasas y receptores de tirosina quinasas vinculados a la activación de STAT3 como EGF-R, Her-2/Neu, JAK y Src, se encuentran constitutivamente activos en varios tipos de cáncer y los tumores en general sobre-expresan diversas citoquinas y factores de crecimiento capaces de activar esta vía (Garcia et al., 2001; Grant et al., 2002; Gritsko et al., 2006; Sartor et al., 1997; Zhang et al., 2004). Por otro lado, desde el punto de vista de la regulación negativa, es frecuente encontrar una correlación entre la hipermetilación del promotor de SOCS3 y el silenciamiento de este gen en líneas celulares tumorales de pulmonares y mamarias y en tumores de pulmón (He et al., 2003; Weber et al., 2005). También ha sido descrito el silenciamiento por metilación del promotor de SOC-1 en carcinomas hepatocelulares, mielomas múltiples y neoplasias pancreáticas (Chim et al., 2004; Galm et al., 2003; Lee et al., 2006; Tischoff et al., 2007; Yoshikawa et al., 2001).

### **3.2.3 STAT3 en tumores mamarios**

STAT3 se encuentra activo en más del 50% de los tumores primarios de mama, en sus cultivos primarios y en varias líneas celulares derivadas de tumores mamarios como MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MDA-MB-435 (Bromberg, 2002; Cotarla et al., 2004; Dechow et al., 2004; Diaz et al., 2006; Dolled-Filhart et al., 2003; Garcia et al., 1997; Gritsko et al., 2006; Leslie et al., 2006; Lo et al., 2005; Turkson et al., 2004; Vultur et al., 2004; Watson and Miller, 1995).

La evidencia que indica que STAT3 participa de una manera causal en la tumorigénesis mamaria proviene de estudios que utilizaron la estrategia de inhibir o remover a STAT3 en líneas celulares que presentan altos niveles de pSTAT3. En los últimos años se han desarrollado varios compuestos que tienen inhibir la actividad

de este factor de transcripción. Un ejemplo son las moléculas péptido-miméticas del dominio SH2 fosforilado (PY\*LKTK) de STAT3 desarrolladas por el grupo de Jove o el compuesto, S3I-201, descubierto recientemente por Turkson y colaboradores (Siddiquee et al., 2007). Ambos tipos de inhibidores lograron, al impedir la dimerización STAT3, bloquear la unión al ADN e inhibir la expresión de ciclina D1, Bcl-xL, survivina y así bloquear la transformación de células MDA-MB 231.

Por otro lado, la expresión de la forma constitutivamente activa de STAT3 (STAT3C) en células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas y en células MCF-10 produjo su transformación (Dechow et al., 2004). El análisis de la expresión génica en estas células mediante el uso de un micro-arreglo de ADN, mostró que sólo un gen con relevancia tumoral conocida fue regulado por la presencia de STAT3C. Este gen resultó ser el de la metaloproteinasa-9 (MMP-9) y su inducción fue necesaria para el crecimiento independiente de anclaje en estas células.

*In vivo*, al analizar cortes secuenciales por micro-arreglos de tejido se observó una correlación entre la expresión de STAT3 activo y MMP-9, apoyando los resultados previos. Otro trabajo que pone a STAT3 en el centro de la escena fue realizado en células tumorales mamarias 4T1. En estas células, el bloqueo de la expresión de STAT3 por ARNsh suprimió la tumorigenicidad de las mismas y la formación de metástasis e los pulmones de ratones inmunocompetentes, aunque esto no afectó la tasa de proliferación celular (Ling and Arlinghaus, 2005). Además, varios trabajos postulan que la disminución de los niveles de STAT3 activo aumenta la muerte por apoptosis en células en cultivo y disminuye la tumorigénesis, el crecimiento tumoral y la angiogénesis en modelos xenográficos (Alvarez et al., 2005; Diaz et al., 2006; Gritsko et al., 2006; Hutzen et al., 2009; Kotha et al., 2006; Leslie et al., 2006; Ling and Arlinghaus, 2005; Selander et al., 2004)

Finalmente, estudios clínicos demostraron que aquellos pacientes con cáncer de mama en estadio temprano tipo II, que presentaban niveles elevados de pSTAT3, respondían de manera incompleta a la quimioterapia (Diaz et al., 2006).

Como mencionamos previamente, la activación de STAT3 puede darse a través de las acciones autócrino/parácrinas de factores de crecimiento y citoquinas (por ej. IL-6, EGF, PDGF, heregulina, VEGF y HGF) y tirosina quinasas no receptoras como Src. Esto lleva predecir que los altos niveles de activación de

STAT3 encontrados en diferentes tumores podrían estar producidos por la señalización de los múltiples, y en algunos casos redundantes, factores de crecimiento que se encuentran sobre-expresados en estos tumores (Berishaj et al., 2007).

### 3.2.4 LIF en tumores mamarios

La actividad biológica del LIF, como mencionamos previamente se encuentra mediada por su unión a un complejo receptor, formado por su receptor específico (LIFR $\alpha$  o gp190) y una subunidad iniciadora de la cascada de señalización (gp130) común a todos los integrantes de esta familia (Heinrich et al., 1998). Todos los receptores formados por la subunidad gp130, tienen unidos a sus colas citoplasmáticas tirosina quinasas de la familia de las JAKs y la unión del LIF a su receptor, induce la activación de al menos 2 vías conocidas: la vía JAK/STAT y las de Ras/MAPKs. En la glándula mamaria LIF es el principal activador de la señal pro-apoptótica de STAT3 durante la involución mamaria murina (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003).

El potencial rol del LIF en el desarrollo tumoral mamarios se plantea a partir de que diferentes líneas tumorales mamarias expresan altos niveles de LIF (MCF-7, MDA-MB) (Dhingra et al., 1998; Kellokumpu-Lehtinen et al., 1996) y que esta citoquina induce la proliferación de varias líneas celulares de mama estrógeno dependientes (MCF-7 y T47D), estrógeno independientes (SK-BR3 y BT20) y de cultivos primarios de carcinoma mamario (Estrov et al., 1995). Aún así, es poco lo que se conoce acerca del rol de LIF y su relevancia en el desarrollo de tumores mamarios.

Es interesante que más allá de la redundancia funcional que existe entre los integrantes de la familia de IL-6 en varios tejidos, dos trabajos de manera independiente (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003) demostraron que LIF es el principal activador de la señal pro-apoptótica de STAT3 durante la involución mamaria murina.

El potencial rol del LIF en esta patología mamaria se plantea a partir de que diferentes líneas tumorales mamarias expresan altos niveles de LIF (MCF-7, MDA-

MB) (Dhingra et al., 1998; Kellokumpu-Lehtinen et al., 1996) y que esta citoquina induce la proliferación de varias líneas celulares de mama estrógeno dependientes (MCF-7 y T47D), estrógeno independientes (SK-BR3 y BT20) y de cultivos primarios de carcinoma mamario (Estrov et al., 1995). Aún así, es poco lo que se conoce acerca del rol de LIF y su relevancia en el desarrollo de tumores mamarios.

### **3.3 Modelos tumorales utilizados**

#### **3.3.1 El modelo de tumores mamarios inducidos por el virus MMTV**

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es un retrovirus de tipo B descubierto hace más de 50 años como una entidad transmisible principalmente través de la leche y de la línea germinal que induce carcinomas mamarios en su huésped. El tipo celular más permisivo para la replicación del MMTV es el epitelio alveolar de la glándula mamaria y durante la lactancia la expresión de este virus se incrementa marcadamente por influencia de las hormonas esteroides. Los tumores se desarrollan como resultado de la activación de oncogenes celulares a partir de la integración del virus al genoma celular.

Ratones hembras BALB/c infectadas con las 3 variantes del virus MMTV denominadas conjuntamente MMTV(LA) tienen una incidencia de tumores mamarios del 90%. Los mismos presentan, a nivel histológico, una morfología moderadamente diferenciada: a pesar de que poseen regiones sólidas, pobremente diferenciadas presentan también áreas papilares quísticas y células epiteliales redondeadas formando pequeñas estructuras glandulares con actividad secretoria (expresión de  $\beta$ caseína). Otra característica de estos tumores es que no desarrollan metástasis (Gattelli et al., 2004). Inicialmente, aparecen durante la preñez y regresionan luego del parto para reaparecer en el mismo lugar durante las sucesivas preñeces. Los mismos expresan altos niveles de receptores de estrógenos y progesterona (ER+ PR+) y sus trasplantes en animales singeneicos siguen siendo dependientes de preñez. Sin embargo, eventualmente los mismos se independizan del control hormonal, pudiendo crecer en hembras vírgenes y en machos. Al alcanzar el crecimiento autónomo, estos tumores, dejan de expresar receptores para estrógeno y progesterona (ER-/PR-)

### 3.3.2 El modelo de tumores mamarios LM3

La línea celular LM3 fue establecida a partir de pasajes sucesivos *in vitro* de un cultivo primario del adenocarcinoma murino M3 (Urtreger et al., 1997). El adenocarcinoma mamario M3 surgió espontáneamente en un ratón BALB/c endocriado en el bioterio del Instituto de Oncología “Angel H.Roffo” que se mantuvo por pasaje subcutáneo. Los tumores M3 se caracterizan por no presentar invasividad local, y son moderadamente metastásico en pulmón. Las células LM3, a diferencia del tumor parental adquirieron, con los sucesivos pasajes *in vitro*, la capacidad de formar adenocarcinomas pobremente diferenciados y altamente invasivos que conservan la capacidad de metastatizar al pulmón cuando son inoculadas en ratones singeneicos. La línea LM3 en cultivo presenta una morfología epitelial poliédrica (Urtreger et al., 1997) y ha sido utilizada por varios grupos argentinos interesados en estudiar la biología tumoral. En lo que respecta a las vías conocidas que pueden activar STAT3, las células LM3 no expresan receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR), expresan los receptores de tirosina quinasas de tipo I, ErbB-2 y ErbB-3 y ErbB-4, aunque no expresan niveles de detectables de su ligando heregulina (Puricelli et al., 2002). Recientemente, en nuestro laboratorio encontramos que la línea celular LM3 tampoco expresa niveles detectables del LIFR $\alpha$  (Quaglino et al., 2007)

## **Objetivos**

Dado que en la involución post-lactancia y en el desarrollo neoplásico se han encontrado coincidencias en cuanto a los perfiles de expresión de factores paracrinos y la activación de cascadas de señalización específicas, en este trabajo nos propusimos determinar:

- 1) si las cascadas de señalización activas en ambos procesos son inducidas por mecanismos similares.
- 2) la relevancia del estrés mecánico como disparador de estos procesos locales.

## **Objetivos particulares**

- En células tumorales mamarias, determinar el grado de participación del LIF autocrino/paracrino en la activación de STAT3 y evaluar el rol de estos factores en la biología tumoral.
- Diseñar y construir un dispositivo que nos permita evaluar en células mamarias en cultivo el efecto del estrés mecánico sobre los niveles de expresión y activación de factores involucrados en el desarrollo tumoral y la involución mamaria.
- Identificar procesos celulares y genes relevantes en el desarrollo neoplásico y la involución mamaria que puedan ser regulados por estrés mecánico.

## **Materiales y métodos**

### **1. Ensayos en animales**

#### **1.1 Ratones**

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c adultos de 8 a 12 semanas de edad con 20-25 grs de peso criados en el bioterio de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires y todos los estudios fueron conducidos siguiendo las reglas de dicha institución. Se mantuvieron 4 animales por caja en cuartos acondicionados a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  bajo un esquema automático controlado de 12hs luz/ 12hs oscuridad, con comida y agua *ad libitum*.

#### **1.2 Tumores mamarios**

Los tejidos tumorales analizados en esta Tesis corresponden a pasajes de neoplasias surgidas en ratones hembra de la cepa BALB/c infectadas con nuevas cepas del virus del tumor mamario de ratón, denominadas conjuntamente como MMTV(LA), descubiertas y descritas en la Academia Nacional de Medicina (Golovkina et al., 1997) y a implantes de una línea celular proveniente de un tumor espontáneo surgido también en ratones BALB/c del bioterio del Instituto Angel Roffo, denominada LM3 (Urtreger et al., 1997). Nuestro grupo ha reportado que los sucesivos pasajes de los tumores primarios inducidos por el MMTV(LA) podían tener un comportamiento dependiente o independiente de las hormonas de la preñez, principalmente estrógenos y progesterona (Buggiano et al., 2002; Gattelli et al., 2004). En los experimento reportados en esta Tesis se han utilizado únicamente pasajes de tumores mamarios que pueden crecer en ratones hembras sin estímulo hormonal, por lo que los consideramos hormono-independientes. Asimismo, los tumores generados por inoculación de células de la línea LM3 no expresan receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y crecen sin requerimiento de tratamientos hormonales (ver más abajo en Líneas Celulares) (Urtreger et al., 1997). Los trasplantes tumorales se realizaron por trocar en el caso de los inducidos por MMTV y por inoculación subcutánea de células tumorales en el caso de las células LM3. Una vez implantados, el crecimiento de los trasplantes se siguió por palpación (dos veces por semana) y el tamaño tumoral se cuantificó con un calibre Vernier.

### 1.3 Extracción de tejidos mamario normal y tumoral

Luego de sacrificar a las hembras se obtuvo el tejido mamario en todos los casos por remoción del par de mamas N°4 (inguinales). En el caso del tejido tumoral, los tumores fueron removidos del ratón antes de que alcanzaran 1cm<sup>3</sup> de tamaño. Ambos tipos de tejido fueron cortados en fragmentos de no más de 0.5 cm de diámetro y rápidamente fijados en formalina al 10%, tamponada con buffer fosfatos a pH 7.0, para el posterior análisis histológico o congelados rápidamente y guardados en nitrógeno líquido. Para realizar los cultivos primarios a partir de tejido tumoral, una vez que el tumor fue cortado en trozos, éstos se procesaron como se indica más abajo (ver cultivos primarios tumorales en la sección Cultivos celulares).

## 2. Cultivos celulares

### 2.1 Cultivos primarios tumorales

Los cultivos primarios de tumores (CPT) inducidos por MMTV(LA) fueron preparados a partir de pasajes tumorales que no expresaban receptores de estrógeno ni progesterona (ER-PR-). En condiciones de esterilidad, cada tumor fue cortado en pequeños trozos, lavado con medio MEM conteniendo antibiótico-antimicótico, disgregado mecánicamente y filtrado utilizando una malla de acero inoxidable. Este material fue re-suspendido en 20 ml de MEM suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB) y dejado decantar por 20 minutos. La fase líquida de la suspensión fue removida y las células fueron re-suspendidas ahora en MEM conteniendo 1% SFB y 10 ng/ml de Factor de crecimiento epidemial (EGF) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y sembradas en placas de cultivo de 60 mm o placas de 6 pocillos. Previamente las placas fueron tratadas con una solución estéril de 50 µg/ml de colágeno de rata tipo I (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) en 0,02 M de ácido acético durante una hora a temperatura ambiente (18–22°C), la solución remanente de colágeno fue aspirada y las placas lavadas con PBS. Con este procedimiento las placas quedan cubiertas con una película de colágeno que favorece la adherencia celular del cultivo primario. Una vez que el cultivo alcanzó confluencia (3 ó 4 días) se lavó con PBS y se incubó con MEM suplementado con 1% de SFB por 24-36 horas antes de comenzar los tratamientos correspondientes.

## 2.2 Medios condicionados de cultivos primarios tumorales

Para generar los medios condicionados (MCs) de cultivos primarios tumorales se partieron de CPT establecidos. Estos fueron incubados en MEM libre de suero por 15 horas y luego se les agregó MEM suplementado con 1% de SFB por 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo el medio fue colectado, centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C para remover desechos celulares. Luego, el sobrenadante se alicuotó y guardó a -70°C hasta el momento de su uso. Estos medios condicionados se utilizaron mezclados en proporciones de 30%, 50% y 80% con medio fresco.

## 2.3 Líneas celulares

La línea celular HC11, derivada de glándula de mamaria normal de ratón BALB/c (cedida por la Dra. Nancy Hynes, Friedrich Meischer Institute, Basilea, Suiza), fue mantenida en medio de crecimiento RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios, Bs As, Argentina), 5 µg/ml de insulina (Sigma, Saint Louis, MO, USA) y 2 mM de glutamina (SIGMA). La línea celular LM3 establecida a partir de un tumor espontáneo de mama murino en ratón BALB/c (Gattelli et al., 2004) (cedida gentilmente por la Dra. Elisa Bal de Kier Joffe, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) fue mantenida en medio MEM suplementado con 5% de SFB y 2 mM de L-glutamina. Todas las líneas celulares fueron mantenidas con antibióticos y antimicóticos (100 UI/ml de penicilina G sódica, 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin, 250 ng/ml de amfotericina B como fungizona, de Invitrogen) a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en el aire.

## 3. Ensayos de estrés mecánico (*in vitro*)

### 3.1 Dispositivo utilizado

El dispositivo utilizado en esta Tesis fue diseñado y construido enteramente en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA bajo nuestra dirección. Este aparato, que permite aplicar un estímulo de estrés mecánico equibiaxial y controlado a células adheridas a membranas de silicona (ver resultados, Capítulo 2, Figuras 24 y 25 en pág. 81 y 83), consta de 5 piezas (**Figura 9**):

- 1) Cilindro hueco con una rosca externa hecho en Delrin® (pieza #1) que constituye la base del dispositivo y cuya cara interior posee un soporte sobre el cual se apoya la membrana de silicona de 43mm de diámetro. La cara de la membrana con las células adheridas se coloca mirando hacia arriba (**Figura 11, paso 1**).
- 2) Anillo de Delrin® (pieza #2) que encaja en el diámetro interno de la pieza #1 y fija la membrana de silicona en esta posición (**Figura 11, paso 2**).
- 3) Embolo hueco de Teflon® (pieza #3) que se apoya sobre la membrana de silicona y que puede deslizarse verticalmente por dentro del ensamble de las piezas #1 y 2 (**Figura 11, paso 3**).
- 4) Arandela hecha en Delrin® (pieza #4) que se apoya sobre la pieza #3 (**Figura 11, paso 4**).
- 5) Tapa a rosca de Aluminio (pieza #5) que se coloca sobre la pieza #4 (**Figura 11, paso 4**) y que puede enroscarse con la pieza #1. Cuando esto sucede, la pieza #5 empuja hacia abajo la pieza #4, y esta a su vez el embolo hueco (pieza #3) que está en contacto con la membrana de silicona. Cuando el émbolo se desliza verticalmente, empuja la membrana de silicona y la estira (**Figura 11, paso 5**).



**Figura 9. Dispositivo utilizado para estirar células in vitro.** Imagen que muestra al dispositivo armado y a las piezas individuales que lo forman (1-5). La caja de Petri de 60 mm de la fotografía es una referencia de las dimensiones del dispositivo.

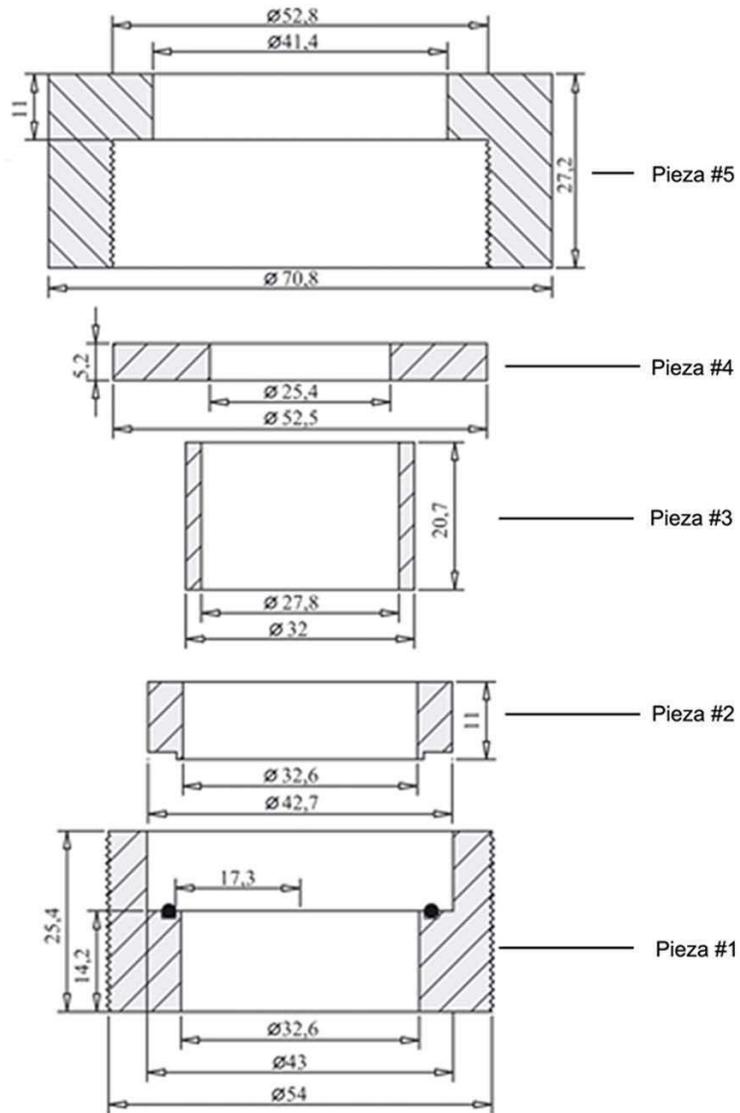
Las características de los materiales que se utilizaron para la construcción del dispositivo hacen que pueda ser completamente esterilizado por autoclavado.

En la Figura 10 se encuentra esquematizado el dispositivo con las especificaciones necesarias para su reproducción. Además, para un dispositivo como el descrito (**Figura 10**), la relación existente entre el número de vueltas de rosca y el desplazamiento del émbolo es de 0,54 mm por vuelta. Este dato fue utilizado para calcular, con el modelo teórico, el estiramiento que se le puede ejercer a la membrana de silicona (ver resultados, Capítulo 2, Figura 24 en pág. 80).

### 3.2 Membranas de siliconas

**Comerciales:** Se utilizaron membranas de silicona comerciales (43mm diámetro y 1mm de espesor) que traen una cubierta de colágeno tipo I (Flexcell International, Hillsborough, NC, USA).

**Preparadas en el laboratorio:** Debido al alto costo que poseen las membranas de silicona comerciales, decidimos prepara membranas de silicona en nuestro laboratorio de manera de reducir el costo de nuestros experimentos. Las membranas fueron preparadas vulcanizando silicona líquida (Rhodorsil RTV-1556, Rhodia, France y utilizando platino como catalizador (importados por Silicon Argentina) en una relación 10:1 masa en masa según las indicaciones del fabricante. Brevemente, la mezcla líquida fue colocada en matrices rectangulares de acrílico y se dejó polimerizar sobre una superficie plana a temperatura ambiente (25°C) entre 5-7 días. El espesor de las membranas delimitado por la matriz fue de 1mm. Luego de finalizada la polimerización, las membranas fueron cortadas en círculos de 43 mm de diámetro y lavadas en una solución 5,7% de KOH en metanol por 5 minutos, de manera de remover el HCl derivado de la polimerización. Posteriormente las membranas fueron lavadas en H<sub>2</sub>O destilada, esterilizadas por autoclavado y secadas antes de ser utilizadas. Con el objetivo de mejorar la eficiencia de pegado de las células epiteliales mamarias (HC11) a estas membranas, las mismas fueron incubadas en condiciones de esterilidad con una solución 50µg/ml de Colágeno Tipo I (SIGMA, USA) en 0,2N de ácido acético durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, esta solución fue removida, las membranas se lavaron con PBS estéril y se procedió al sembrado de las células.



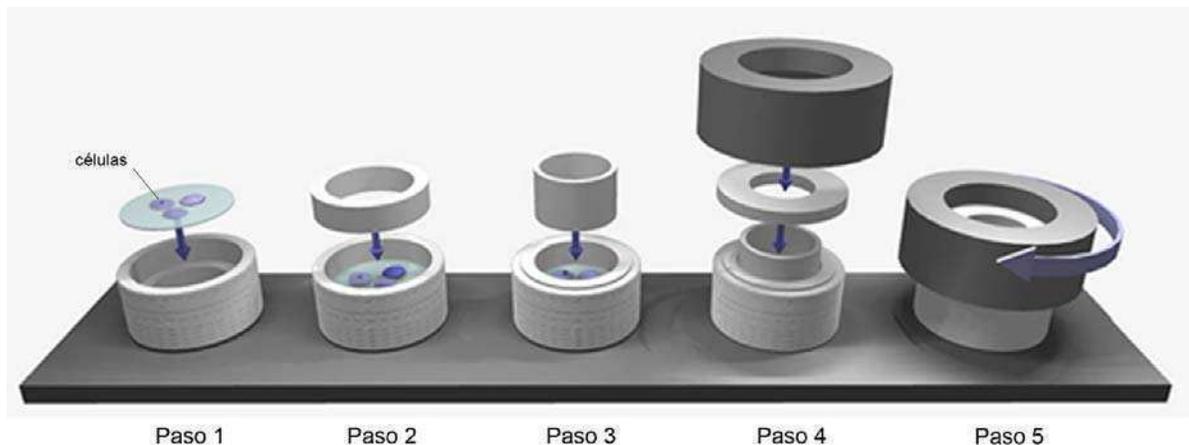
**Figura 10. Diseño del dispositivo utilizado para estirar células *in vitro*.** Esquema de un corte transversal de cada una de las piezas del dispositivo, realizado a escala, con las especificaciones necesarias para su reproducción. Las medidas se encuentran expresadas en milímetros (mm) y  $\text{Ø}$  corresponde a medidas de diámetros.

### 3.3 Protocolo de estimulación mecánica

Las membranas de silicona estériles (comerciales o preparadas en el laboratorio) eran colocadas sobre el fondo de una placa de Petri de 60 milímetros (mm) de diámetro, se sembraban  $7,5 \times 10^5$  células por placa en medio RPMI suplementado con 10% de SFB,  $5 \mu\text{g/ml}$  de insulina,  $10 \text{ng/ml}$  de EGF I y se permitía que alcancen confluencia (48-72 horas). Luego, el medio era removido, se lavaron con PBS estéril y se agregó medio RPMI sin suplementos durante 4 ó 12 horas, según el tipo de análisis a realizar. Posteriormente, se retiraba cuidadosamente la membrana de siliconas con las células adheridas de las placas de Petri y se colocaba en del dispositivo (**Figura 11, paso 1**). Seguidamente, el dispositivo era montado siguiendo los pasos descritos en la Figura 11 (paso 1 al 5) y se agregaba medio RPMI sin suplementos y pre-incubado a  $37^\circ\text{C}$ .

El estímulo se aplicaba como un único paso de estrés mecánico lineal sostenido en un rango de entre 0 a 30% durante 1 hora o un único paso de estiramiento del 20% sostenido que según cada experimento se realizo por durante 15 min, 30min y 1, 3, 6, 8, 15 ó 24 horas. Finalmente, se llevaron a cabo los diferentes protocolos de extracción de ARN, proteína o medios condicionados (MCs).

El modelado en 3D mostrados en la Figura 3 se realizó utilizando el programa Rhinoceros versión 3.0 (McNeel North America, Seattle, USA).



**Figura 11. Ensamble del dispositivo utilizado para estirar células *in vitro*.** Vista esquemática (realizada a escala) del proceso de ensamble del dispositivo para un protocolo de estiramiento.

### **3.4 Análisis por microscopía de las células montadas en el dispositivo**

Las observaciones fueron realizadas utilizando un microscopio invertido (Diavert, Leitz Wetzlar, Germany) equipado con una cámara digital Canon Rebel 350 XT (Canon USA Inc., USA). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J 1.37v (Wayne Rasband, NIH, USA).

### **3.5 Medios condicionados de células expuestas a estrés mecánico**

Para generar los medios condicionados (MCs) de células sometidas a un pulso continuo de estrés mecánico, una vez que las células alcanzaron confluencia, fueron incubadas en medio RPMI libre de suero por 12 horas. Luego de transcurrido este tiempo, las membranas fueron retiradas de las placas, montadas en el dispositivo y con el agregado de 800  $\mu$ l de medio RPMI fresco libre de suero a 37°C y se procedió a aplicar el protocolo de estiramiento antes descrito durante 8, 15 y 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo el medio fue colectado, centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C para remover los desechos celulares, el sobrenadante fue alicuotado y guardado a - 80°C hasta el momento de su uso.

## **4. Preparación del material, Ensayos Bioquímicos y Moleculares**

### **4.1 Preparación de ARN**

Para preparar ARN a partir de tejido mamario normal y tumoral se homogeneizaron los fragmentos congelados con un homogeneizador (Tissue Tearor, modelo 985370). En el caso de las glándulas mamarias normales se realizó en 1 ml de buffer de lisis del kit "SV Total RNA Isolation System" (Promega) y se continuó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. En los casos de la preparación de ARN a partir de tejido tumoral, que no presenta un gran componente graso como la mama normal, o cultivos primarios y líneas celulares, ésta se realizó utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen). En estos casos, se siguió el protocolo indicado por el fabricante que incluye, una extracción con cloroformo y la precipitación del ARN con isopropanol (Merck), el lavado del pellet de ARN con etanol 75% y finalmente su re-suspensión en agua libre de ribonucleasas. En todos los casos las preparaciones de

ARN fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro; GE) a partir de la medición de la absorbancia a 260 nanómetros. En nuestros estudios sólo se utilizaron los ARNs que mostraron una relación 260/280 nm > 1,8. Para comprobar la integridad del ARN se evaluó la presencia de las dos bandas correspondientes al ARN ribosomal por electroforesis en geles de agarosa y luego las preparaciones así obtenidas fueron conservadas a -80°C.

#### 4.2 Retrotranscripción y PCR

Para realizar la transcripción reversa, se utilizaron 2 µg de ARN total, 0,25 µl Oligo-dT (Biodynamics), 1mM de dNTPs (Promega), 20U de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin, Promega), 200U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega) en buffer de transcripción MMLV 1X (Promega) en un volumen final de reacción de 20 µl y a continuación se siguió el protocolo indicado por Promega.

Todas las reacciones de PCR descritas en este trabajo se realizaron en 25 µl de volumen final con 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,25 mM de dNTPs, 1,25 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen), y 0,04 µg/µl de cada oligonucleótido específico para la secuencia a amplificar (**Tabla 1**), en su correspondiente buffer de polimerización 1X (Invitrogen). La amplificación del ARNm de C/ebp-δ se detectó por tinción de geles de agarosa con Bromuro de Etidio (BrEt, Sigma), se utilizaron 2 µl del ADNc como molde y el programa utilizado fue el siguiente: 3 minutos a 96°C, 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 59°C y 1 minuto a 72°C, y una elongación final de 10 minutos a 72°C. El producto se detectó por electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con BrEt, en buffer TAE 1X (40mM Tris, 40mM de ácido acético, 1mM de EDTA) y fue visualizado con luz ultravioleta. En los ensayos de PCR en tiempo real, se utilizaron 0,4 µl de ADNc y las PCRs se llevaron a cabo mediante el agregado de Sybr Green (Roche) 1:30.000 a la mezcla de reacción y utilizando el ciclador “DNA Engine Opticon” (MJ Research). Cada muestra a analizar fue determinada por triplicado. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con el programa Beacon designer 7.21 (Premier Biosoft International) y se describen en la Tabla 1. El programa que se utilizó en todos los casos fue el siguiente: 4 minutos a 94°C, 40 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a la temperatura de hibridación correspondiente (indicada en la Tabla 1) y 40 segundos a 72°C, efectuándose una

lectura de la fluorescencia producida al finalizar cada paso a 72°C. Para cada uno de los genes, se realizaron curvas de temperatura de hibridación y de concentraciones de ión magnesio a fin de seleccionar las condiciones óptimas de reacción. La existencia de un solo producto de amplificación se determinó mediante la observación de la curva de *melting* y corriendo la muestra luego de la amplificación en geles de agarosa teñidos con BrEt. La amplificación producida por cada par de oligonucleótidos debió cumplir el requisito de tener una eficiencia cercana a 2. Para calcular la eficiencia promedio de la reacción y poder estimar la masa de molde inicial relativa en cada muestra se realizó en cada reacción una curva de calibración con diluciones al medio seriadas partiendo de una mezcla de los ADNc en estudio. Una vez calculada la masa inicial relativa en cada réplica, se promediaron las 3 réplicas, y se normalizaron a los valores obtenidos para el gen *actina* o *gapdh*. Finalmente, los valores obtenidos fueron relativizados al tratamiento control.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para realizar las PCR en tiempo real

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos (5'--- 3')	Tamaño (nts)	Tº annealing	[MgCl <sub>2</sub> ]
<i>c-fos</i>	Directo CGCTGGAGGGTCTTTGATGGAAG Inverso CGTGGAAGTGGAACTGGATGATG	203	69 °C	3 mM
<i>lif</i>	Directo CGCTGGAGGGTCTTTGATGGAAG Inverso GTGGAAGTGGAACTGGATGATG	210	62 °C	4 mM
<i>tnf-α</i>	Directo CGCTGGAGGGTCTTTGATGGAAG Inverso CGTGGAAGTGGAACTGGATGATG	245	61 °C	3 mM
<i>c-ebp-δ</i>	Directo CGCTGGAGGGTCTTTGATGGAAG Inverso CGTGGAAGTGGAACTGGATGATG	300	61 °C	3 mM
<i>actina</i>	Directo CGCTGGAGGGTCTTTGATGGAAG Inverso CGTGGAAGTGGAACTGGATGATG	350	62 °C	4 mM
<i>gapdh</i>	Directo AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC Inverso GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG	200	65 °C	3 mM

### 4.3 Análisis de proteínas

#### Preparación de extractos proteicos

Para extraer proteínas tanto de células como de tejido, se utilizó buffer de lisis RIPA (20 mM de Tris HCl pH=7,4, 2 mM de EDTA, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 0,1% de SDS, 0,5% de deoxicolato de sodio y 1% de tritón X100) suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, San Diego, CA, USA) y fosfatasas (1mM de NaF o 40 mM de glicerofosfato de sodio y 1 mM de Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>). Para ambos tipos de muestras, se realizaron ciclos de congelamiento y descongelamiento en hielo, luego de lo cual se mantuvieron los tubos en hielo por al menos 30 minutos. Posteriormente, se los centrifugó a 12.000 rpm durante 25 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos eppendorf y guardados a -80°C para su posterior uso. En el caso de la extracción a partir de tejido, el paso de centrifugación se repitió al menos 2 veces. La concentración de proteínas presente en el sobrenadante se determinó mediante el método Bradford (Bradford, 1976) la curva de calibración se realizó con concentraciones creciente (1-10 µg/µl) de albúmina sérica bovina (BSA).

#### Análisis de Western Blot

20-50 µg de proteínas fueron llevadas a un mismo volumen con H<sub>2</sub>O destilada. Se agregó buffer de siembra (50 mM de Tris-HCl pH 6,8; 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,006% de azul de bromofenol y 2% de β-mercaptoetanol) y se las calentó 8 minutos a 100°C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida/SDS de porcentaje variable (8-12%) según el peso molecular de las proteína a revelar. La composición de los geles concentradores utilizada fue: Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 0,125 M de Tris-HCl pH=6,8, 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amonio, 0,1% de TEMED. La composición de los geles separadores utilizada fue: Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) entre 8 y 12%, 0,375 M Tris-HCl pH=8,8, 0,1% de SDS, 0,03% de persulfato de amonio 0,03%, 0,07% de TEMED. Las muestras se corrieron a voltaje constante (30 minutos a 80 V y 4 horas a 100 V) en el buffer correspondiente (25 mM de Tris-HCl pH= 8,8, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS) y luego se electro-transferieron en frío a una membrana de PVDF (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA) a 300 mA durante 1,5 horas en buffer de transferencia (25 mM de Tris-HCl pH=8.8, 192 mM de glicina, 20% de metanol). Finalizada la electrotransferencia se realizó una tinción de las proteínas en la membrana durante 5 minutos con una solución de rojo Ponceau-S al 0,1% en ácido acético 5% para verificar la eficiencia de la transferencia. Luego se lavó y se bloqueó la membrana a temperatura ambiente durante 30 minutos con una solución al 5% de leche descremada (Molico) en PBS-T (PBS: 4g de NaCl, 0.1g de KCl, 1.42g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.12g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, llevado a 1 litro con H<sub>2</sub>O y a pH=7,4+ 0.1% de Tween 20) en agitación constante. Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos correspondiente para cada caso (**Tabla 2**) en PBS-T conteniendo 2% de leche descremada. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS-T y luego se incubó la membrana durante 1,5 horas a temperatura ambiente los respectivos anticuerpos secundarios (**Tabla 3**) preparados en 2% leche en PBS-T. A continuación, se repitió el protocolo de lavado y finalmente el western blot fue revelado por quimioluminiscencia utilizando el reactivo “ECL+Plus System” (GE Health Care, UK) según indicaciones del fabricante. La señal de quimioluminiscencia fue capturada utilizando el analizador de imágenes FUJIFILM LAS-1000. El peso molecular de las bandas detectadas se comparó con un marcador de peso molecular (Rainbow Marker, GE Health Care, UK) sembrado en el mismo gel. La intensidad de las bandas presentes en las imágenes fueron cuantificadas por densitometría utilizando el programa ImageJ 1.34s software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A los valores de intensidad obtenidos para cada banda se les restó el valor correspondiente al ruido de fondo de una misma área y fueron normalizados con respecto a la cuantificación de las señales de  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, según corresponda y referidos al tratamiento control correspondiente. Para los casos en donde se analizaron los niveles de fosforilación de proteínas, la cuantificación obtenida para los niveles de la proteína fosforilada fueron normalizados contra los valores obtenidos para la proteína total y nuevamente fue referido al tratamiento control respectivo.

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados para los ensayos de Western Blot y las Inmunohistoquímicas.

\*Anticuerpos utilizados para Inmunohistoquímicas

Anticuerpo 1º	Especie	Empresa	Nº de Catálogo	Dilución
Anti p(Tyr)STAT3	Ratón	Santa Cruz Biotechnologies	sc-8059	1:800
Anti STAT3	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-482	1:800 ó 1:150*
Anti p(Tyr)ERK1/2	Ratón	Santa Cruz Biotechnologies	sc-7383	1:800
Anti ERK1/2	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-154	1:1000
Anti p(Thr y Tyr)JNK1,2,3	Ratón	Santa Cruz Biotechnologies	sc-6254	1:500
Anti JNK1/3	Cabra	Santa Cruz Biotechnologies	sc-474-G	1:1000
Anti c-Fos	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-7202	1:1000
Anti p(Thr)AKT	Conejo	Cell Signaling Technology	9275	1:800
Anti AKT 1	Cabra	Santa Cruz Biotechnologies	sc-1618	1:1000
Anti p(Tyr)STAT5a	Conejo	Abcam	30648-100	1:500
Anti STAT5a	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-1081	1:1000
Anti Actina	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-1616-R	1:3000
Anti $\beta$ -tubulina	Conejo	Santa Cruz Biotechnologies	sc-9104	1:3000
Anti LIF	Cabra	Santa Cruz Biotechnologies	sc-1336	1:100*

**Tabla 3.** Anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa utilizados para los ensayos de Western Blot.

Anticuerpo 1º	Especie	Empresa	Nº de Catálogo	Dilución
Anti Ratón	Cabra	Santa Cruz Biotechnologies	sc-2005	1:3000
Anti Conejo	Cabra	Santa Cruz Biotechnologies	sc-2004	1:5000
Anti Cabra	Mono	Santa Cruz Biotechnologies	sc-2020	1:5000

#### 4.4 Análisis histológico: Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos

Los fragmentos de glándulas mamarias y tumores fijados en 10% de formalina neutra fueron embebidos en parafina. El taco de parafina fue posteriormente seccionado, en láminas de aproximadamente 4 micrones de espesor, utilizando un micrótopo, y fijados a un porta-objetos utilizando procedimientos estándar. Los estudios morfológicos se realizaron por microscopía óptica sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina (H&E).

#### Inmunohistoquímica

Los cortes de tejido fueron desparafinados en xileno durante 2 horas y luego incubados con etanol 100% durante 10 minutos. La peroxidasa endógena se inhibió mediante un tratamiento con una dilución 30 volúmenes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Parafarm, Argentina) en metanol 1:12,5 por 30 minutos. A continuación se realizaron incubaciones sucesivas de 5 minutos cada una en un gradiente decreciente de concentraciones de etanol en agua destilada (96%, 70%, 50%, 30% y H<sub>2</sub>O destilada) con el objetivo de re-hidratar las muestras. Posteriormente, se incubaron los cortes en PBS durante 10 minutos seguido de un bloqueo con suero normal de caballo al 5% en PBS durante 30 minutos. Finalmente, los cortes fueron incubados en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-STAT3 en una dilución 1:150 en PBS, o bien un anticuerpo anti-LIF 1:100 en PBS (**Tabla 2**). Para la amplificación y detección de la señal se utilizó el kit Elite ABC (Vector Laboratories Inc., Burlington, CA, USA) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Brevemente, luego de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron lavados

en PBS (4g de NaCl, 0.1g de KCl, 1.42g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.12g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, llevado a 1 litro con H<sub>2</sub>O y a pH=7,4) y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a biotina en una dilución 1:200 en PBS en cámara húmeda durante 30 minutos. Luego se lavaron los cortes con PBS y se los incubó durante 30 minutos en cámara húmeda con el sistema amplificador avidina-biotina acoplado a peroxidasa. Posteriormente, se realizaron lavados en PBS durante 5 min y se reveló el complejo antígeno-anticuerpo usando como cromógeno a la diaminobencidina (DAB; Dako, Carpintería, CA, USA) previamente activada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con un tiempo de incubación entre 2 y 5 min hasta observar que el tejido adquiriría un tono amarronado brillante. Como control de especificidad de la señal obtenida se omitió el uso de anticuerpo primario en uno de los cortes de cada preparado, reemplazándolo por PBS. Para contrastar la marca positiva se realizó una tinción con hematoxilina (Biopur SRL) al 10% en agua. Finalmente, se deshidrataron los cortes por sucesivos pasajes por alcoholes de graduación creciente y luego en xileno para montarlo posteriormente utilizando Bálsamo de Canadá. Los cortes fueron observados en un microscopio óptico Olympus cx31 y las imágenes fueron captadas utilizando una cámara digital Olympus SP350 acoplada al mismo.

Tanto el análisis morfológico como inmunohistoquímico fue realizado con la ayuda y supervisión del Dr. Roberto Meiss, médico patólogo de la sección IIHEMA-IEO de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina).

#### **4.5 Inmunofluorescencia indirecta**

Se cultivaron células HC11 en porta-objetos con cámaras de incubación Lab-tek (NUNC, Rochester, NY, USA) por 48 horas, luego fueron pre-incubadas por 1 hora con 30 $\mu$ M del péptido inhibidor específico de STAT3 y luego fueron tratadas con LIF (50 ng/ml) por 30 minutos. Las células fueron fijadas en para-formaldehído al 4% por 25 minutos a temperatura ambiente, lavadas con PBS y pre-incubadas por 5 minutos en buffer de bloqueo conteniendo 0.1% de SDS y 3% de albumina sérica bovina en PBS. Luego de lavar con PBS las células fueron incubadas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-STAT3 (ver Tabla 2) diluido 1:100 en la misma solución de bloqueo. Luego de lavar con PBS, las células fueron incubadas durante 1 hora en presencia de un anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en burro conjugado a

Cy3 (dilución 1:500) (1.5 mg/ml; Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, USA), cedido gentilmente por Dra. Guberman (Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA).

Las células fueron montadas y observadas bajo un microscopio confocal Olympus Fluoview FV300. Las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., New York, NY, USA).

#### **4.6 Ensayo de inmuno-adsorción ligado (ELISA)**

Siguiendo el protocolo experimental descrito anteriormente, al cabo de un pulso sostenido de estrés mecánico de duración variable (8, 15, 24 y 48 horas), se colectaron los medios condicionados generados por células expuestas al estímulo mecánico *in vitro*. Los niveles de la citoquina LIF presente en estos medios fueron cuantificados utilizando el kit de ELISA de captura específico MLF00 (R&D, USA) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

#### **4.7 Ensayos de viabilidad celular - Tinción por cristal violeta**

El número de células aún adheridas a la placa de cultivo al final de cada experimento fue evaluado por tinción con el colorante cristal violeta (Lopez-Marure et al., 2002). Brevemente, células en cultivo fueron crecidas en placas de 96 pocillos y sometidas a diferentes tratamientos. Luego, éstas fueron fijadas con 100  $\mu$ l de glutaraldehído al 1,1% en PBS frío durante 15 minutos a 4°C, posteriormente lavadas con agua destilada, secadas al aire y teñidas durante 20 minutos mediante el agregado de 100  $\mu$ l de una solución del colorante cristal violeta al 0,1% en 200 mM de ácido fosfórico pH=6. Después de descartar cuidadosamente el colorante, las células teñidas se lavaron reiteradamente para eliminar el exceso del mismo. Luego, se dejó luego secar y se agregaron 100  $\mu$ l de ácido acético al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la densidad óptica a 590 nm con un espectrofotómetro de placa (Benchmark, Bio-Rad, USA).

#### 4.8 Análisis de Apoptosis – Actividad de simil-caspasa 3

Los niveles de actividad de caspasas efectoras se determinaron mediante un test colorimétrico utilizando el sustrato específico acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7- amino-4 p-nitroanilida (Ac-DEVDpNA) capaz de ser clivado por estas caspasas. Brevemente, las células en cultivo luego de ser lavadas con PBS se trataron con una solución de lisis (50 mM de Tris-HCl pH=7.4, 1 mM de EDTA, 10 mM de EGTA, 10  $\mu$ M de digitonina, 0,5 mM de PMSF, 1,5  $\mu$ M de aprotinina, 14,6  $\mu$ M de pepstatina y 63,86  $\mu$ M de benzamidina) por 30 minutos a 37°C. Luego, se continuó la incubación en hielo durante 1 h, se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C, se colectó el sobrenadante y la concentración de proteínas presente fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford, 1976). A continuación, se llevó a cabo la reacción enzimática de la siguiente manera: 150  $\mu$ l del sobrenadante (50  $\mu$ g de proteína) fueron incubados durante 3-12 horas a 37°C con 146  $\mu$ l de solución de incubación (100 mM de HEPES pH=7.5, 20% de glicerol, 0,5 mM de EDTA y 5 mM de dithiothreitol) y 4  $\mu$ l del sustrato de caspasas acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4 p-nitroanilida 100  $\mu$ M (Ac-DEVDpNA, Calbiochem, USA). La liberación del cromóforo pNA catalizada por la acción de la Caspasa fue determinada mediante la medición de la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro de placa (Benchmark, Bio-Rad, USA). A los valores obtenidos para las muestras, se le restó el valor correspondiente a la reacción en la cual se había omitido el agregado de sustrato. La actividad específica (AE) de caspasa fue expresada como unidades de absorbancia de pNA por miligramo de proteína. Los valores obtenidos para las muestras pertenecientes a cada grupo experimental se promediaron, se calculó la desviación estándar y se realizó un análisis estadístico para determinar la existencia de diferencias significativas.

#### 4.9 Análisis estadístico

En todos los casos el análisis estadístico se realizó utilizando el software STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc.) y consistieron en estudios de ANOVA de un factor seguidos de pruebas post hoc de Tukey-Kramer para diseños balanceados. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si se cumplía que  $p < 0,05$ . Antes de realizar el análisis estadístico se corroboró que los datos cumplieran con los

supuestos de normalidad y homocedacia usando las pruebas de Lilliefors y Bartlett respectivamente. En algunos casos se utilizaron los datos transformados con la función logaritmo o raíz cuadrada de manera que los supuestos se cumplan. En todos los casos, los tratamientos con letras distintas (a, b, c, d y e) son significativamente distintos entre sí. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos.

## Capítulo 1

### 1.1 Expresión de LIF y activación de STAT3 en tumores mamarios murinos

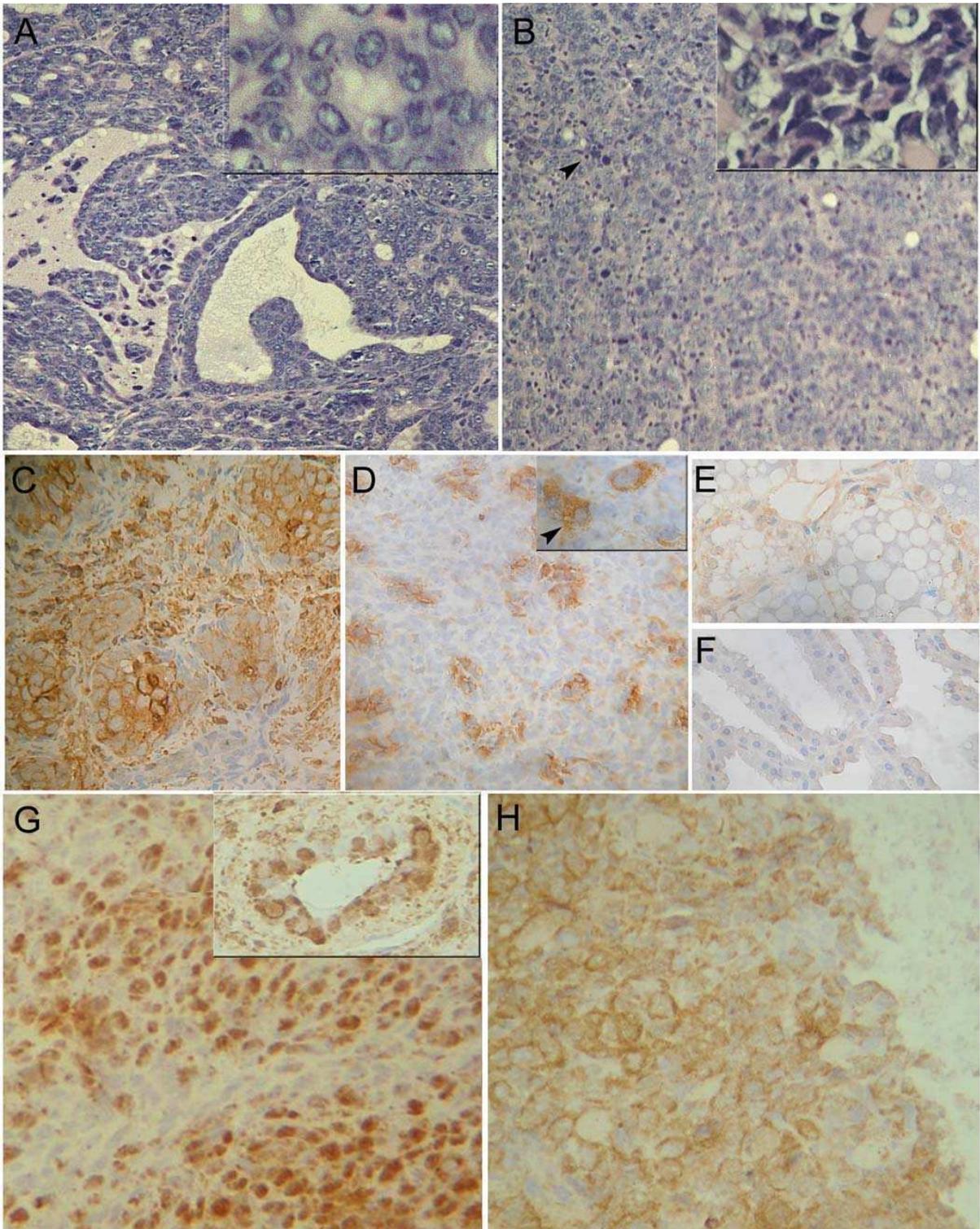
Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que los tumores mamarios murinos inducidos por el virus MMTV expresan altos niveles de ARNm de LIF y de su receptor (R-LIF), mientras que las líneas celulares LM3 y LMM3 (derivadas de un adenocarcinoma mamario murino espontáneo) expresan LIF pero no la subunidad gp190 de su receptor. Por otro lado, el análisis de los niveles de fosforilación de STAT3 por western blot en estos modelos, reveló que mientras los tumores inducidos por MMTV presentan altos niveles del factor de transcripción STAT3 fosforilado en la tirosina 705 (pSTAT3) en las células LM3 y LMM3 los mismos son indetectables. Estos resultados, nos llevaron a pensar que el LIF, a través de la activación de su receptor podría tener un importante en la activación de la vía JAK/STAT3 en tumores mamarios.

En primer lugar, nos preguntamos si lo observado previamente en las células LM3 y LMM3 podría deberse a las condiciones de cultivo por lo cual decidimos analizar estos parámetros *in vivo* en tumores mamarios surgidos por la inoculación de células LM3 (LM3-t) (Urtreger et al., 1997). Como control se utilizaron pasajes singénicos de tumores inducidos por MMTV, los cuales son adenocarcinomas mamarios que pueden presentar distintos grados de diferenciación (Buggiano et al., 1999).

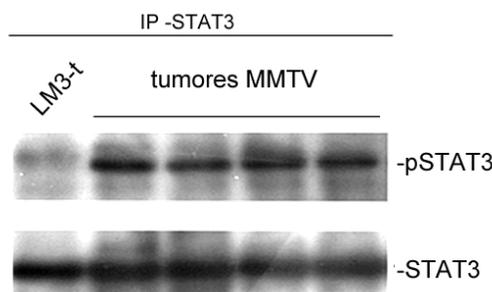
En primer lugar, realizamos un análisis morfológico, en cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de ambos tipos de tumores. En la Figura 12A, se muestra la imagen de uno de estos pasajes de tumores MMTV que presenta una morfología moderadamente diferenciada con áreas papilares quísticas. A pesar de que estos tumores también poseen regiones sólidas pobremente diferenciadas, se pueden observar en ellas células epiteliales redondeadas formando pequeñas estructuras glandulares (**Figura 12A H&E, detalle**). Por el contrario, observamos que los tumores LM3-t son adenocarcinomas pobremente diferenciados, cuyo parénquima presenta células tumorales grandes y núcleos hipercromáticos. En estos tumores, se observa un estroma vascular abundante conteniendo fibroblastos, neutrófilos, linfocitos, células plamáticas y ocasionalmente mastocitos (**Figura 12B, H&E**) e imágenes características células apoptóticas, extensas áreas de necrosis

hemorrágicas (**Figura 12B, H&E**) y áreas con apariencia sarcomatosa (**Figura 12B, H&E, detalle**).

Una vez caracterizados los tumores, analizamos los niveles de expresión de LIF, en cortes provenientes de tumores MMTV-t y LM3-t por inmunohistoquímica. En ambos casos, la marcación de LIF fue predominantemente epitelial aunque se pudieron observar células estromales con marcación positiva (**Figura 12C y D**). La expresión de LIF en glándulas mamarias en estadio de involución y lactancia fue utilizada como control positivo y negativo, respectivamente (**Figura 12E y F**). Posteriormente, analizamos los niveles de activación de STAT3 por inmunoprecipitación de STAT3 total y western blot contra su forma fosforilada en muestras provenientes de ambos tipos de tumores. Observamos que los tumores MMTV-t presentan niveles de pSTAT3 mucho mayores que los tumores LM3-t (**Figura 13**). Confirmamos estas observaciones mediante el estudio de su localización sub-celular utilizando un anticuerpo específico que reconoce al STAT3 total. Observamos que mientras los tumores MMTV-t poseen marcación nuclear positiva tanto en células epiteliales como estromales (**Figura 12G**); la marcación para STAT3 en tumores LM3-t fue detectada predominantemente en el citoplasma de células epiteliales (**Figura 12F**) sugiriendo que STAT3 se encuentra inactivo en estos tumores.



**Figura 12. Análisis morfológico e inmunohistoquímico de pasajes de tumores inducidos por MMTV (MMTV-t) y tumores generados por inoculación de células LM3 (LM3t) creciendo *in vivo*.** (A, B) Cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina, (A) MMTV-t moderadamente diferenciados. Se observan formaciones papilares hacia el lumen de conductos quísticos y áreas menos diferenciadas con pequeñas estructuras glandulares. Aumento X100; detalle X400. (B) Adenocarcinoma LM3-t pobremente diferenciado con estroma que presenta abundante infiltrado vascular. Áreas de apariencia sarcomatosa e imágenes apoptóticas (punta de flecha). En (A, B) aumento X100; detalle X400. (C-F) Inmunohistoquímica de LIF (C) MMTV-t: Distribución regular heterogénea principalmente en áreas pobremente diferenciadas con marcación positiva nuclear y citoplasmática; intensa tinción positiva aumentando hacia la periferia lo que indica un patrón secretorio (punta de flecha). (D) LM3-t: Marcación positiva en parches. El detalle muestra la marcación positiva citoplasmática. El patrón de marcación de membrana pobremente definido y la tinción citoplasmática granular indican que LIF está siendo secretado por estas células (punta de flecha). (E) Glándulas mamarias en involución (48 hs) y (F) lactando se usaron como controles de marcación de LIF positiva y negativa respectivamente. Aumento en (C-F) X250; detalle: X400 (G, H). Inmunohistoquímica de STAT3 (G) MMTV-t: tenue marcación positiva nuclear en el estroma e importante marcación nuclear positiva en el parénquima tumoral, que se vuelve más intensa en áreas sólidas. Detalle: marcación positiva nuclear en regiones glandulares del tumor. (H) Tumor LM3-t con marcación positiva citoplasmática intensa en células estromales y epiteliales. Aumento en (G, H) X250; detalle X400.

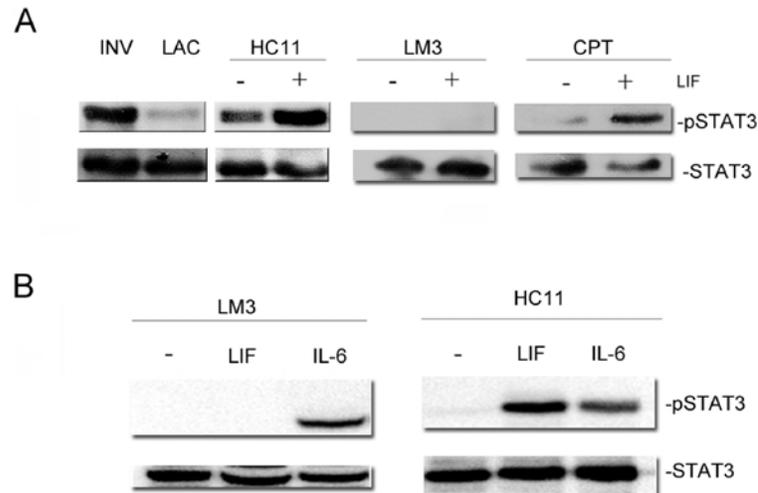


**Figura 13. Análisis de los niveles de fosforilación en tirosina de STAT3 en MMTV-t y LM3-t.** Se analizaron por western blot los niveles de pSTAT3 y STAT3 en tumores creciendo *in vivo*: LM3t (calle 1) y diferentes líneas de MMTV (calle 2 a 5). La fotografía, corresponde a un western blot representativo.

Estos resultados indican que la ausencia de activación de STAT3 observada en las células LM3 *in vitro* no se debe a las condiciones de cultivo ya que en los tumores LM3-t los niveles de activación de este factor de transcripción también son indetectables a pesar presentar marcación positiva para LIF.

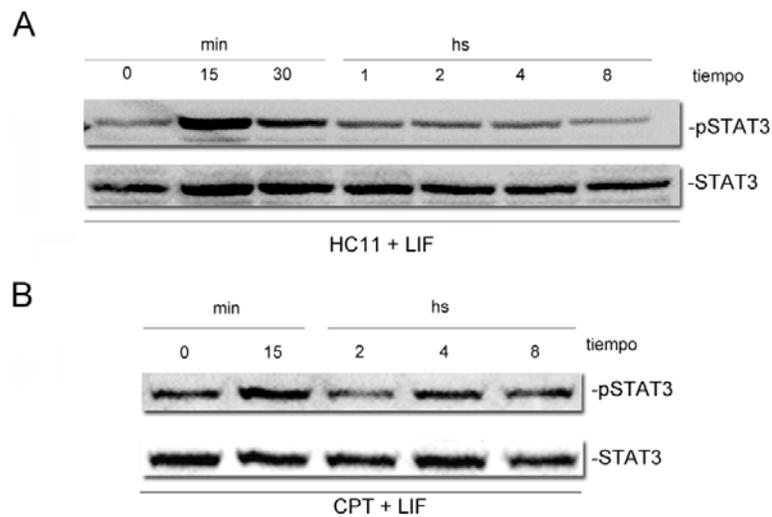
Con el objetivo de analizar si la señal mediada por LIF es determinante para la activación de STAT3 en tumores mamarios murinos, evaluamos la capacidad de LIF de inducir la fosforilación en tirosina de STAT3 en células en cultivo. Para esto, incubamos células epiteliales mamarias normales (HC11), cultivos primarios tumorales provenientes de MMTV-t (CPT) y la línea tumoral LM3 con 80ng/ml de LIF recombinante durante 15 minutos y luego analizamos los niveles de fosforilación de STAT3 por western blot. Los resultados muestran que en las células normales como en los CPTs el tratamiento con LIF induce la fosforilación de STAT3, lo cual no se observa en las células LM3 (**Figura 14A**).

La IL-6 es una citoquina de la familia de LIF que utiliza una subunidad receptora diferente de gp190 pero la misma vía de señalización. Por lo tanto, con el objetivo de determinar si la falta de activación de STAT3 en células LM3 se debe sólo a la falta o muy baja expresión de la subunidad del receptor de LIF (gp190) y no a un problema en la integridad de la vía de señalización gp130/JAK/STAT3; evaluamos el efecto de la IL-6 sobre los niveles de fosforilación de STAT3 en estas células. Para esto, se analizaron los niveles de fosforilación de STAT3 en células LM3 tratadas con 80ng/ml de IL-6 durante 15 minutos. Los resultados nos muestran una marcada inducción de la fosforilación de STAT3 (**Figura 14B**) causada por el tratamiento con la IL-6, indicando la integridad de la vía gp130/JAK/STAT3 en estas células.



**Figura 14. Inducción de la fosforilación de STAT3 en células mamarias en cultivo. (A)** Western blot de pSTAT3 y STAT3 en células HC11, LM3 y CPT tratadas con 80ng/ml de LIF durante 15 minutos. Se utilizaron glándulas mamarias de 5 días de lactancia (LAC) o involucionadas por 48 horas (INV) como controles negativo y positivo respectivamente. **(B)** Niveles de fosforilación de STAT3 en células LM3 y HC11 sin tratar o tratadas con IL-6 o LIF (80ng/ml) durante 15 minutos.

Los antecedentes indican que las células tumorales presentan niveles de pSTAT3 elevados y persistentes en comparación con las células normales y se propone que esta diferencia podría atribuirse en parte a una pérdida de los mecanismos involucrados en la regulación negativa de la fosforilación de este factor de transcripción. En base a esto, decidimos analizar y comparar el curso temporal de los niveles de fosforilación de STAT3 en células mamarias no tumorales (HC11) y tumorales (CPT) incubadas con LIF (80ng/ml) durante los tiempos indicados (0-8 horas) **(Figura 15)**. Los resultados muestran que el tratamiento con LIF produce una fosforilación transitoria de STAT3 que alcanza un máximo a los 15 minutos, luego estos niveles disminuyen manteniéndose bajos durante las siguientes 8 horas **(Figura 15)**. Estos resultados indican que STAT3 posee una cinética de activación inducida por LIF muy similar en ambos tipos de cultivo y sugiere que al menos los mecanismos de regulación negativa de la activación de la vía LIF/JAK/STAT3 son similares en los dos tipos celulares.

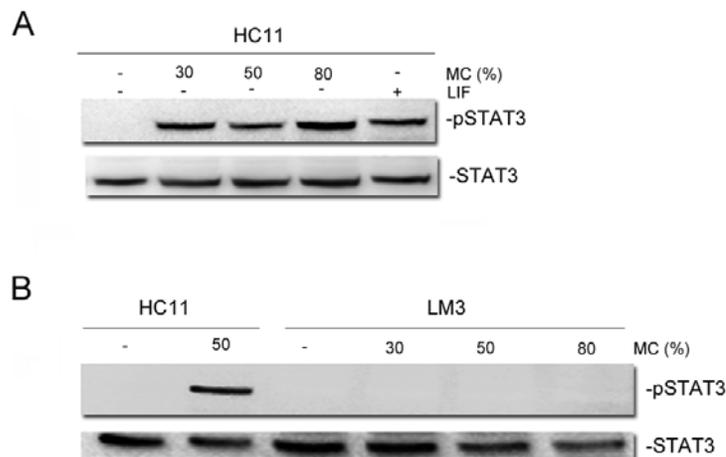


**Figura 15. Cinética de fosforilación de STAT3 en células mamarias no tumorales y tumorales.** Se analizó por western blot el efecto de LIF (80ng/ml) sobre los niveles de pSTAT3 y STAT3 en células HC11 (**A**) y CPT (**B**) durante los tiempos indicados (0-8 horas). La fotografía, corresponde a un western blot representativo.

**Sección 1.1.** Los resultados obtenidos en esta sección indican que *in vivo* la falta de expresión del receptor de LIF se correlaciona con la falta de activación del factor STAT3 y se debe, en el caso de tumores LM3, a una deficiencia en la expresión de la subunidad gp190 y no a un problema en la vía de señalización gp130/JAK/STAT3. Esto sugiere que la sobre-expresión de LIF por células tumorales mamarias es responsable de la activación de STAT3 observada en tumores mamarios murinos creciendo *in vivo*.

## 1.2 El LIF secretado por células mamarias tumorales es el principal responsable de inducir la activación de STAT3 en células mamarias.

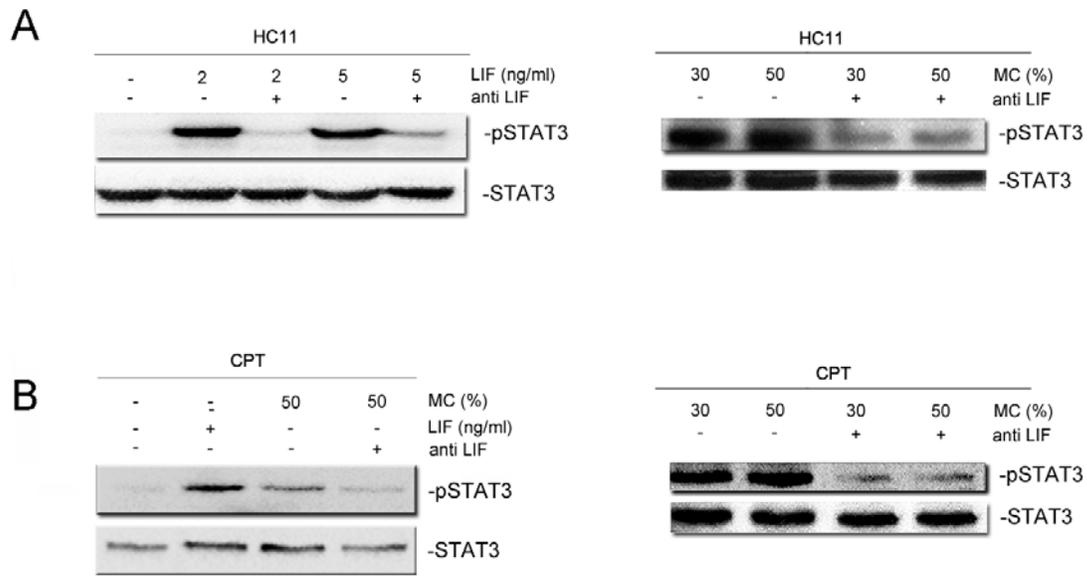
Dado que LIF recombinante es capaz de inducir la activación de STAT3 en células epiteliales mamarias y que los MMTV-t expresan altos niveles de LIF, nos preguntamos si el LIF secretado por las propias células tumorales podría estar actuando de manera autócrina y/o parácrina siendo el responsable de la activación de STAT3. Para ello, en primer lugar, evaluamos el efecto que tiene el medio condicionado (MC) por los cultivos primarios de tumores inducidos por MMTV (CPT) sobre los niveles de pSTAT3 en la línea epitelial mamaria HC11. Al tratar células HC11 durante 15 minutos con concentraciones crecientes (30%, 50%, 80%) de MC observamos un marcado aumento de los niveles de fosforilación de STAT3 (**Figura 16A**). Sin embargo, el mismo tratamiento no indujo la fosforilación de STAT3 en células LM3 (**Figura 16B**).



**Figura 16. Efecto del medio condicionado (MC) sobre los niveles de fosforilación de STAT3 en células en cultivo.** Se analizaron por western blot los niveles de pSTAT3 y STAT3 en células **(A)** HC11 y **(B)** LM3 tratadas con concentraciones crecientes de MC (30/ , 50/ y 80/ ) durante 15 minutos. En **(A)** se utilizó LIF (5ng/ml) como control positivo y en **(B)** el efecto del mismo MC sobre los niveles de pSTAT3 en HC11. La fotografía, corresponde a un western blot representativo.

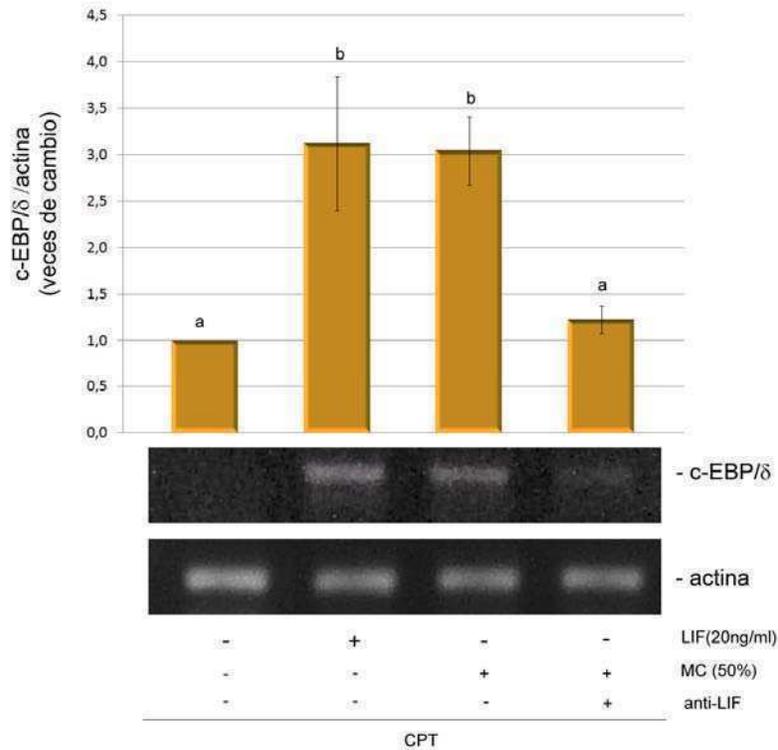
Con el fin de identificar si es el LIF presente en los MC el responsable de inducir los niveles de pSTAT3 observados, evaluamos el efecto de un anticuerpo bloqueante de LIF sobre los niveles de fosforilación de STAT3 inducidos por los MCs en células mamarias tumorales y no tumorales. Decidimos utilizar el anticuerpo bloqueante anti-LIF producido por la empresa R&D ya que se demostró que el mismo no tiene reacción cruzada con otras 60 citoquinas recombinantes de ratón (entre ellas rmlL-1 $\alpha$ ,  $\beta$ , rmGM-CSF, rTNF $\alpha$ ,) (R&D Systems, comunicación personal y (Park et al., 2003). En primer lugar determinamos la actividad bloqueante del anticuerpo y para ello, tratamos células HC11 durante 15 minutos con medios frescos conteniendo 2 y 5 ng/ml de LIF recombinante que fueron pre-incubados con o sin anticuerpo bloqueante (0,8 $\mu$ g/ml), luego se analizaron por western blot los niveles de pSTAT3 y STAT3 en las muestras obtenidas. Observamos que el mencionado pre-tratamiento inhibió en gran proporción la inducción de pSTAT3 inducida por LIF, indicando que a pesar de que la concentración utilizada no llega a ser efectiva un 100%, es capaz de bloquear casi por completo el aumento de pSTAT3 inducido por LIF (**Figura 17A, panel derecho**).

Una vez confirmada la capacidad bloqueante del anti-LIF células HC11 fueron tratadas por 15 minutos con MCs pre-incubado durante 1 hora con o sin 0,8 $\mu$ g/ml de este bloqueante. La Figura 17A (panel derecho) muestra que la inducción de la fosforilación de STAT3 en HC11 producida por los MCs (30% y 50%) fue bloqueada casi por completo por dicho anticuerpo, sugiriendo que es el LIF el principal factor secretado por los CPT responsable de inducir la fosforilación de STAT3 en células mamarias. Analizamos también el efecto del mismo tratamiento en células mamarias tumorales, y observamos nuevamente que la inducción de la fosforilación de STAT3 en CPT producida por los MCs (30 y 50%) fue inhibida por el anticuerpo anti-LIF (**Figura 17B**). En la Figura 17B (panel izquierdo) se comparan los niveles de pSTAT3 inducidos por LIF o MCs y el efecto del anticuerpo bloqueante en ambos casos. Estos resultados indican que el LIF presente en los medios condicionados es el responsable de inducir la fosforilación de STAT3 en células epiteliales mamarias y sugieren que el LIF, actuando en forma paracrina, tendría un rol clave en la inducción de los altos niveles de pSTAT3 observado en los tumores mamarios murinos *in vivo*.



**Figura 17. Efecto de un anticuerpo bloqueante de LIF sobre los niveles de fosforilación de STAT3 inducidos por MC en células epiteliales mamarias en cultivo.** Se analizaron por western blot los niveles de pSTAT3 y STAT3 en células **(A)** HC11 tratadas durante 15 minutos con MC (30 y 50%), (panel izquierdo) LIF (2 y 5 ng/ml) (panel derecho) en presencia o ausencia del anticuerpo bloqueante de LIF (0,8µg/ml) y en **(B)** CPT tratados el mismo tiempo con MC al 50% (panel izquierdo) o MC al 30% y 50% en presencia o ausencia del anticuerpo bloqueante de LIF (0,8µg/ml). Las fotografías, corresponden a un western blot representativo.

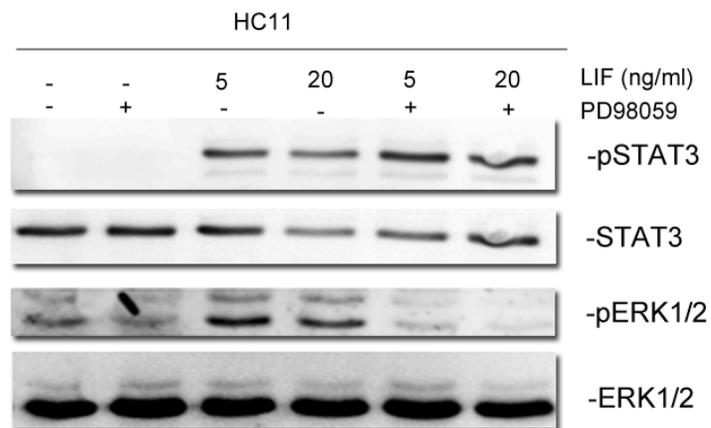
Con el objetivo de evaluar si la activación de STAT3 inducida por LIF y los MCs en células HC11 y CPT correlaciona con un aumento en la actividad transcripcional del factor STAT3, analizamos por RT-PCR los niveles de ARNm del factor de transcripción C-EBP $\delta$ , cuyo promotor es activado por STAT3 (Hutt et al., 2000). Los resultados nos muestran que tanto LIF (20ng/ml) como MCs al 50% fueron capaces de aumentar significativamente los niveles de mensajero de C-EBP $\delta$  en CPT y también que la pre-incubación de los MCs con el anticuerpo anti-LIF fue capaz de bloquear significativamente este efecto (**Figura 18**). Estos resultados indican por un lado, que la fosforilación de STAT3 inducida por LIF y por MCs en los CPT activa la función transcripcional STAT3 y por otro, que el LIF, presente en los medios condicionados, es el responsable de inducir dicha activación.



**Figura 18. Efecto modulador del anticuerpo bloqueante de LIF sobre la actividad transcripcional de STAT3 inducida por Medio Condicionado (MC) en células en cultivo.** Se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *c/EBPδ* (CCAAT-enhancer-binding protein) por RT-PCR semi-cuantitativa en CPT tratados con LIF (20ng/ml) o con MC (50%) pre-incubado o no con el anticuerpo bloqueante de LIF (0,8μg/ml). Se utilizó actina para normalizar los datos y las barras representan veces de inducción con respecto al control (calle 1). Los datos se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Las distintas letras (a y b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí.

Ha sido reportado en células epiteliales mamarias, que las citoquinas de la familia de la IL-6, entre las que se encuentra LIF, son capaces de activar una vía de señalización “no convencional” a través del receptor gp130, que involucra la fosforilación de ERK1/2 (Zhao et al., 2004). La activación de esta serina/treonina quinasa podría inducir la fosforilación de STAT3 en el residuo serina 727 y de esta manera modular los niveles de fosforilación en tirosina de este factor de transcripción (Chung et al., 1997; Lim and Cao, 1999). Por lo tanto, decidimos primero evaluar por western blot, la capacidad de LIF de inducir la activación de esta MAPK en las células HC11 y luego analizar el efecto que su activación sobre los niveles de fosforilación en tirosina de STAT3. Observamos que LIF (5ng/ml) indujo la

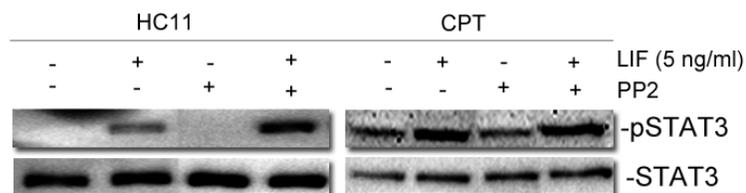
fosforilación de ERK1/2 y que este efecto disminuyó marcadamente con el pre-tratamiento del anticuerpo bloqueante de LIF (**Figura 19**). Sin embargo, cuando el tratamiento de LIF (5 y 20ng/ml) se realizó sobre células pre-incubadas durante 1 hora con 30 $\mu$ M del inhibidor específico de la quinasa MAPK/ERK1/2 (MEK) (PD98059), a pesar de que la activación de ERK1/2 fue bloqueada completamente, el inhibidor no afectó la inducción de la fosforilación en tirosina de STAT3 inducido por LIF (**Figura 19**). Estos resultados indican que la activación de ERK no modula la fosforilación en tirosina de STAT3 en este sistema.



**Figura 19. Efecto del un inhibidor de MEK (PD98059) sobre los niveles de fosforilación de STAT3 inducidos por LIF en células mamarias en cultivo.** Se analizaron por western blot los niveles de fosforilación en tirosina de STAT3 en células HC11 pre-incubadas durante 1 hora con 30 $\mu$ M del inhibidor de de MEK (PD98059) o su vehículo (DMSO) que posteriormente fueron tratadas durante 15 minutos con LIF (5 y 20ng/ml). La fotografía corresponde a un western blot representativo.

Los receptores de citoquinas y de factores de crecimiento se asocian con miembros de la familia de quinasas Src (SFC) y junto con las JAKs, de manera concertada, activan varias moléculas señalizadoras entre las que se encuentra STAT3. También son necesarias para reclutar reguladores negativos de señalización como fosfatasas en tirosina (PTP) y supresores de la señalización por citoquinas (SOCs). En particular varios trabajos realizados en células tumorales, han implicado a quinasa c-Src, integrante de la familia SFC, como responsable de inducir la fosforilación en tirosina de STAT3 (Schreiner et al., 2002; Yu and Jove, 2004). Nos

propusimos entonces, determinar si la actividad esta quinasa estaba involucrada en el aumento de los niveles de fosforilación en tirosina de STAT3 inducidos por LIF, en las células mamarias en cultivo. Para ello, las células fueron pre-incubadas durante 15 minutos con 30 $\mu$ M de PP2 (inhibidor selectivo de la proteína quinasa en tirosina de la familia Src (Golubovskaya et al., 2003), tratadas con LIF (5ng/ml) durante 15 minutos y posteriormente las muestras fueron analizadas por western blot. La Figura 20 muestra que PP2 no modificó el efecto de LIF sobre pSTAT3 en CPT ni en células HC11, sugiriendo que la activación de STAT3 por fosforilación en tirosina no depende de la activación de Src en ninguno de los dos casos (**Figura 20**).



**Figura 20. Efecto de un inhibidor de la familia de quinasas Src (PP2) sobre los niveles de fosforilación de STAT3 inducidos por LIF en células mamarias en cultivo.** Se analizaron por western blot, los niveles de fosforilación de STAT3 en HC11 y en CPT pre-incubados o no durante 15 minutos con un inhibidor específico de Src, PP2 (30 $\mu$ M) y tratados luego con LIF (5ng/ml) durante 15 minutos. La fotografía corresponde a un western blot representativo.

**Sección 1.2.** En conjunto los resultados obtenidos indican que el MC por células tumorales (CPT) induce la fosforilación de STAT3 en células epiteliales mamarias tumorales (CPT) y no tumorales (HC11) y produce un aumento en su actividad transcripcional. Luego, observamos que el aumento de activación de STAT3 inducido por los MCs disminuye marcadamente en presencia de un anticuerpo bloqueante de LIF y que ni un inhibidor específico de Src (PP2) ni de MEK (PD98059) afectan los niveles de fosforilación en tirosina de STAT3 inducidos por MCs, sugiriendo que la actividad quinasa de las proteínas Src y Erk 1/2 no modulan los niveles de fosfo-tirosina de STAT3 inducido por LIF en estas células.

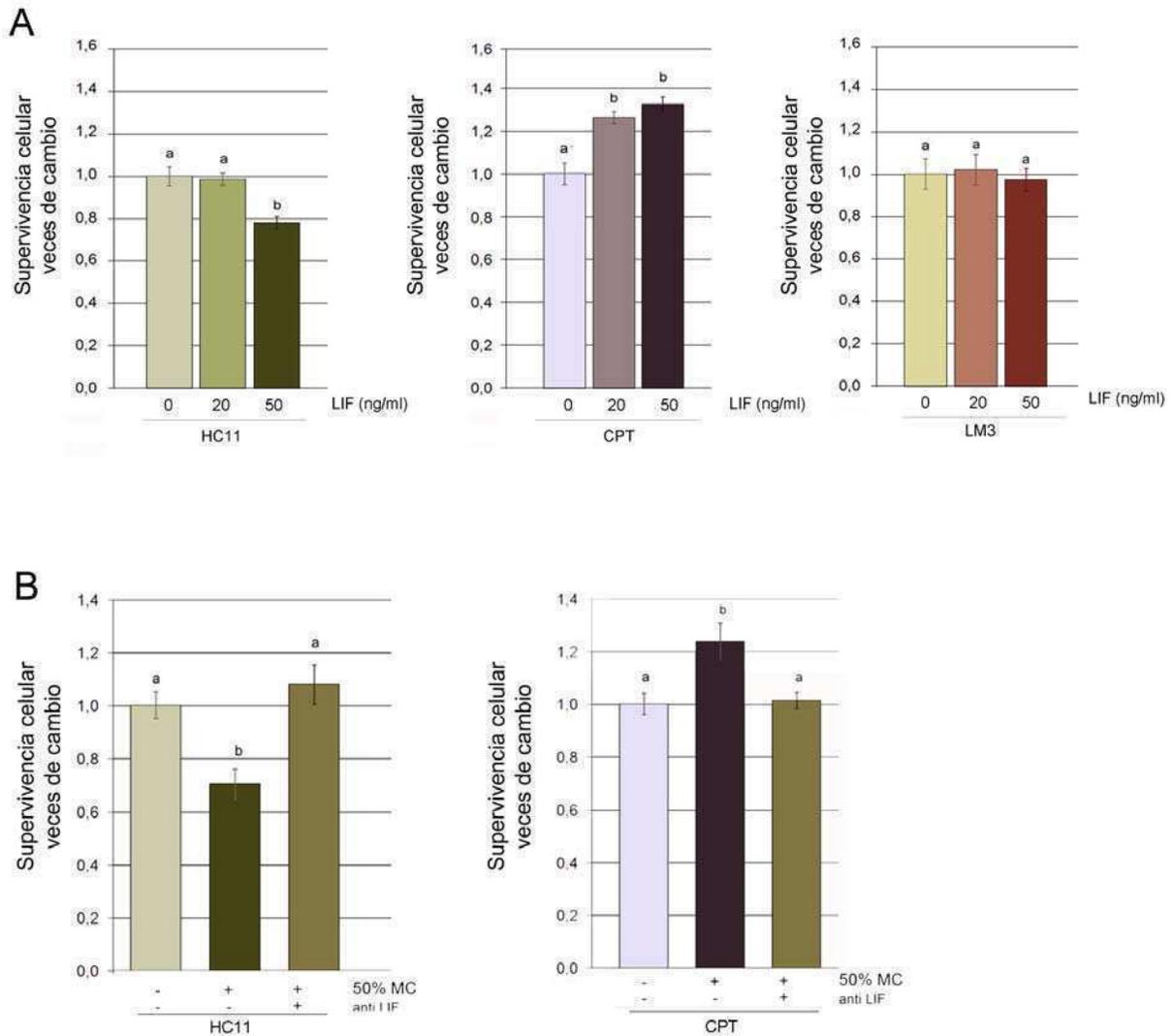
### 1.3 El LIF secretado por células mamarias tumorales promueve la supervivencia en células tumorales mamarias. Vías involucradas.

Varios tipos de carcinomas, incluyendo al mamario expresan altos niveles de STAT3 fosforilado. En la glándula mamaria normal se observó que la activación de STAT3 que induce la muerte por apoptosis del epitelio secretorio (Chapman et al., 1999; Humphreys et al., 2002). Hasta el momento es controvertido el rol que juega la activación de STAT3 en la supervivencia de las células tumorales (Ling and Arlinghaus, 2005; Masuda et al., 2002). Con el objetivo final de evaluar el rol biológico que tiene la activación de STAT3 mediada por LIF en células mamarias tumorales, decidimos estudiar el efecto de diferentes concentraciones y distintos tiempos de tratamiento de esta citoquina, sobre la supervivencia de CPT, células HC11 y células LM3. Utilizando la técnica de cristal violeta observamos que el tratamiento con LIF (20 y 50ng/ml) durante 72 horas indujo un aumento significativo de la supervivencia de células tumorales (CPT) mientras que tuvo el efecto opuesto en células epiteliales mamarias no tumorales (HC11) (**Figura 21A**). Por otro lado, las células LM3, que no poseen R-LIF, no respondieron en este ensayo al tratamiento con LIF a ninguna de las concentraciones utilizadas (**Figura 21A**). Cuando se evaluó el efecto de los MCs sobre la supervivencia de CPT, observamos que se produjo también un incremento del número de células a 72 horas y que este efecto fue revertido cuando el MC fue pre-incubado con un anticuerpo bloqueante de LIF 0.8µg/ml (**Figura 21B**). Por otro lado, las HC11 respondieron al MC de manera similar a cuando fueron tratadas con LIF y observamos que el efecto fue revertido cuando MC fue pre-incubado con el anticuerpo bloqueante de LIF (**Figura 21B**).

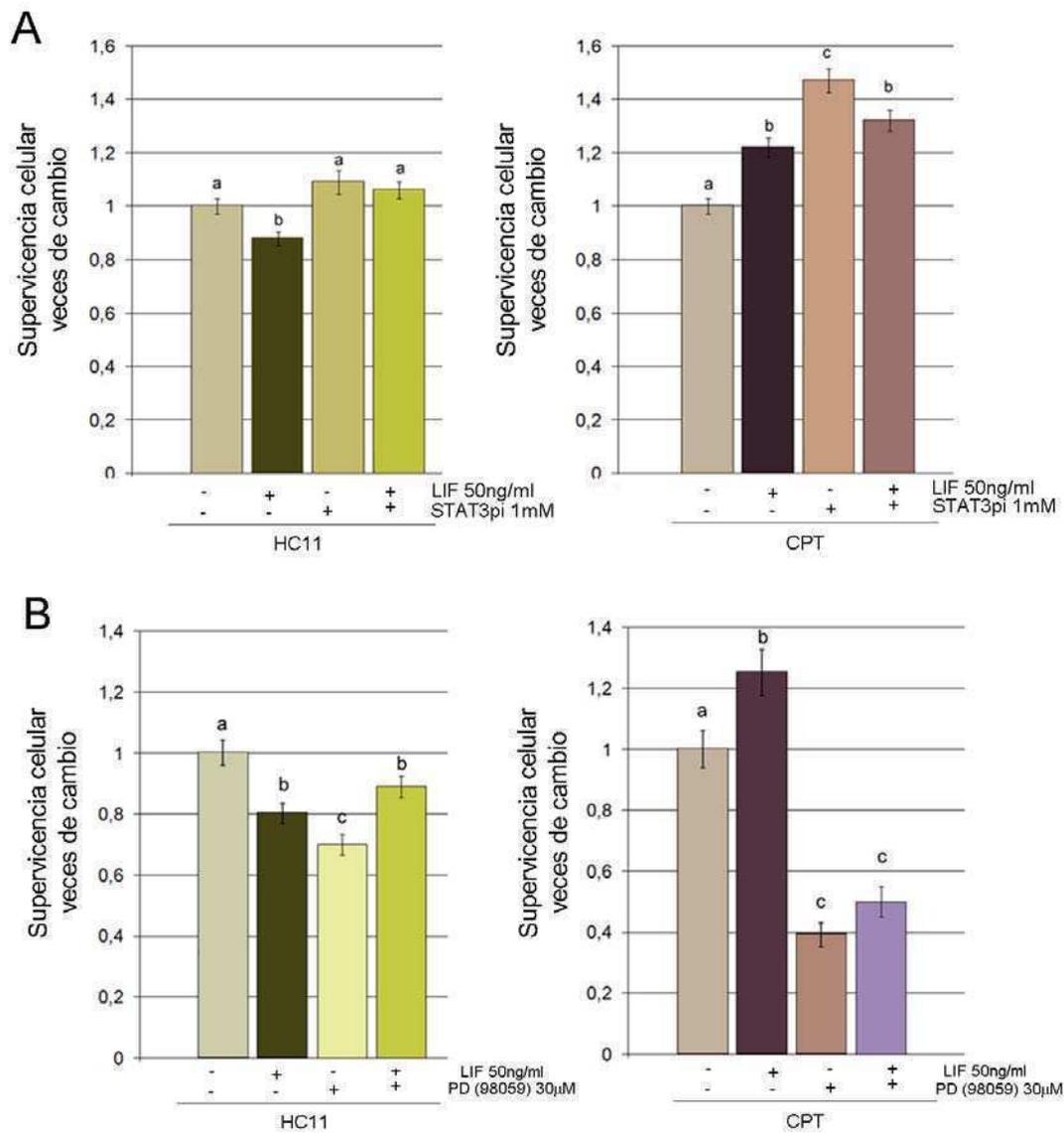
Dado que habíamos determinado que LIF era capaz de inducir tanto la activación de ERK como de STAT3 en CPT y en HC11, decidimos analizar cómo se encuentran involucradas cada una de estas proteínas en los efectos que ejerce el LIF sobre la supervivencia de estas células. Para ello, se trataron CPT y HC11 con 50ng/ml de LIF durante 72 horas en presencia o ausencia de un péptido inhibidor específico de STAT3 (Stat3pi, Calbiochem, o el inhibidor de MAPK/ERK quinasa, PD98059. La Figura 22 muestra el bloqueo significativo del efecto inhibitorio del LIF en la supervivencia celular de HC11 por STAT3pi (**Figura 22A**). Sin embargo, este mismo tratamiento en células tumorales (CPT) no sólo fue incapaz de inhibir el efecto estimulador de LIF sobre la supervivencia celular, sino que produjo un

incremento significativo de la misma (**Figura 22A**). Por el contrario, el bloqueo de la activación de ERK1/2 tuvo un marcado efecto inhibitorio sobre la supervivencia de células CPT, mientras que, bajo el mismo tratamiento, las HC11 respondieron con la misma tendencia pero de manera mucho menos marcada (**Figura 22B**). Estos resultados indican que la actividad inhibitoria ejercida por LIF sobre HC11 estaría mediada por su efecto sobre STAT3, mientras que la capacidad inductora de la supervivencia (observada en CPT) dependería de la activación de ERK1/2.

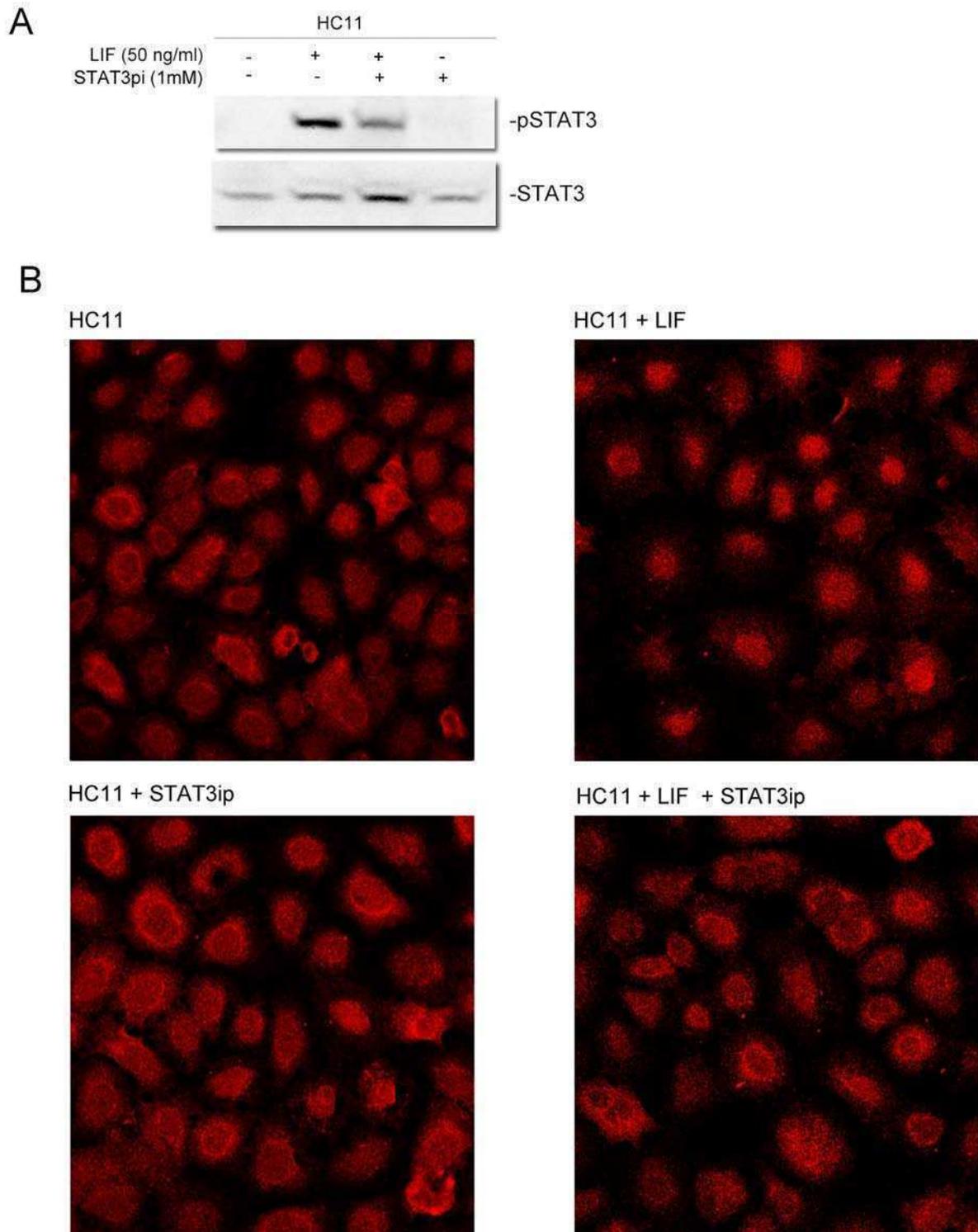
Para corroborar la capacidad del STAT3pi de interferir con la activación de STAT3 inducida por LIF, analizamos el efecto que tiene el péptido inhibitorio sobre el aumento de los niveles de fosforilación de este factor de transcripción (Catalano et al., 2005) y su posterior translocación al núcleo (Bharti et al., 2003). Para ello, en primer lugar se trataron células HC11, pre-incubadas durante una hora con 1mM de STAT3pi o su vehículo, con 50ng/ml de LIF durante 15 minutos y se analizaron los niveles de fosforilación de STAT3 por western blot. La Figura 23A muestra que el péptido inhibitorio fue capaz de disminuir los niveles de fosforilación inducidos por LIF (**Figura 23A**). Posteriormente, con el objetivo de analizar el efecto del péptido sobre la translocación nuclear de STAT3 inducida por LIF, células HC11 previamente incubadas o no con 1mM de STAT3pi durante 1 hora, fueron tratadas durante 30 minutos con 50ng/ml de LIF. Por microscopía confocal, utilizando un anticuerpo específico anti-STAT3 y un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo, observamos que el péptido fue capaz de inhibir la translocación de STAT3 al núcleo inducida por LIF (**Figura 23B**), confirmando la eficiencia que tiene STAT3pi 1mM sobre el bloqueo de los niveles de fosforilación y translocación nuclear de STAT3.



**Figura 21. Efecto de LIF y MC sobre la viabilidad de células mamarias.** Efecto del LIF y el MC sobre la viabilidad celular evaluada por el ensayo de Cristal Violeta luego de 72 horas de tratamiento. **(A)** Células HC11, CPT y LM3 tratadas con LIF (20 y 50ng/ml). **(B)** Células HC11 y CPT tratados con o sin MC al 50/ pre-incubado o no con un anticuerpo bloqueante de LIF (0,8µg/ml). Las barras representan veces de cambio al relativizar los niveles de supervivencia en cada tratamiento con la condición experimental control de cada tipo celular. Los datos se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Las distintas letras (a y b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí.



**Figura 22. Efecto de LIF y MC sobre la viabilidad de células mamarias en cultivo.** Efecto del LIF y el MC sobre la viabilidad celular evaluada por el ensayo de Cristal Violeta luego de 72 horas de tratamiento. Células HC11 y CPT tratados con LIF (50ng/ml) en presencia o ausencia de **(A)** 1mM de un péptido inhibidor específico de STAT3 (STAT3pi) y **(B)** 30μM del inhibidor de MAPK/ERK quinasa, PD98059. Las barras representan veces de cambio al relativizar los niveles de supervivencia en cada tratamiento con la condición experimental control de cada tipo celular. Los datos se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Las distintas letras (a y b, c) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí.



**Figura 23.** Efecto de LIF sobre la fosforilación y translocación de STAT3 al núcleo celular en presencia de un inhibidor de la activación de STAT3. Efecto del péptido inhibitorio de STAT3 (STAT3pi) sobre los niveles de fosforilación de STAT3 analizados por western blot (**A**) y su translocación al núcleo celular por microscopía confocal (**B**) inducidos por LIF. Aumento en (**B**) 400x.

**Sección 1.3.** Los resultados obtenidos indican que el LIF induce diferentes respuestas, promoviendo o inhibiendo la supervivencia celular en células tumorigénicas y no tumorigénicas respectivamente. Es interesante destacar que en ambos tipos celulares esta citoquina es el principal responsable de inducir la fosforilación de STAT3 y que la presencia de un péptido inhibidor de su activación la supervivencia celular aumentó significativamente en los dos casos. Por el contrario, el bloqueo de la activación de ERK1/2 inhibió la supervivencia de células tumorigénicas y no tumorigénicas, aunque teniendo un efecto menos marcado en estas últimas.

**En resumen los resultados presentados en este capítulo indican que:**

- 1) El LIF producido constitutivamente por los tumores mamarios murinos y actuando de manera autócrino/parácrina, es el principal responsable de activar el factor de transcripción STAT3 en este tipo de neoplasias.
- 2) La activación de STAT3 tanto en células normales (HC11) como en aquellas provenientes de tumores diferenciados (CPT) disminuye el nivel de supervivencia.
- 3) El LIF también induce la activación de la cascada MEK/ERK1/2 en células mamarias murinas normales y transformadas. Mientras que el aumento de los niveles de pERK1/2 no tuvo mayores consecuencias sobre la supervivencia de células mamarias no neoplásicas (como HC11) fue notable el aumento que produjo sobre las células tumorales.

En conjunto estos datos sugieren que el LIF podría ejercer distintos efectos sobre células normales y tumorales mamarias (muerte vs. supervivencia), no por actividades contrapuestas del STAT3 activo, sino por una sensibilidad diferencial de estas células a la activación de la cascada MEK/ERK. De esta manera, ante niveles similares de LIF, la co-activación de ambos caminos de transducción (JAK/STAT vs MEK/ERK) llevaría a la muerte de las células normales y a la supervivencia de las tumorales.

## Capítulo 2

### 2.1 Caracterización del dispositivo utilizado para ejercer estrés mecánico a células en cultivo.

El estrés mecánico es un estímulo capaz de disparar la activación de cascadas de señales y la expresión de genes de manera específica en diversos tejidos, tanto en condiciones normales como fisio-patológicas. Con el objeto de estudiar si el estrés mecánico podría estar jugando este rol en el proceso de involución mamaria, desarrollamos un modelo que permite aplicar un estímulo mecánico a las células en cultivo. En este trabajo utilizamos la línea celular de epitelio mamario murino HC11. Esta línea inmortalizada, pero no-tumorigénica, presenta un fenotipo epitelial normal. Se ha observado que al ser inoculadas en la almohadilla de grasa subcutánea despoblada de epitelio de ratones hembra ("cleared fat pad"), son capaces de desarrollar estructuras ductales y alveolares normales. (Ball et al., 1988; Humphreys et al., 2002).

En este modelo aplicamos el estímulo utilizando un dispositivo capaz de ejercer un estiramiento radial (**ERa**), homogéneo y controlado a una membrana elástica de silicona sobre la cual/ hicimos crecer las células en cultivo. Las membranas de siliconas que se usamos en este trabajo fueron de dos tipos: las comercializadas por la empresa Flexcell International y aquellas que fabricamos en nuestro laboratorio. Ambos tipos de membranas fueron sometidas a las condiciones de esterilidad necesarias para el correcto crecimiento de células en cultivos. Para mejorar la adherencia celular al sustrato de silicona agregamos a las membranas una cubierta de Colágeno Tipo I.

El dispositivo utilizado, inspirado en el descrito previamente por Lee y sus colaboradores (Lee et al., 1996), fue construido enteramente en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, en el taller del INQUIMAE a cargo de Sr. Eliseo Dell Fosse y contando con el asesoramiento técnico del Sr. Angel Vidal (Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, IFIBYNE-CONICET). El dispositivo armado, las piezas que lo conforman y los materiales utilizados para construir cada pieza, así como la preparación y tratamiento de las membranas de siliconas, se

describen en la sección de M&M (Figura 9 y 10, página 45). Los materiales fueron elegidos en base a sus características físicas, ya que resisten el proceso de autoclavado. Esto permite que el dispositivo pueda esterilizarse y re-utilizarse para sucesivos experimentos. El procedimiento de armado del dispositivo para desarrollar un protocolo de estiramiento también se describe detalladamente en la sección de Materiales y Métodos (**Figura 11**).

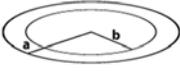
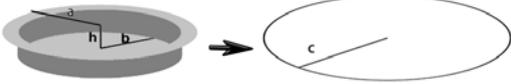
Una vez construido el dispositivo, como primer paso, desarrollamos un modelo teórico que nos permitiese predecir el porcentaje de ERa generado en las membranas de silicona en función de los giros de la tapa a rosca (**M&M, Figura 9, pieza #5**). El giro de esta tapa a rosca, al desplazar el émbolo (**M&M, Figura 9, pieza #3**) empuja la membrana hacia abajo y produce su estiramiento (**ver M&M, protocolo de estiramiento en Figura 11**). La construcción del modelo teórico utilizado, se basó en la geometría que tiene la membrana de silicona al ser colocada en el dispositivo y la geometría que adquiere ésta una vez que se le aplica el estímulo mecánico. En esta representación geométrica, consideramos a la superficie delimitada por el O-ring como la superficie de la membrana capaz de estirarse que se encuentra representada en el diagrama como el círculo de radio  $a$ . Por otro lado, el área definida por el émbolo hueco, aquella donde se realizaran las observaciones experimentales, aparece en el diagrama como un círculo de radio  $b$  (**"Posición Inicial", Figura 24**). Al girar la tapa a rosca, ésta presiona a la arandela (**M&M, Figura 9, pieza #4**), la cual a su vez empuja al émbolo hueco verticalmente hacia abajo una distancia  $h$ , estirando la membrana de silicona. En estas condiciones la membrana adopta una geometría similar al de un "sombrero", donde podríamos considerar que el ala del mismo tiene un radio  $a$ , su corona un radio  $b$  y su superficie total, puede ser descrita por la Ecuación 1 (**Ec. (1)**) (**"Posición Final", Figura 24**). Esta superficie puede re-definirse como el área de un nuevo círculo de radio  $c$  utilizando la Ecuación 2 (**Ec. (2)**). A partir de ésta, la relación entre los radios final e inicial en función de "h", puede ser calculada por la Ecuación 3 (**Ec. (3)**) que nos permite predecir el porcentaje de ERa generado a la membrana (**Ec. 4**).

$$\text{Ec. (1)} \quad 2\pi bh + \pi b^2 + (\pi a^2 - \pi b^2) = 2\pi bh + \pi a^2$$

$$\text{Ec. (2)} \quad 2\pi bh + \pi a^2 = \pi c^2$$

$$\text{Ec. (3)} \quad \frac{c}{a} = \frac{\sqrt{2bh + a^2}}{a}$$

$$\text{Ec. (4)} \quad \text{ERa} (\%) = \left( \frac{c}{a} - 1 \right) \times 100$$

	Posiciones	
	Inicial	Final
Dispositivo		
Geometría de la membrana		
Área de la membrana	$\pi a^2$	(Ec. 2) $2\pi bh + \pi a^2 = \pi c^2$

de (Ec. 2)

$$\text{(Ec. 3)} \quad \frac{c}{a} = \frac{\sqrt{2bha^2}}{a}$$

$$\text{(Ec. 4)} \quad \text{ERa} (\%) = \left( \frac{c}{a} - 1 \right) \times 100$$

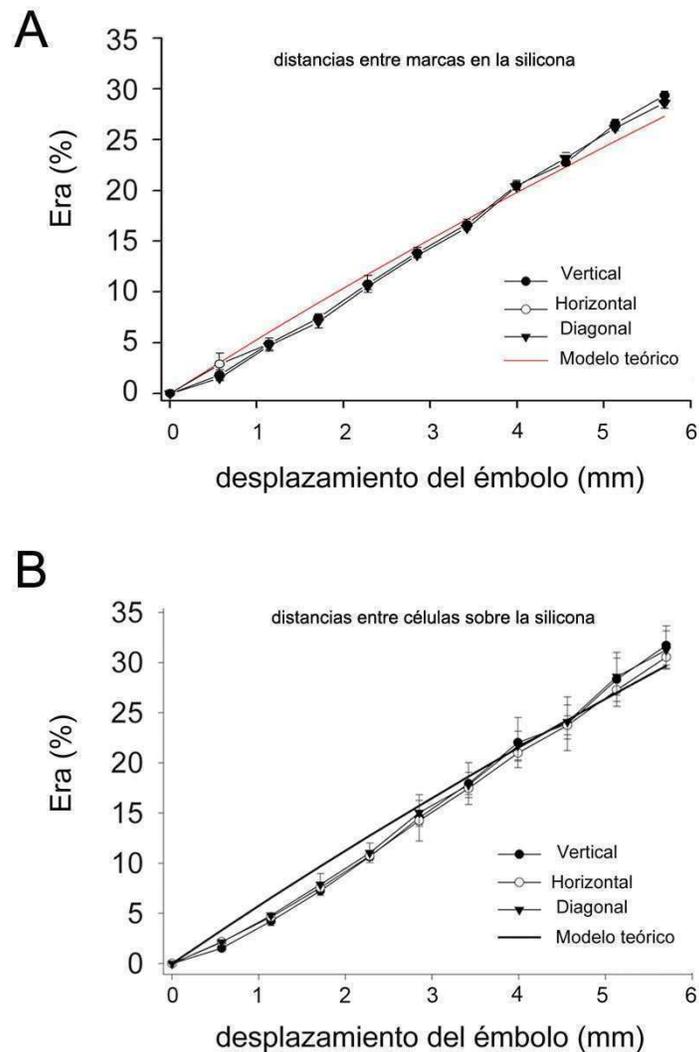
**Figura 24. Modelo Teórico construido para predecir la magnitud del estiramiento aplicado a la membrana en función del desplazamiento del émbolo.** En la figura se muestran las posiciones inicial y final del dispositivo así como la geometría que adopta la membrana de silicona en ambas posiciones. Calculamos el área en forma de “sombbrero” que adopta la membrana al ser estirada (Ec. 1). Esta se redefinió como una nueva área circular de radio  $c$ , (Ec. 2) y a partir de esta ecuación se calculó la relación entre los radios inicial y final superficie final (radio  $c$ ) e inicial (radio  $a$ ) (Ec. 3). Otra ecuación útil que se deriva de la ecuación (1) es la que describe el porcentaje de estiramiento radial aplicado (ERa) para una dada magnitud de “ $h$ ”, siendo  $h$  la distancia que recorre el émbolo para generar el estiramiento (Ec. 4).

Como la membrana de siliconas permanece en la misma posición horizontal al aplicarle el estímulo mecánico, las células adheridas a ella así como la misma membrana pueden ser observadas al microscopio invertido antes y después aplicar el ERA y, a su vez, puede ser registrado con una cámara fotográfica acoplada al microscopio. Así, para determinar si el modelo teórico desarrollado (**Figura 24, Ec. 4**) permite predecir el (ERA) que se genera al sustrato de silicona, se realizaron mediciones sobre la membrana de silicona y sobre las células que crecían sobre ella en función de las vueltas de rosca que se le daba al dispositivo.

Como primer paso, realizamos marcas en el centro y en la periferia de la membrana de silicona sin crecer células sobre ella. Luego, determinamos la distancia entre estas marcas, antes y después de desplazar el émbolo hacia abajo, hasta un máximo de 6 mm, a intervalos de 0.57 mm. Así, de manera de verificar que el ERA aplicado a la membrana fuese homogéneo, medimos las distancias entre 4 pares de marcas en cada orientación (horizontal, vertical y diagonal) en 4 campos microscópicos diferentes (**Figura 25A**). De este modo determinamos la relación entre desplazamiento del émbolo (en mm) y el porcentaje de ERA generado en la membrana con este dispositivo. La Figura 25A muestra el buen ajuste existente entre lo predicho por el modelo teórico en un rango de valores de entre 0 a 6mm (**Ec. 4**) y lo observado microscópicamente en las diferentes direcciones. Estas observaciones indican que el porcentaje de ERA generado, se distribuye homogéneamente a través de la membrana, y que el modelo teórico desarrollado, en este caso (**Figura 2, Ec. 4**), es útil para predecir el porcentaje de ERA generado al sustrato.

Luego realizamos el mismo análisis descrito anteriormente en un cultivo de células HC11 sub-confluentes creciendo sobre la membrana de silicona; seleccionamos diferentes pares de células (separadas entre 400 a 500  $\mu\text{m}$ ) y determinamos microscópicamente la distancia entre ellas antes y después de desplazamientos crecientes del émbolo (**Figura 26B**). Nuevamente, para analizar la homogeneidad de ERA generado, determinamos la distancia entre 10 pares de células en cada orientación (horizontal, vertical y diagonal) en 4 campos microscópicos diferentes. Los resultados obtenidos, indican que el ERA generado en la membrana de siliconas en estas condiciones se ajusta nuevamente a lo predicho por el modelo teórico (**Figura 24, Ec. 3**) y que la medición de la distancia entre

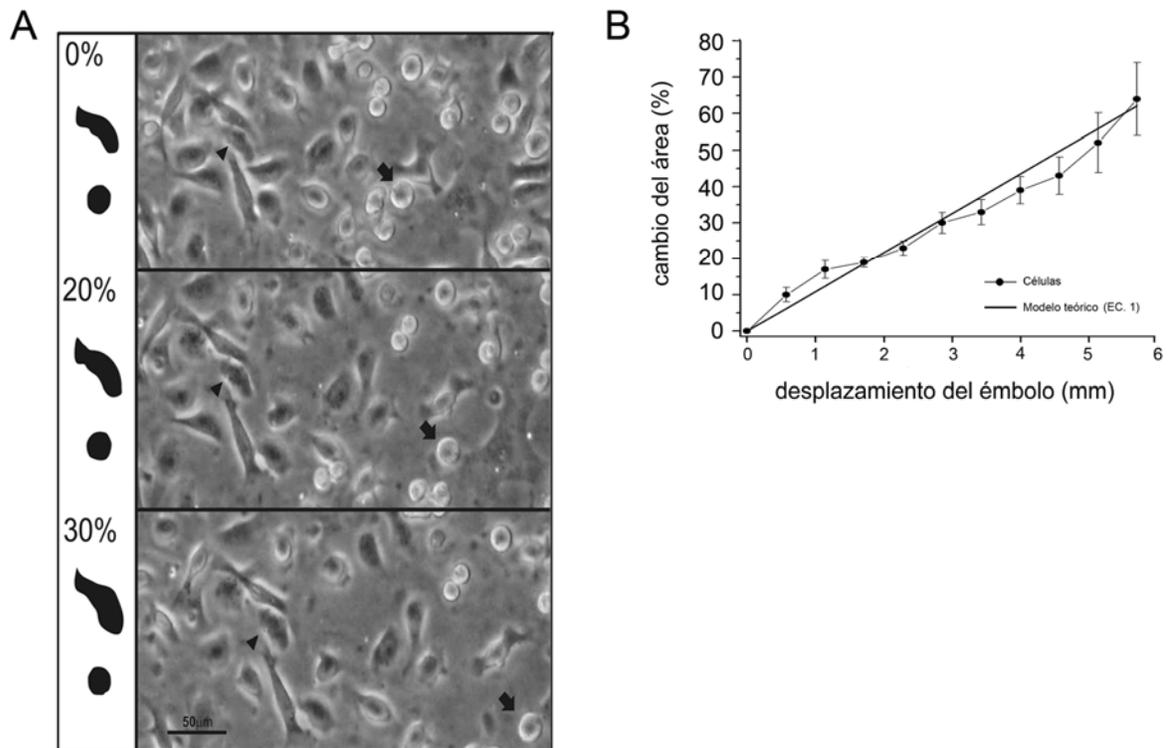
células antes y después de aplicado el estímulo mecánico, puede utilizarse para calcular el porcentaje de ERA aplicado a la membrana. A raíz de que confirmamos que el ERA calculado de esta manera es homogéneo (**Figura 25B**), la medición de la distancias entre células, puede realizarse en cualquier orientación y lugar de la membrana.



**Figura 25. Calibración del dispositivo.** Relación entre la profundidad de avance del émbolo (mm) y el correspondiente porcentaje de ERA generado en la membrana de silicona al realizarse las mediciones sobre **(A)** marcas en la membrana o **(B)** cuando se midió la distancia entre células creciendo sobre ella. En ambos casos **(A y B)** el análisis se realizó en diferentes áreas y direcciones (horizontal, vertical, diagonal) de la membrana de silicona. Los datos se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE **(A)** 4 pares de marcas o **(B)** 10 pares de células en cada orientación de 4 campos microscópicos diferentes.

Con el objetivo de determinar si el porcentaje (%) de ERa generado al sustrato se transmite eficientemente a las células creciendo sobre él, a continuación analizamos las áreas de células HC11 luego de aplicarles intensidades crecientes de ERa. Para este análisis discriminamos 2 tipos de células: aquellas con una superficie poligonal, que parecen estar bien adheridas al sustrato, y aquellas con una superficie redondeada a las que consideramos pobremente adheridas. Luego de aplicar el estímulo mecánico observamos que sólo el área de aquellas células bien adheridas a la silicona era afectada (**Figura 26A, cabeza de flecha**), mientras que no se observaron cambios en el área de células redondeadas (**Figura 26A, flechas negras**). Se determinó cómo se fue modificando el área de 5 células bien adheridas, en 4 campos microscópicos diferentes, a medida que se incrementaba el ERa (**Figura 26B**). Pudimos observar la similitud que existe entre el cambio del área del sustrato, predicho por el modelo teórico en relación al desplazamiento del émbolo y el cambio observado en el área de las células a medida que aplicamos el estímulo mecánico.

**Figura 26. Calibración del dispositivo.** Intensidad de ERa generado en las células en función de la profundidad del émbolo (mm). **(A)** Imagen de contraste de fase representativa (aumento original 200x), de células HC11 creciendo sobre la membrana de silicona montada en el dispositivo. A las membranas se les aplicó un ERa de 0/ (panel superior), 20/ (panel central) y 30/ (panel inferior). Las flechas negras completas indican células redondeadas que se encuentran pobremente adheridas al sustrato. Las puntas de flechan muestran células que se encuentran bien adheridas al sustrato y por ende su área se ve modificada por el estiramiento aplicado a la membrana. **(B)** Relación entre la profundidad de avance del indector (mm) y cambio en el área celular. El análisis se realizó en 5 células en 4 campos microscópicos diferentes y todas las mediciones se repitieron al menos 3 veces.

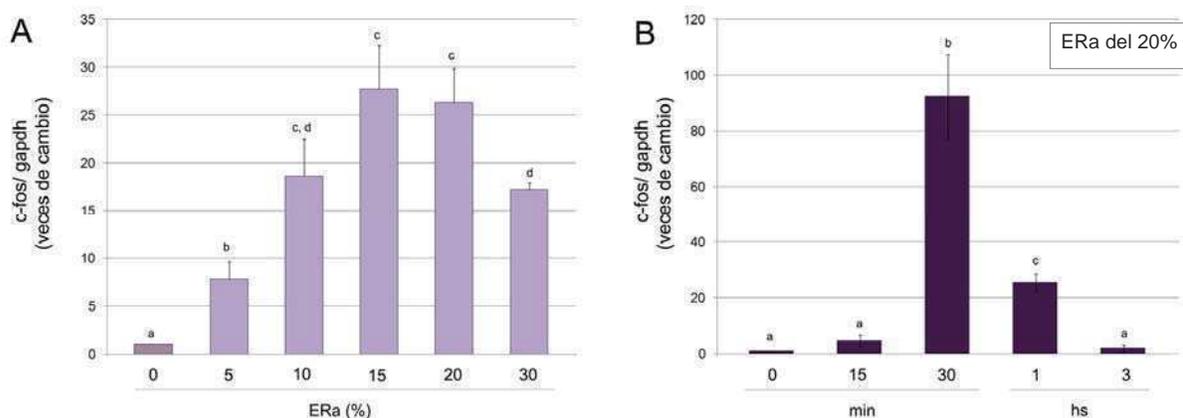


**Sección 2.1.** Los resultados presentados en esta sección, indican que diseñamos y construimos un dispositivo que permite generar un porcentaje de ERA controlado, homogéneo y reproducible, en un rango de 0 al 30%, a una membrana elástica de silicona que eficientemente transmite el estímulo a las células adheridas a ella.

### 2.2.1 El estrés mecánico induce la expresión de c-fos en células epiteliales

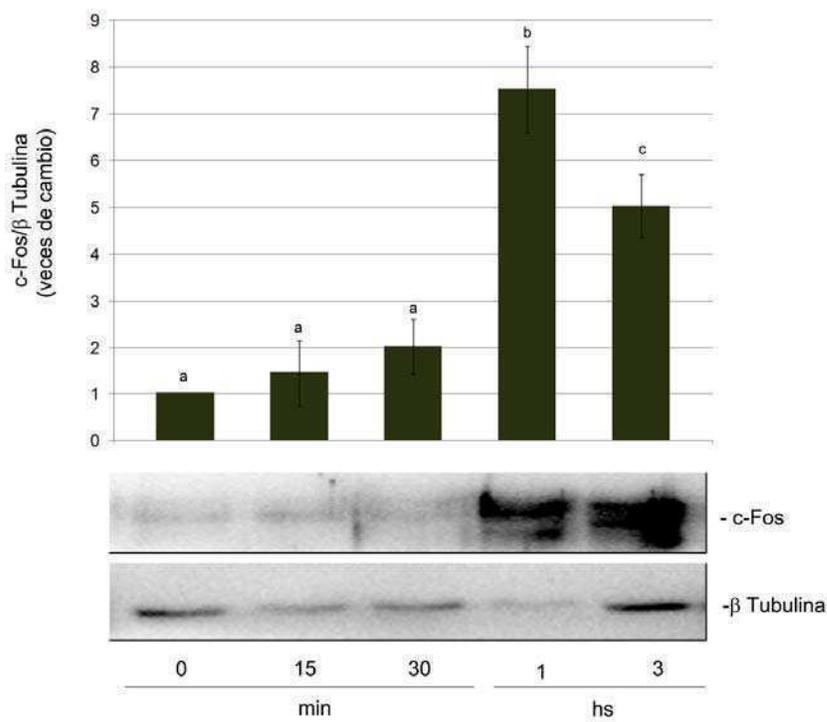
Una vez diseñado y caracterizado el dispositivo, decidimos, como primer paso, estudiar en nuestro sistema la expresión de algún gen cuya regulación por estrés mecánico haya sido previamente reportada en otro tejido o línea celular. En este sentido, el mensajero y la proteína de c-Fos han sido implicados en la respuesta celular a estrés mecánico en diversos tipos celulares (Hess et al., 2004), mientras que también se sabe que sus niveles totales y su estado de activación se encuentran aumentados en células epiteliales mamarias durante la involución post-lactancia (Marti et al., 1999). Por lo tanto, decidimos estudiar, en células epiteliales mamarias creciendo en cultivo, el efecto del estrés mecánico sobre los niveles de expresión c-Fos.

Para ello, estimulamos las células epiteliales mamarias HC11 con diferentes porcentajes de ERa durante una hora y posteriormente analizamos los niveles de ARNm de *c-fos* por RT-PCR en tiempo real. Observamos que un ERa entre 0% y 15% produjo una inducción significativa de la expresión del mensajero que fue dependiente de la dosis. Esta inducción alcanzó una meseta entre 15% y 20% y disminuyó significativamente al llegar al 30% aunque los niveles continuaron siendo significativamente mayores a los del control (**Figura 27**). Posteriormente realizamos un análisis del curso temporal de la activación de la expresión del gen *c-fos* (0-3horas) utilizando un 20% de ERa. A partir de los 15 minutos de aplicación del estímulo se indujo en forma significativa la expresión *c-fos*, característico de un gen de respuesta temprana y su máximo nivel de expresión fue alcanzado a los 30 minutos de estiramiento sostenido (**Figura 27**).



**Figura 27. Efectos del estrés mecánico sobre los niveles de ARNm de *c-fos*.** Se analizaron los niveles de ARNm de *c-fos* por RT-PCR cuantitativa en tiempo real en células HC11 sometidas a un estiramiento sostenido **(A)** durante 1 hora a distintas intensidades (0-30%) o **(B)** estiradas un 20% durante los períodos indicados. Se utilizó la expresión del ARNm de *gapdh* para normalizar los datos. Las barras representan veces de inducción al relativizar los niveles de expresión de *c-fos* en cada caso con la condición experimental control (0% ó 0 minutos respectivamente). Los datos se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 4 experimentos independientes. En todos los casos, los tratamientos con letras distintas (a,b,c y d) son significativamente distintos ( $p < 0.05$ ) entre sí. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos.

Finalmente con el objetivo de analizar si este aumento de la expresión del mensajero de *c-fos* se ve traducido en un aumento de los niveles de expresión de su proteína, realizamos western blot con un anticuerpo que reconoce específicamente c-Fos. Observamos que luego de haber aplicado un ERa sostenido del 20% se produjo un aumento significativo de los niveles de la proteína de c-Fos y que este aumento, aunque menor, se mantuvo a las 3 horas de aplicado el estímulo (**Figura 28**).

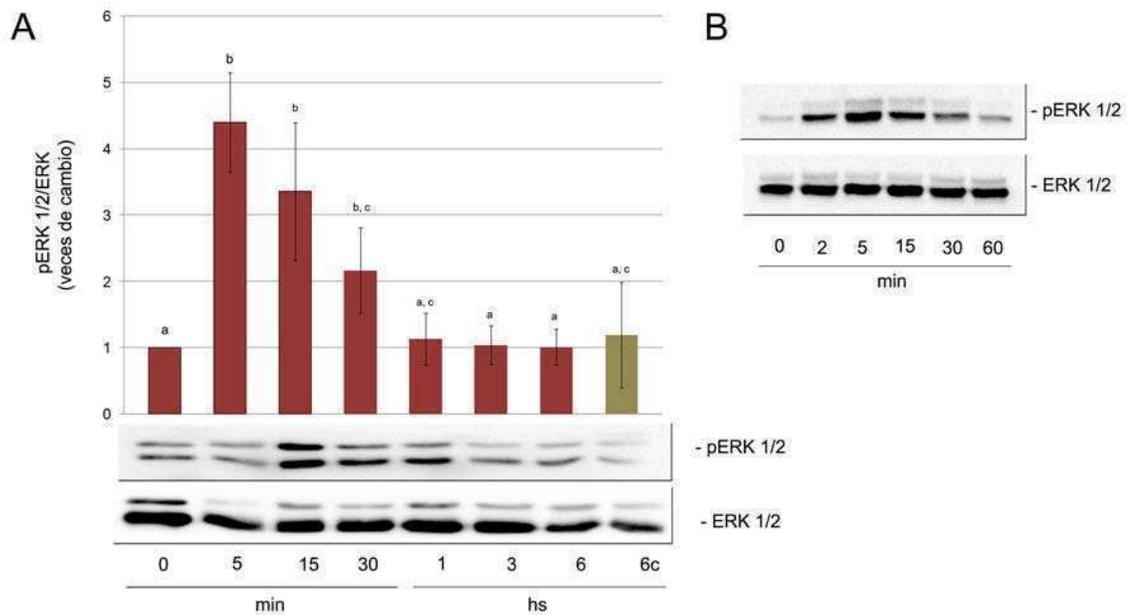


**Figura 28. Efectos del estrés mecánico sobre los niveles de c-Fos.** Se analizaron los niveles de proteína de c-Fos por western blot en células HC11 sometidas a un ERa del 20% por los períodos de tiempo mencionado. Se utilizó la expresión de β-tubulina para normalizar los datos. En cada caso, las barras representan las veces de inducción de c-Fos con respecto al control sin estirar (0 minutos). Los datos se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. En todos los casos, los tratamientos con letras distintas (a,b y c.) son significativamente distintos ( $p < 0.05$ ) entre sí. Si la letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos.

### 2.2.2 El estrés mecánico modula la activación de ERK1/2 y JNK en células epiteliales mamarias en cultivo.

Durante la fase temprana de involución mamaria se han encontrado altos los niveles de fosforilación de la MAP quinasa ERK1/2 (Humphreys et al., 2002). Por otro lado, varios trabajos han reportado que esta quinasa se encuentra involucrada en el aumento de la expresión de *c-fos* inducido por estrés mecánico en varios tipos celulares (Oldenhof et al., 2002). Con el objetivo de explorar si el estrés mecánico es capaz de inducir la activación de ERK1/2 en células epiteliales mamarias, aplicamos un pulso de ERa del 20% a células HC11 por diferentes tiempos y se analizaron por western blot los niveles de ERK1/2 total y de su forma fosforilada utilizando anticuerpos específicos. En la Figura 29 se observa como el estrés mecánico es capaz de inducir la fosforilación transitoria de ERK1/2 en células epiteliales mamarias alcanzando su máximo nivel luego de 5 minutos y disminuyendo significativamente luego de 30 minutos de aplicado el estímulo mecánico (**Figura 29**). La cinética de fosforilación inducida por estrés mecánico que encontramos en nuestro sistema es característica de esta MAP quinasa. En la Figura 29B se observa un análisis temporal más detallado del estado de fosforilación de ERK1/2 a tiempos cortos (0-60 minutos).

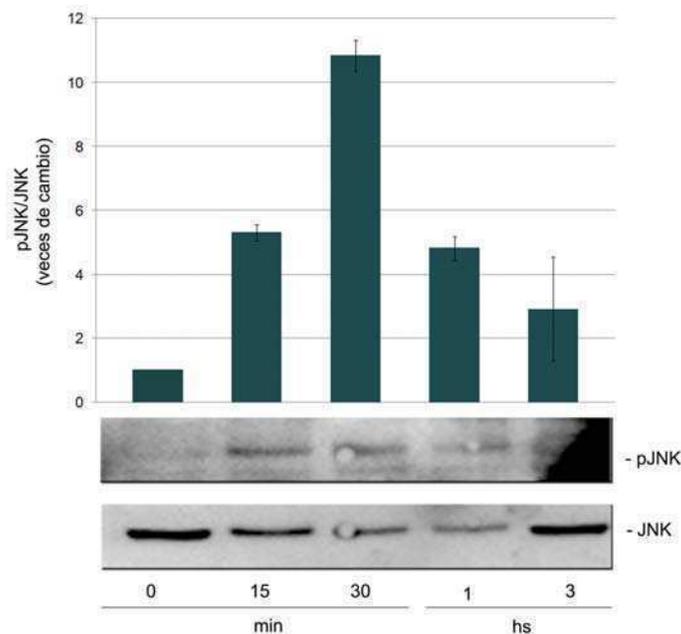
Los resultados obtenidos indican que el estrés mecánico es capaz de inducir la activación de ERK1/2 en células epiteliales mamarias, lo cual abre la posibilidad de que esta rápida activación esté involucrada en inducir la transcripción temprana de *c-fos* en estas células.



**Figura 29. Efecto del estrés mecánico sobre la activación de ERK1/2.** Se analizaron por western blot los niveles de fosforilación de ERK1/2 en células HC11 estiradas radialmente (20%) durante los tiempos indicados: **(A)** cinética a tiempos largos (0-6 horas) en donde se normalizaron los datos de pERK1/2 con los niveles totales de ERK 1/2. Las barras representan las veces de inducción con respecto a la condición experimental control (células cosechadas del dispositivo de estiramiento (0 min) de las medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. El estiramiento de 6 horas tiene su control correspondiente en células sin estimular pero mantenidas durante el mismo tiempo en el dispositivo de estiramiento (6c, marrón). En todos los casos, letras distintas (a, b y c) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos. La fotografía corresponde a un western blot representativo. **(B)** Western blot mostrativo de la cinética de activación de ERK1/2 a tiempos cortos (0-60 minutos).

En la Figura 29, observamos que luego de 30 minutos de aplicado el estímulo mecánico, los niveles de pERK disminuyen significativamente. En otros sistemas (Junttila et al., 2008) y recientemente en células epiteliales mamarias, se ha descrito que la activación de la quinasa JNK regula negativamente los niveles de activación de ERK (Schere Levy y col., manuscrito enviado). Por lo tanto, decidimos estudiar si el estrés mecánico aumenta los niveles de activación de JNK en células epiteliales mamarias siendo un posible mecanismo de regulación negativa de ERK1/2. Nuevamente a través de ensayos de western blot y utilizando un anticuerpo que reconoce de manera específica la forma fosforilada de JNK, evaluamos los niveles de fosforilación de esta quinasa (**Figura 30**). Observamos que los niveles de

pJNK aumentan marcadamente a los 15 minutos de aplicado el estímulo mecánico, alcanzando su máximo de activación a 30 minutos. Estos resultados indican que el estrés mecánico induce la activación de JNK y la cinética observada sugiere que pJNK podría estar involucrada en la disminución de los niveles de pERK.

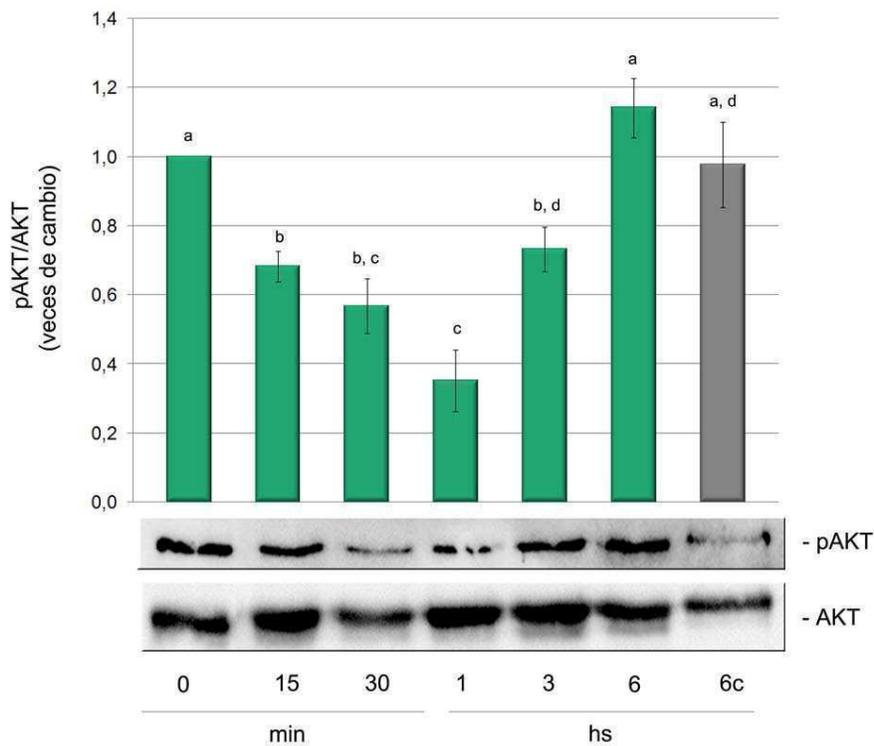


**Figura 30. Efecto del estrés mecánico sobre la activación de JNK.** Se analizaron por western blot los niveles de fosforilación de JNK de células HC11 estiradas radialmente (20%) durante los tiempos indicados (0-3 horas). Se normalizaron los datos contra los niveles totales de JNK. Las barras representan veces de inducción con respecto a la condición experimental control (0 minutos) y se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 2 experimentos independientes. La fotografía, corresponde a un western blot representativo.

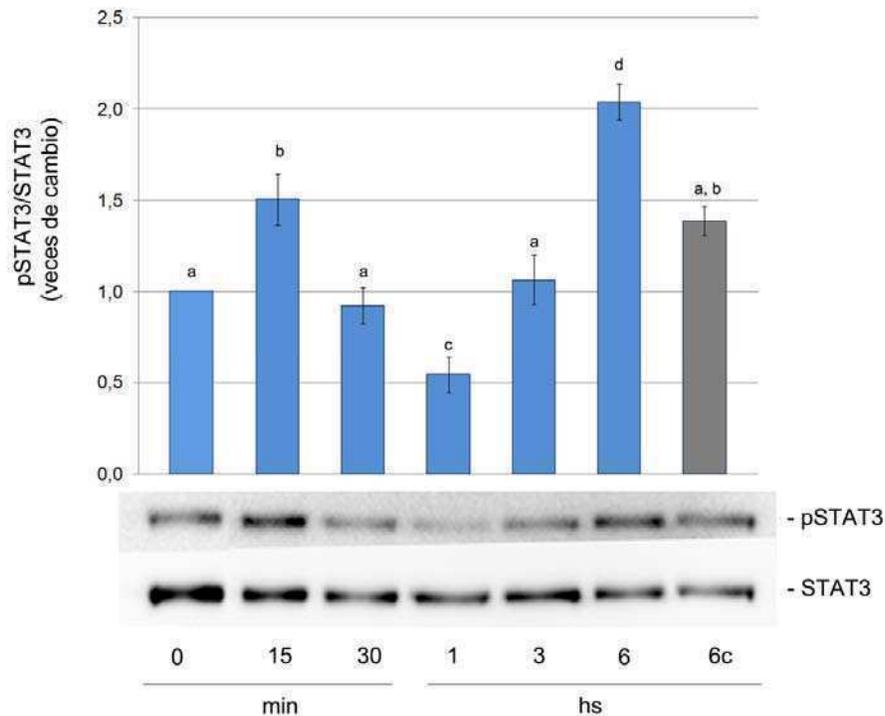
### 2.2.3 El estrés mecánico modula la activación de AKT y STAT3 en células epiteliales mamarias en cultivo.

Como se menciona en la Introducción, AKT es fosforilada como consecuencia de la activación de PI3K, quinasa involucrada en supervivencia celular tanto del epitelio mamario como en muchos otros sistemas celulares (Strange et al., 2001). Con el objetivo de investigar si el estrés mecánico puede regular la señal de supervivencia dada por AKT1 en células epiteliales mamarias, se estudiaron los

niveles de fosforilación de esta quinasa, mediante ensayos de western blot, a partir de extractos proteicos obtenidos de células HC11 a las cuales se les aplicó un ERA del 20% durante distintos tiempos (0-6 horas). En la Figura 31 podemos observar que el estrés mecánico redujo significativamente los niveles de pAKT a partir de los 15 minutos y que continuó disminuyendo hasta los 60 minutos. Sólo recuperó completamente los niveles basales luego de 6 horas de aplicación sostenida del estímulo.



**Figura 31. Efecto del estrés mecánico sobre la activación de AKT.** Se analizaron los niveles de fosforilación de AKT en células HC11 estiradas radialmente (20%) durante (0-6 horas) por western blot utilizando un anticuerpo específico anti pAKT y luego reprobando la membrana con un anticuerpo anti AKT total. Las barras representan veces de inducción de pAKT con respecto a la condición experimental control (0 minutos) y se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Las células estiradas durante 6 horas tiene su control correspondiente sin estirar (6c, barra gris). En todos los casos, letras distintas (a, b y c.) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos. La fotografía corresponde a un western blot representativo.



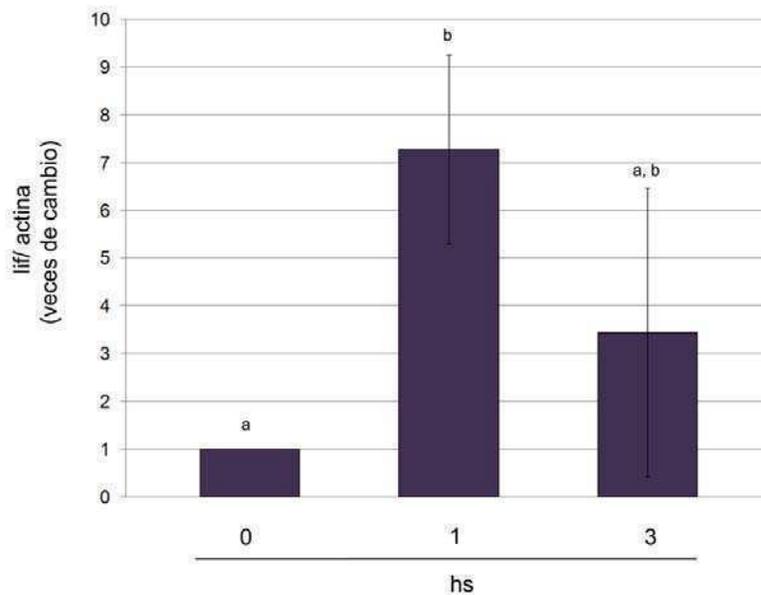
**Figura 32. Efecto del estrés mecánico sobre la activación de STAT3.** Se analizaron por western blot los niveles de fosforilación de STAT3 en células HC11 estiradas radialmente (20%) durante los tiempos indicados (0-6 horas). Se normalizaron los datos contra los niveles totales de STAT3. Las barras representan veces de inducción al relativizar los niveles de activación de STAT3 en cada caso con la condición experimental control (0 minutos) y se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 4 experimentos independientes. En todos los casos, los tratamientos con letras distintas (a, b, c y d) son resultaron significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes entre sí. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos. La fotografía corresponde a un western blot representativo.

El inicio de la involución mamaria se caracteriza por un cambio en el patrón de fosforilación, y por ende de la actividad, de miembros específicos de la familia STAT. Mientras que los niveles de fosforilación de los mediadores de las señales del receptor de Prolactina, STAT5a y STAT5b, disminuyen rápidamente, los niveles de fosforilación de STAT3 aumentan (Liu et al., 1996; Watson and Burdon, 1996), regulando la expresión de genes involucrados en el proceso de apoptosis del epitelio mamario. Dada la relevancia que tiene la activación de STAT3 para el inicio de la involución mamaria, decidimos explorar si el estrés mecánico es capaz inducir la activación por fosforilación de este factor de transcripción. Nuevamente, se le aplicó un pulso de E<sub>R</sub> del 20% a células HC11 por diferentes tiempos (0-6 horas) y se

analizaron los niveles de fosforilación de STAT3 por western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada en tirosina y otro que reconoce a la proteína total de STAT3. En la Figura 32 observamos que el estímulo mecánico indujo un aumento en la fosforilación de STAT3 con una cinética que se caracteriza por presentar 2 picos: un aumento significativo temprano, a los 15 minutos de aplicado el estímulo, que disminuye significativamente a la hora y otro aumento significativo tardío, a las 6 horas. Los niveles de pSTAT3 de las 6 horas son significativamente mayores que los del control a tiempo cero y el control sin estirar de 6 horas (**Figura 32**).

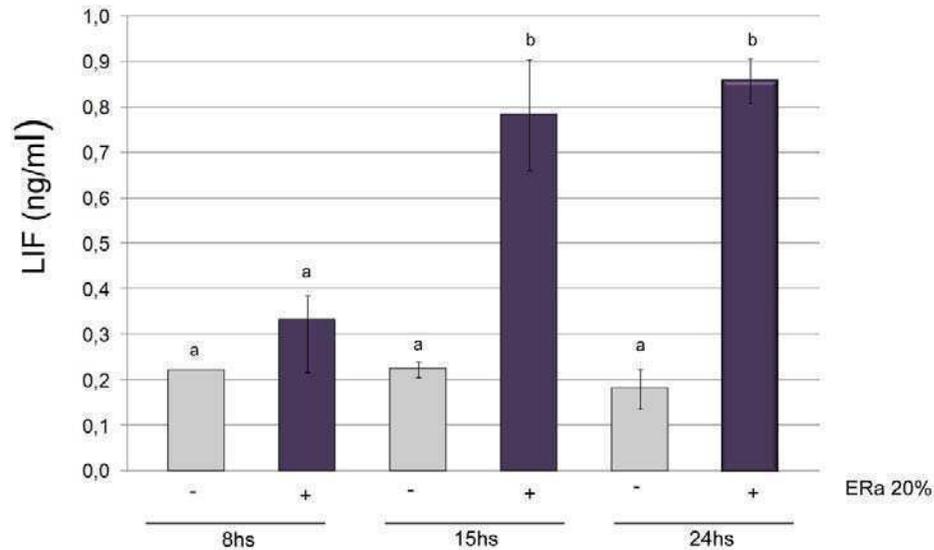
#### **2.2.4 El estrés mecánico induce la expresión y secreción de LIF.**

La fase temprana de la involución post-lactancia, se caracteriza por la expresión de factores locales que inducen la apoptosis del epitelio secretorio. Como se ha mencionado en la Introducción, la expresión de estos factores locales (LIF, IL-6 y TNF $\alpha$ ) es independiente de los niveles de hormonas lactogénicas circulantes por lo que se cree que es el estrés mecánico, producido por la acumulación de leche en los alveolos, el estímulo inicial que dispara su expresión y secreción (Chapman et al., 1999). Dado que el LIF es el principal activador fisiológico de STAT3 en la glándula mamaria, decidimos explorar si el estrés mecánico es capaz de regular la expresión de esta citoquina en células epiteliales mamarias. Para ello, a través de ensayos de RT-PCR en tiempo real, analizamos los niveles de ARNm de LIF de luego de aplicar 20% de ERa por diferentes tiempo (0-3 horas). Los resultados indican que un 20% de ERa durante 1 hora, induce un aumento significativo en los niveles de mensajero de esta citoquina con respecto a los valores de control. El aumento de la expresión del ARNm de *lif* no mostró una clara tendencia a las 3 horas de aplicado el estímulo (**Figura 33**).



**Figura 33. Efectos del estrés mecánico sobre los niveles de ARNm de *lif*.** Se analizaron los niveles del ARNm de *lif* por RT-PCR cuantitativa en tiempo real en células HC11 sometidas a un ERA sostenido del 20% durante los tiempos indicados (0-3 horas). Se utilizó *actina* para normalizar los datos. Las barras representan veces de inducción con respecto a la condición experimental control. Los datos se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. a y b son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos.

En vista de los resultados obtenidos en la RT-PCR en tiempo real, decidimos estudiar si este aumento en los niveles de mensajero de *lif* se traducían en un aumento en los niveles de la proteína. A través de un ensayo de ELISA, analizamos los niveles de LIF presentes en los medios condicionados de células a las cuales se les aplicó el estímulo mecánico. Los medios condicionados de células HC11, a las cuales se les aplicó un ERA del 20% durante 0-24 horas, fueron colectados y en ellos se midieron los niveles de LIF. En los medios condicionados de células estiradas durante 8 horas, los niveles de LIF tienden a incrementarse ( $0,33 \pm 0,12 \text{ ng/ml}$ ) comparados con su control ( $0,22 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$ ) y ya a las 15 horas de aplicado el estímulo, las diferencias son significativas con respecto al control ( $0,78 \pm 0,12 \text{ ng/ml}$  vs  $0,22 \pm 0,02 \text{ ng/ml}$ ). Estos elevados niveles de secreción de LIF por parte de las células estiradas se siguen observando a las 24 horas ( $0,86 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$  vs  $0,18 \pm 0,04 \text{ ng/ml}$ ) (**Figura 34**).

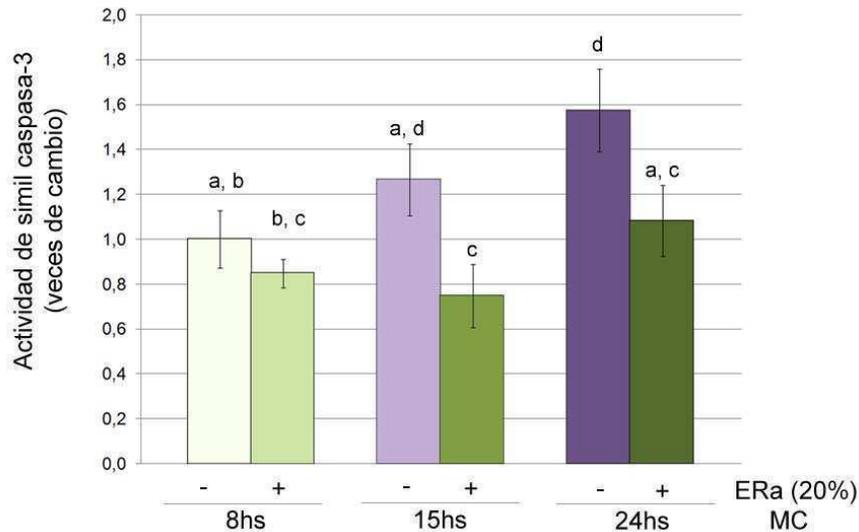


**Figura 34. Efectos del estrés mecánico sobre los niveles de secreción de LIF.** Por medio de un ELISA se cuantificaron los niveles de LIF en los medios condicionados (MCs) de células a las cuales se les aplicó o no un ERA del 20% durante los tiempos indicados (8-24 horas). Los niveles de LIF se encuentran expresados en ng/ml y representan las medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. a y b indican diferencias significativas entre sí ( $p < 0,05$ ), si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos.

### 2.2.5 El estrés mecánico es un estímulo protector en células epiteliales mamarias.

Con el propósito de evaluar el efecto biológico del estrés mecánico sobre las células epiteliales mamarias, decidimos analizar el efecto que tiene este estímulo sobre la actividad de caspasas efectoras de apoptosis. Para determinar la actividad *simil-caspasa-3* realizamos un ensayo colorimétrico utilizando el sustrato incoloro Ac-DEVDpNA, el cual, al ser proteolizado por las caspasas efectoras 3, 6 ó 7, libera el producto pNA que absorbe a 405nm. Cuando expusimos las células epiteliales mamarias a un ERA del 20% durante 8, 15 y 24 horas, observamos por un lado, que el tiempo de incubación en ausencia de suero produjo, *per se*, un aumento significativo de los niveles de actividad *simil-caspasa-3* ( $1,26 \pm 0,16$  veces de cambio para las 15 horas y  $1,57 \pm 0,17$  veces de cambio para las 24 horas con respecto al control de las 8 horas). Por otro lado encontramos que el estiramiento disminuyó significativamente la actividad de *simil caspasa 3* en aquellas células que recibieron

el estímulo mecánico durante 15 y 24 horas ( $1,26 \pm 0,16$  vs  $0,66 \pm 0,14$  control y estiradas de 15 horas y  $1,57 \pm 0,17$  vs  $1,08 \pm 0,19$  control y estiradas para 24 horas) (**Figura 33**).



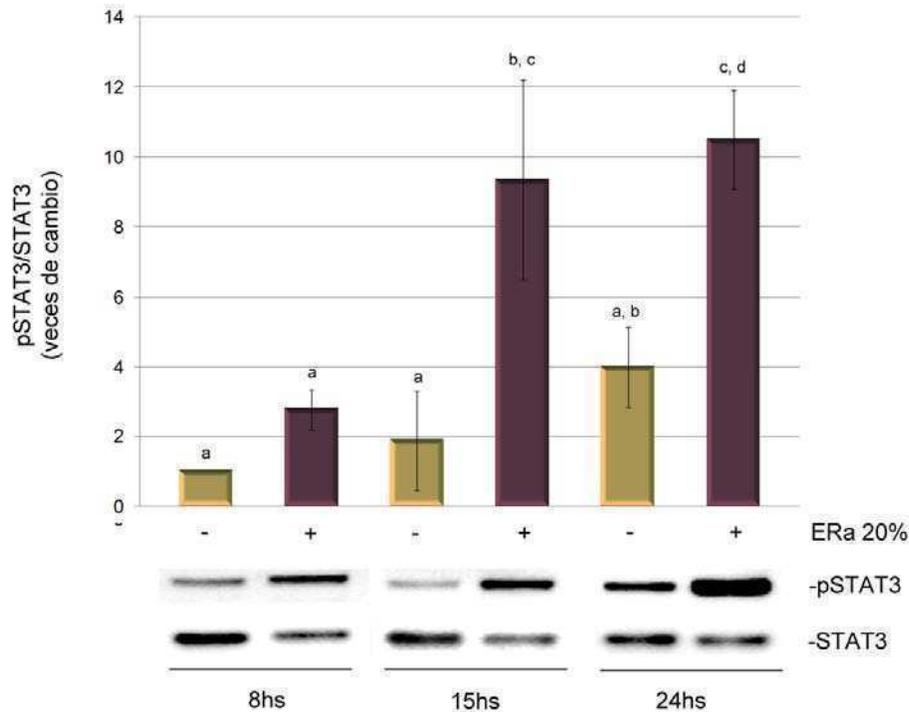
**Figura 35. Efecto del estrés mecánico sobre la activación de caspasas efectoras.** La actividad *símil*-caspasa 3 fue determinada a partir de un extracto proteico obtenido de células HC11 expuestas o no a un ERa del 20% durante los tiempos indicados. El ensayo consistió en determinar por duplicado la proteólisis del sustrato Ac-DEVDpNA luego de 4hs de incubación con las muestras proteicas. La actividad específica fue calculada como Absorbancia a 405 nm/mg de proteínas bajo condiciones de incubación estándar. Las barras representan veces de cambio con respecto a la condición experimental control de estiramiento durante 8hs y se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 4 experimentos independientes. En todos los casos, los tratamientos con letras distintas (a, b, c y d) muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos.

### 2.2.6 El LIF presente en el medio condicionado por células epiteliales mamarias expuestas a estrés mecánico induce la fosforilación de STAT3 en células epiteliales mamarias en reposo.

Previamente habíamos visto que el estrés mecánico es capaz de inducir 2 picos de fosforilación de STAT3 en células epiteliales mamarias (**Figura 32**). Un pico temprano, a los 15 minutos de aplicado el estímulo y un segundo pico tardío luego de 6 horas de aplicación continua de estrés mecánico. Por otro lado, los niveles de

LIF presentes en los medios condicionados de células estiradas entre 0 y 3 horas resultaron similares a los valores del control mientras que se observó un aumento de los niveles de secreción de LIF a las 8 horas de aplicado el estímulo mecánico (**Figura 32**). Entonces, nos preguntamos si los factores secretados por las células epiteliales mamarias expuestas al estímulo mecánico (entre los cuales se encontraría LIF), podrían ser los responsables de producir la segunda oleada de fosforilación de STAT3 en célula estiradas y además, si éstos podrían llegar a ejercer un efecto paracrino sobre células epiteliales mamarias que no hubiesen estado sujetas a estrés mecánico.

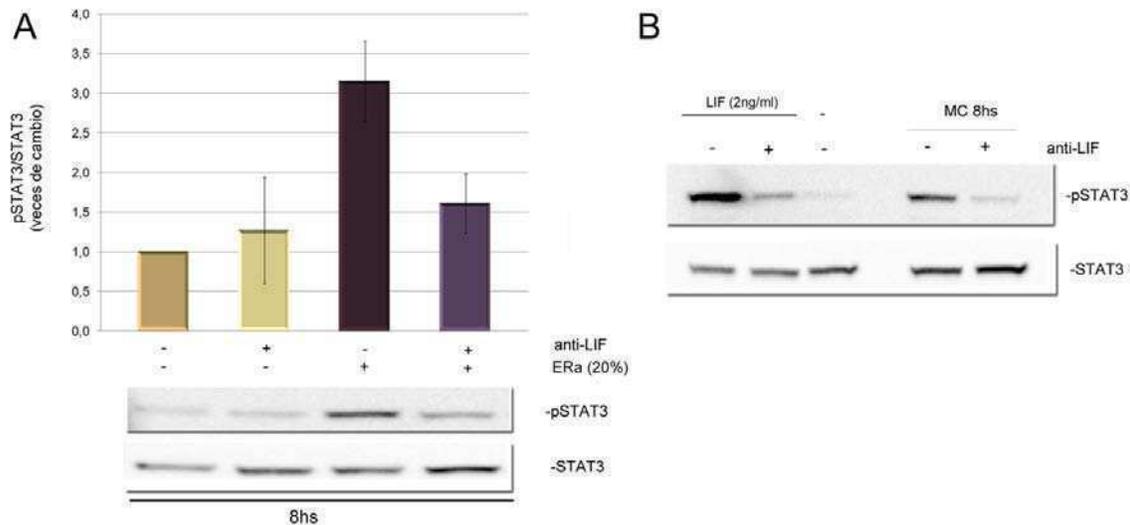
Como primer paso decidimos analizar el efecto que tiene el medio condicionado de células epiteliales mamarias expuestas al estímulo mecánico sobre los niveles de fosforilación de STAT3 en células que no habían sido estiradas (células receptoras). Para ello, colectamos los medios condicionados de células HC11 que fueron montadas en los dispositivos y a las cuales les aplicamos o no un ERa del 20% durante los tiempos indicados (8-24 horas). Luego utilizamos estos MCs para tratar durante 15 minutos a células HC11 receptoras. Las cosechamos y analizamos los niveles de fosforilación de STAT3 por western blot (**Figura 36**). Los resultados obtenidos indican que los MCs de células estiradas un 20% inducen un aumento en la fosforilación de STAT3 en células HC11 receptoras. En la Figura 36 observamos que el MC de células estiradas durante 8 horas induce un aumento de los niveles de fosforilación de STAT3 en células receptoras y que este aumento se vuelve significativo cuando estas células son tratadas con MCs de células estiradas por 15 y 24 horas.



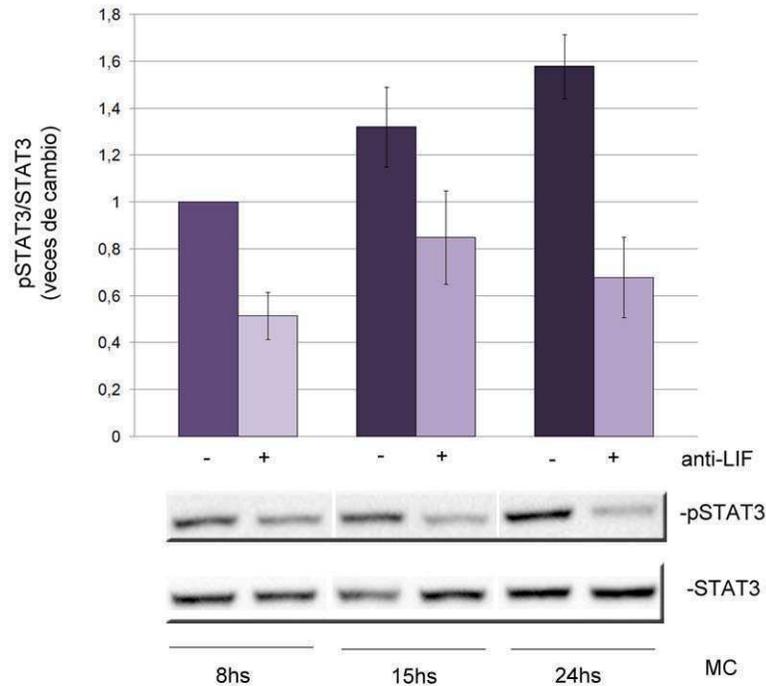
**Figura 36. Efecto los medios condicionados (MC) de células expuestas a estrés mecánico sobre los niveles de fosforilación de STAT3 de HC11 en reposo.** Se analizaron por western blot los niveles de fosforilación de STAT3 en células HC11 que fueron tratadas durante 15 minutos con MC por células expuestas o no a un 20% de ERa durante los tiempos indicados (8-24 horas). Los niveles de pSTAT3 fueron normalizados con los niveles totales de STAT3. Las barras representan veces de inducción al relativizar los niveles de activación de STAT3 en cada caso con la condición experimental control de 8hs sin estirar y se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. En todos los casos, las barras con letras distintas (a, b, c y d) indican que los resultados fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes entre los tratamientos indicados. Si al menos una letra es compartida entonces no se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas entre ellos. La fotografía corresponde a un western blot representativo.

Previamente encontramos que LIF está presente en los MCs por células epiteliales mamarias estiradas (**Figura 34**). Con el objetivo de evaluar si esta citoquina participa de la activación/fosforilación de STAT3 de células HC11 en reposo tratada con MCs, pre-incubamos o no los medios con un anticuerpo bloqueante de LIF. Para ello incubamos los MCs de células HC11 expuestas a un 20% de ERa durante 8 horas con 0.8 $\mu$ g/ml de anticuerpo bloqueante de LIF durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, tratamos a las células HC11

receptoras durante 15 minutos con estos MCs y luego extrajimos proteínas y analizamos los niveles de pSTAT3 por western blot. Los resultados muestran que el tratamiento con el anticuerpo anti LIF fue capaz de bloquear en un 80% el aumento de pSTAT3 generado por el MC de células mamarias estiradas en células HC11 receptoras (**Figura 37A**). En la Figura 35 se comparan los niveles de fosforilación de STAT3 inducidos por el MC proveniente de células estiradas durante 8 horas o por LIF recombinante (2ng/ml) y el efecto de un anticuerpo bloqueante de LIF en cada caso (**Figura 37B**). Luego repetimos el análisis, utilizando MCs por células estiradas por diferentes tiempos (8, 15 y 24 horas). Observamos que en todos los casos el anticuerpo bloqueante inhibió el aumento de los niveles de pSTAT3 inducido por los MCs de células expuestas a un estrés mecánico (**Figura 38**).



**Figura 37. Efecto de un anticuerpo bloqueante de LIF sobre los niveles de fosforilación de STAT3 inducidos por MC de células expuestas a estrés mecánico.** Se analizaron por western blot los niveles de fosforilación de STAT3 en células HC11 receptoras tratadas durante 15 minutos con MCs provenientes de células HC11 expuestas o no a un 20% de ERa durante 8 horas en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante de LIF (0,8µg/ml) (**A y B**). En (**B**) se comparan los niveles de activación de pSTAT3 inducidos por el MC de 8 horas con aquellos inducidos por 2ng/ml de LIF recombinante. En (**A**), los niveles de pSTAT3 fueron normalizados contra los niveles totales de STAT3. Las barras representan veces de inducción al relativizar los niveles de activación de STAT3 en cada caso con la condición control de células tratadas con medio condicionado de HC11 no estiradas y se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 2 experimentos independientes. La fotografía, corresponde a un ensayo de western blot representativo.



**Figura 38. Efecto de un anticuerpo bloqueante de LIF sobre los niveles de fosforilación de STAT3 inducidos por MC de células expuestas a estrés mecánico.** Se analizaron por western blot los niveles de fosforilación de STAT3 en células HC11 receptoras tratadas durante 15 minutos con MCs por células expuestas o no a un 20% de ERe durante 8, 15 y 24 horas en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante de LIF (0,8µg/ml). Los niveles de pSTAT3 fueron normalizados con los niveles totales de STAT3. Las barras representan las veces de inducción al relativizar los niveles de activación de STAT3 en cada caso con el tratamiento de MC de células estiradas por 8 horas y se encuentran expresados como medias  $\pm$  DE de 2 experimentos independientes. La fotografía corresponde a un ensayo de western blot representativo.

**Sección 2.2.** Utilizando el dispositivo que diseñamos y construimos, observamos que el estrés mecánico regula positivamente la expresión del mensajero y la proteína de *c-fos*, induce la fosforilación de ERK 1/2 y JNK y modula negativamente los niveles de pAKT en células epiteliales mamarias en cultivo. Encontramos también que el estrés mecánico induce el aumento de la expresión y secreción de LIF así como también el aumento de la fosforilación de STAT3 en estas mismas células. Por otro lado observamos que el estrés mecánico inhibe el aumento de los niveles de actividad de *simil* caspasa-3 inducida por el tiempo de cultivo en medio sin suero. Finalmente observamos que el MC de células estiradas induce un aumento en los niveles de pSTAT3 en células epiteliales mamarias en reposo, efecto que fue bloqueado en presencia de un anticuerpo bloqueante de LIF.

**En resumen los resultados presentados en este capítulo indican que:**

- 4) Diseñamos, construimos y validamos un dispositivo económico y práctico, que permite el estudio del estrés mecánico en células creciendo en cultivo.
- 5) EL estrés mecánico es capaz de inducir la expresión y secreción de la citoquina LIF en células epiteliales mamarias en cultivo sugiriendo que éste podría ser un estímulo relevante para la secreción de esta citoquina *in vivo*.
- 6) El estrés mecánico funcionó como estímulo protector en células epiteliales mamarias en cultivo al menos hasta las 24 horas de estiramiento.
- 7) El estrés mecánico es capaz de inducir la expresión y secreción de la citoquina LIF en células epiteliales mamarias en cultivo y sugieren que éste podría ser un estímulo relevante para la secreción de esta citoquina *in vivo*.
- 8) Estos resultado indican que el LIF secretado por las células epiteliales mamarias expuestas a estrés mecánico, actúa de manera parácrina induciendo la fosforilación de STAT3 en células epiteliales mamarias en reposo.

## DISCUSION

### Capítulo 1

#### 1. El rol LIF en tumores mamarios murinos

##### 1.1 ¿Quién activa a STAT3 en los tumores mamarios?

En los últimos años, una gran cantidad de trabajos demostraron que STAT3 se encuentra activo de manera persistente en varios tipos tumorales (Frank, 2007). En el cáncer de mama, más del 50% de los tumores primarios, sus cultivos y varias líneas celulares derivadas tiene altos niveles de activación de STAT3, lo cual es llamativo dado su rol inductor de muerte en la glándula mamaria normal. A partir de estos datos se plantean dos interrogantes fundamentales en cuanto a la activación de este factor de transcripción en tumores mamarios: 1) A qué se deben los altos niveles hallados y 2) qué consecuencias tiene para la biología de este tipo de cáncer. Los resultados presentados en esta Tesis intentan esclarecer, al menos parcialmente, estas cuestiones.

STAT3 presenta diversos mecanismos de activación en los diferentes tejidos, involucrando factores de crecimiento, citoquinas y la activación de diversas tirosina quinasas. A pesar de la redundancia que existe en las actividades de estas proteínas, en determinados mielomas y líneas tumorales de próstata se identificó a IL-6 como la principal citoquina inductora de la activación de STAT3 (Catlett-Falcone et al., 1999; Mora et al., 2002). En el caso de la glándula mamaria normal, se encontró que tanto la expresión de IL-6 como de LIF son inducidas durante la involución mamaria (Zhao et al., 2004). Sin embargo, nuestro grupo y el de Watson, de manera independiente, demostramos que la marcada activación de STAT3 que se produce en esta etapa y que induce la muerte por apoptosis del epitelio secretorio, es producida principalmente por LIF (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003).

En lo que respecta a su expresión en la mama tumoral, LIF ha sido detectado en cáncer de mama humano, tanto en tumores primarios (Dhingra et al., 1998) como en varias líneas celulares establecidas (MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-435 y MCF-7) (Dhingra et al., 1998; Estrov et al., 1995; Kellokumpu-Lehtinen et al., 1996). En un estudio realizado por el grupo de Estrov, se encontró que la expresión de LIF

y LIFR en tumores mamarios se asociaba con la conservación de la diploidía y una baja proporción de células en fase S. En particular, la expresión de LIFR se correlacionó positivamente con la presencia del receptor de estrógenos (ER). Por lo tanto, en base a estos resultados, los autores propusieron que los tumores que expresan LIF y su receptor tienen un fenotipo más cercano al normal y por lo tanto menos agresivo. Sin embargo, también hallaron que los cultivos primarios derivados de estos mismos tumores mostraron un aumento en la capacidad de formar colonias en agar blando, al ser tratadas con LIF exógeno. Además, en varias líneas tumorales de mama dependientes (como MCF-7 y T47D, que no expresan LIF) o independientes (SK-BR3 y BT20) de estrógeno, y en cultivos primarios de carcinomas mamarios, el tratamiento con LIF indujo la proliferación celular (Estrov et al., 1995; Kellokumpu-Lehtinen et al., 1996). Estas observaciones plantean un complejo rol para LIF y su receptor, en la regulación del desarrollo tumoral.

Con respecto al rol de STAT3 en los tumores mamarios es importante destacar que actualmente se lo considera un oncogen. Por ejemplo, la expresión de una forma constitutivamente activa de STAT3 (STAT3C) no sólo induce la transformación de células fibroblásticas (Bromberg et al., 1999) sino también de líneas células mamarias no tumorales como MCF-10 y líneas derivadas de mamoplastías (Dechow et al., 2004). En células tumorales MDA-MB 468 que expresan bajos niveles de pSTAT3 la expresión de STAT3C, aumenta su capacidad de formar colonias en agar blando. Siguiendo el mismo comportamiento, el uso de diferentes inhibidores farmacológicos de STAT3, así como dominantes negativos o ARN de interferencia, en líneas celulares con altos niveles de activación de STAT3 (MDA-MB 231, MDA-MB 435, 4T1) aumenta la muerte por apoptosis de células en cultivo y disminuye la tumorigénesis, el crecimiento tumoral y la angiogénesis en modelos xenogénicos (Garcia et al., 2001; Siddiquee et al., 2007). A pesar de los antecedentes mencionados, el análisis de los niveles de pSTAT3 en micro-arreglos de tejidos representando a 350 especímenes de tumores mamarios (nódulos linfáticos negativos), dio como resultado que la marcación nuclear para pSTAT3 en el 43.5% correlacionaba positivamente con una mejor supervivencia a 5 y 20 años (Dolled-Filhart et al., 2003).

En este trabajo, utilizamos dos modelos de tumores mamarios murinos. El primero corresponde a adenocarcinomas que se surgen por la infección del virus de

MMTV (LA). Estos tumores aparecen durante la preñez y, eventualmente, durante los sucesivos pasajes pierden la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona (ER-PR-) y son capaces de crecer independientemente del estado hormonal de la hembra. Estos tumores presentan, a nivel histológico, una morfología moderadamente diferenciada con áreas papilares quísticas (ver Figura 12). En trabajos anteriores mostramos que los mismos están compuestos de células epiteliales redondeadas capaces de formar estructuras glandulares que secretan  $\beta$ caseína (Gattelli et al., 2004) y (Gattelli 2007, Tesis Doctoral). Además, ninguna de las líneas tumorales surgidas de estas neoplasias resultó ser metastatizante. El segundo modelo, corresponde a los tumores LM3-t surgidos a partir de la inoculación de células LM3 (que no expresan niveles detectables de LIFR) y que corresponden a adenocarcinomas pobremente diferenciados (ER-PR-) y altamente invasivos que conservan la capacidad de metastatizar al pulmón (Urtreger et al., 1997). Los resultados obtenidos al trabajar con ambos tipos de tumores muestran una correlación positiva entre la expresión de LIFR y los niveles de activación de STAT3 y coinciden con las observaciones hechas en neoplasias mamarias humanas que asocian la activación de esta vía de señalización y un fenotipo tumoral menos agresivo (Dhingra et al., 1998). Otro trabajo más reciente en el cual se realizaron inmunohistoquímicas de 142 tumores primarios de mama refuerza esta asociación, ya que se encontró una asociación positiva y significativa entre los niveles de pSTAT3 y la expresión de TIMP1 (potente inhibidor de las metalo-proteasas de tejido MMP2 y MMP9) cuya expresión en tumores mamarios es reconocida como un factor pronóstico favorable (Nakopoulou et al., 2003; Subramaniam and Isaacs, 2005). Además, la activación de STAT3 se correlacionó significativamente con una menor frecuencia de invasión vascular y linfática, dos factores independientes de mal pronóstico (Dien et al., 2006; Subramaniam and Isaacs, 2005). Por lo tanto, tomando en cuenta el conjunto de estas observaciones, podría señalarse que, en determinados casos, los modelos experimentales murinos pueden ser mejores herramientas para reproducir determinados aspectos de la biología tumoral que las líneas de células tumorales humanas.

## 1.2 LIF activa a STAT3 en tumores mamarios

A pesar de que STAT3 se encuentre activado en una gran variedad de tumores, no se conocen mutaciones en el gen de STAT3 que ocurran de manera natural y que induzcan su activación constitutiva. Como alternativa, se propone que la activación persistente de STAT3 encontrada en tumores primarios, líneas tumorales y células transformadas con oncogenes depende de la activación de receptores de factores de crecimiento con actividad de tirosina quinasa, o por la desregulación la actividad de tirosina-quinazas como JAK o Src que llevan a la activación de dicho factor de transcripción (Bromberg, 2002). Los resultados presentados en este trabajo sugieren que en los tumores mamarios murinos más diferenciados, la activación constitutiva de STAT3 depende principalmente de la sobreexpresión de LIF (ver Figura 17 y 18) y que los mecanismos de regulación negativa no se encuentran alterados en estas células tumorales. Por ejemplo, la cinética de activación de los cultivos primarios de tumores inducidos por MMTV fue similar a la de células epiteliales normales HC11 (ver Figura 15).

Los ensayos de tinción con cristal violeta mostrados en esta Tesis (ver Figura 21) indican que el tratamiento con LIF induce diferentes respuestas biológicas en células no tumorigénicas y tumorigénicas, inhibiendo o induciendo la supervivencia, respectivamente. Sin embargo, a pesar de que los experimentos indican de que el LIF secretado por estas células es la principal citoquina inductora de la activación de STAT3 (Figura 17 y 18) en células normales y tumorales, el bloqueo de la actividad de este factor de transcripción aumentó la supervivencia celular (Figura 22). Esto sugiere que en tumores mamarios moderadamente o bien diferenciados, el LIF podría preservar el rol biológico pro-apoptótico que cumple en células mamarias no-tumorigénicas. En este sentido, y de manera opuesta a lo reportado en la línea mamaria tumoral MDA-MB 231, donde la activación de STAT3 induce la expresión de Bcl-XL (Kotha et al., 2006), resultados preliminares realizados en nuestro laboratorio con cultivos primarios de tumores MMTV indican que ni el tratamiento con LIF ni con los MCs induce la modulación de la expresión de esta proteína anti-apoptótica (datos no mostrados). Sin embargo, en los cultivos primarios tumorales, observamos que este tratamiento aumenta la expresión de los niveles de c-EBP/δ (Figura 18), un regulador maestro de genes pro-apoptóticos (p53, IGFBP5, SGP2 y BAK) durante la involución (Thangaraju et al., 2005).

La activación de STAT3 es esencial para el inicio del proceso de involución mamaria que involucra la muerte del epitelio secretorio y el remodelado tisular que ocurre durante esta etapa. Paradójicamente STAT3 se encuentra persistentemente activo en los tumores mamarios. A raíz de esto surgen dos preguntas: 1) ¿cómo escapan las células tumorales a las señales de muerte de STAT3? y 2) ¿qué programas genéticos regulados por STAT3 podrían favorecer al desarrollo tumoral?

### **1.3 ¿Cómo escapan las células tumorales a las señales de muerte de STAT3?**

Hace varios años, el grupo de Anderson descubrió que la expresión condicional de una forma constitutivamente activa de AKT suprime la apoptosis del epitelio secretorio que se produce durante la involución mamaria (Schwertfeger et al., 2001), lo que sugiere que pAKT es capaz de proveer una señal de supervivencia dominante. En un trabajo más reciente, el grupo de Watson demostró que STAT3 durante la involución mamaria induce la expresión de las subunidades regulatorias negativa de PI3K (p55 $\alpha$  y p50 $\alpha$ ), mecanismo que resulta en una disminución de los niveles de fosforilación de AKT y permite la muerte por apoptosis de las células mamarias (Abell et al., 2005). La vía de PI3K/AKT se encuentra activada en el cáncer mamario y muchos otros tipos tumorales. Sin embargo, un trabajo reciente reporta que en muestras de tumores mamarios analizadas por micro-arreglo de tejidos no encuentran diferencias significativas entre la activación de esta vía y características malignas del tumor (Bose et al., 2006). En base a estos antecedentes proponemos que en algunos tumores mamarios, como los inducidos por MMTV, STAT3 mantendría la capacidad de inhibir la vía de supervivencia mediada por PI3K/AKT. Sin embargo estas células tumorales podrían ser más sensibles a la activación de otras vías de supervivencia o proliferación, haciendo que el bloqueo de la cascada PI3K/AKT sea incapaz de impedir el crecimiento tumoral. Esto puede ejemplificarse con los resultados aquí presentados que demuestran cuánto más sensibles son las células tumorales, en comparación con las no tumorales, a la inhibición de la actividad de MEK (Figura 22). Estas observaciones respaldan la hipótesis de que LIF en células normales y tumorales puede activar simultáneamente vías de muerte y supervivencia, cuyo balance resultaría completamente diferente según la sensibilidad de cada tipo celular a la activación de estas cascadas.

#### 1.4 ¿Qué programas genéticos regula STAT3 que favorecen el desarrollo tumoral?

El factor de transcripción STAT3 fue originalmente nombrado APRF, siglas de su nombre en inglés *acute phase response factor* (factor de respuesta de fase aguda) ya que regula la expresión de genes involucrados en una serie de reacciones inflamatorias que ocurren en respuesta a la infección o daño de un tejido, denominada respuesta de fase aguda (Kushner I and A., 1993). En la glándula mamaria, al analizar la identidad y el curso temporal de la expresión de genes que ocurre durante la involución mamaria, utilizando micro-arreglos de oligonucleótidos de ADN, encontraron que de aquellos genes que se regulan durante la primera fase de la involución (la primeras 48 horas), una gran mayoría pertenecen a genes involucrados en inflamación y respuesta de fase aguda (RFA). Por otro lado, durante la fase irreversible (a partir de las 72 horas), se produce la expresión de un grupo diferente de genes aunque también involucrados en la RFA. Estos resultados indican un rol localizado, no sistémico, para un amplio grupo de proteínas de la RFA lo cual sugiere además la participación de STAT3 como mediador en la reparación y el remodelado del tejido mamario. Muchos de estos genes, regulados por STAT3 en otros tejidos median respuestas pro- y anti-inflamatorias.

En la mama, durante la involución, aumenta la expresión de citoquinas pro-inflamatorias de la familia de IL-6, lo que inducen al factor de transcripción EBP/  $\delta$ , el cual además de tener un rol pro-apotótico, regula la expresión de genes anti-inflamatorios (Clarkson et al., 2004; Stein et al., 2004). Se vio además que STAT3 regula la expresión de  $\alpha$ 2-macroglobulina, que inhibe la acción de metalo-proteasas (Clarkson et al., 2004; Stein et al., 2004). Por lo tanto, durante la involución mamaria se produce un balance entre factores pro y anti-inflamatorios para evitar que durante este período ocurra una inflamación persistente. Este balance parecería alterarse en ausencia de STAT3 ya que se observaron frecuentes mastitis e infiltrado celular en las mamas de ratones *knockout* para STAT3 (Chapman et al., 1999).

Es sabido que STAT3 es capaz de inducir la transcripción de diferentes grupos de genes en distintos tejidos. Por ejemplo, en células epiteliales mamarias dispara la expresión de genes involucrados en respuestas anti-inflamatorias e inflamatorias y promueve la apoptosis, mientras que el mismo factor induce la supervivencia en células T, en cardiomiocitos y en varios tipos tumorales. Esta

multiplicidad de funciones, podría estar dada por la combinación específica de señales que inducen la activación de STAT3 en cada tejido, lo que incluye citoquinas (familia de IL-6, IL-10, IFN), factores de crecimiento (EGF, PDGF, prolactina) y oncogenes (v-src). Por otro lado, la actividad de este factor de transcripción estará modulada también por las cascadas de señales específicas que se activan según los receptores disponibles así como por el repertorio de co-activadores y co-represores presentes en cada tipo celular. En tumores, debido a que la activación de STAT3 parecería ocurrir río debajo de una combinación de citoquinas, factores de crecimiento y oncogenes asociados al fenotipo neoplásico, es muy probable que en conjunto, estos factores determinen que STAT3 induzca la transcripción de un grupo de genes diferentes a los que modula en el tejido normal. De hecho, un trabajo reciente analiza los sitios de unión al ADN de STAT3, con una nueva estrategia bioinformática, y propone que este factor de transcripción podría unirse *in vivo*, a diferentes sitios, según el tipo celular y las condiciones a las cuales la célula está expuesta (Vallania et al., 2009). Además, este grupo observó la activación de un grupo específico de genes en células epiteliales mamarias que expresan niveles fisiológicos de la mutante constitutivamente activa de STAT3 (STAT3C) (Pensa y Poli, datos sin publicar).

Finalmente, otro punto interesante que da cuenta de la compleja respuesta celular a la activación de STAT3, se relaciona con el modo en que este factor de transcripción se activa. Esta activación, en condiciones normales, es generalmente alta y limitada en el tiempo, pero es menos intensa y continua en tumores de diversos orígenes (Pensa et al., 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran que en los cultivos primarios de tumores inducidos por MMTV, la fosforilación de STAT3, debida a LIF, presenta una intensidad y cinética muy parecida a la observada en células no-tumorales (Figura 15). Concordantemente, STAT3 parece tener un rol pro-apoptótico similar al que tiene en la mama normal, ya que observamos un aumento de los niveles de expresión de c/EBP $\delta$ , factor de transcripción de genes pro-apoptóticos y una disminución de la viabilidad celular (Figura 18 y 22). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que en tumores más diferenciados, la activación de STAT3 podría continuar regulando la expresión de genes pro-apoptóticos.

### **1.5 STAT 3, el micro-entorno y el sistema inmune**

Para comprender el complejo rol que tiene STAT3 en el desarrollo tumoral tenemos que considerar que la activación de STAT3 ocurre en diferentes tipos celulares que interaccionan estrechamente entre sí y los cuales se encuentran todos involucrados en el desarrollo y la progresión tumoral. Estos son las células cancerosas que, en el caso de los tumores mamarios son, las células tumorales mamarias de origen epitelial y el micro-entorno donde se desarrolla el tumor que comprende tanto a células del estroma, fundamentalmente fibroblastos y adipocitos, como células linfoides que eventualmente puede reconocer y destruir a las células tumorales o volverse tolerante y permitir su crecimiento.

La reacción inflamatoria exacerbada que se observa en las células epiteliales intestinales en ratones deficientes en STAT3 se contrapone a un gran número de estudios que muestran la importancia de IL-6 y la activación de STAT3 en enfermedades inflamatorias autoinmunes y en la alergia pulmonar. Esto sugiere que la acción de STAT3 es benéfica cuando la estimulación es aguda y su actividad contribuye a resolver la respuesta inflamatoria pero que puede ejercer un efecto nocivo cuando su estimulación se produce de forma crónica como durante el desarrollo del cáncer de mama. En ese caso STAT3 puede inducir la expresión de citoquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos en las células del sistema inmune del micro-entorno tumoral. Estos, al ser secretados, pueden interactuar con sus respectivos receptores activando el mismo factor de transcripción en las células blanco y de esta manera establecer una retroalimentación positiva con el micro-entorno tumoral.

### **1.6 Inhibidores de STAT3 como terapia anti-tumoral**

Los resultados presentados en este trabajo aportan evidencia acerca del complejo rol que tiene la activación de STAT3 en los tumores mamarios. Observamos que en tumores moderadamente diferenciados la activación de STAT3, por parte de LIF, parece inducir la expresión de un programa génico similar al que dispara durante la fase reversible de la involución mamaria, durante la cual el programa apoptótico se pone en marcha. Esto podría explicar por qué en algunos

tumores mamarios los niveles de expresión de STAT3 se correlacionan significativamente con altos niveles de TIMP-1 y, en nuestro modelo podría ser la razón de la bajísima incidencia de metástasis observada en los animales portadores de tumores inducidos por MMTV. Por otro lado, resultados preliminares del laboratorio indican que los niveles de pSTAT5 en estos tumores también son altos, lo que concuerda con observaciones previas del laboratorio que indican que estos adenocarcinomas expresan  $\beta$ -caseína (un gen regulado por pSTAT5) (Gattelli et al., 2004). En el cáncer de mama, otros autores han reportado que STAT5 se encuentra activo en tumores mamarios y que su actividad se va perdiendo a medida que progresa la enfermedad resultando, por lo tanto, un marcador de buen pronóstico. (Nevalainen et al., 2004; Sultan et al., 2005). Por otro lado, en tumores de próstata altos niveles de pSTAT5 correlacionan con una cáncer de mayor grado (Li et al., 2005a), trayendo de nuevo a colación, la importancia del contexto celular en la activación del programa genético asociado a otro miembro de la familia STAT. Volviendo a la glándula mamaria, es interesante recordar que el programa que dispara STAT3 al iniciarse la involución mamaria se produce en un contexto celular donde los niveles de STAT5 aún son altos, marcando otro correlato entre el contexto celular de los tumores inducidos por MMTV(LA) y la primera fase de involución post-lactancia (grupo de genes inducidos primeras 12 horas) (Desrivieres et al., 2006). La actividad de STAT3 y el tipo de genes regulados podría ser diferente en tumores más agresivos con bajos niveles de expresión y/o activación de STAT5, correspondiendo a la puesta en marcha de un programa genético más parecido al que se activa al iniciarse la segunda fase de la involución mamaria, donde aumenta el componente celular inflamatorio y la expresión de genes involucrados en el remodelado tisular. Es por ello que pensamos que es muy importante tener en cuenta la fuerte dependencia que tiene la actividad de este factor de transcripción con respecto al contexto celular al momento de diseñar estrategias terapéuticas que impliquen el bloqueo su actividad.

### **1.7 Una actualización sobre los roles de los STATs**

Algunos de los paradigmas acerca del mecanismo de señalización citoquina/STATs están siendo revisados. El primer paradigma que ha cambiado es

aquel que afirma que las moléculas de STATs “inactivas”, se encuentran en el citoplasma y sólo dimerizan al ser fosforiladas en tirosina. Esta ha sido modificado por lo siguiente: Los STATs en el citoplasma existen como dímeros y formando parte de complejos de alto peso molecular denominados “STATosomas”. El segundo paradigma que se ha modificado es aquel que dice que se necesita que los STATs sean fosforilados en tirosina, o serina o ambos para que estos factores puedan regular la transcripción génica. El hecho que se hayan encontrado STATs sin fosforilar regulando la expresión de genes y que estas formas desfosforiladas tengan blancos diferentes a los que regula el mismo STAT3 fosforilado es particularmente interesante, sobre todo porque esta actividad se descubrió en células tumorales mamarias (Yang et al., 2005) y existen varios estudios que reportan no sólo altos niveles de pSTAT3 sino también de la de la proteína sin fosforilar en este tipo tumoral. El tercer paradigma que postula que los STATs, una vez fosforilados en las cercanías de la membrana plasmática, son importados al núcleo ha cambiado al reconocer que moléculas de STATs sin fosforilar, van y vienen del citoplasma al núcleo de manera constitutiva. Por último, el hecho de que se dirijan y secuestren moléculas de STAT3 fosforilado en endosomas de vida larga en el citoplasma indica que es necesario analizar qué tipo de señales transduce esta molécula desde la membrana plasmática hacia membranas blanco en el citoplasma (Sehgal, 2008). No solo eso, sino que también recientemente se ha encontrado a STAT3 regulando la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de células tumorales (Reich, 2009). En conjunto, estas evidencias indican el complejo papel que cumple este factor en una multiplicidad de procesos, lo cual sumado a la susceptibilidad de su actividad a factores del contexto celular y tisular, hace extremadamente complicado prever las consecuencias de su sobre-activación, sobre-expresión o su bloqueo en los distintos tipos celulares.

## Capítulo II

### 2. Las señales mecánicas modulan eventos asociados a la involución en células epiteliales mamarias en cultivo

La involución mamaria se inicia al interrumpirse el amamantamiento. Durante este proceso, que se encuentra regulado por factores locales y es independiente de los niveles de hormonas lactogénicas circulantes, se produce la muerte de la mayor parte del epitelio secretorio. A pesar de que se han caracterizado varios de los factores que intervienen en este proceso y los roles que cada uno cumple, se desconoce aún cuáles son las señales locales que inducen la expresión de estos factores pro-apoptóticos. Se hipotetiza que el estrés mecánico producido por la acumulación de leche en los alvéolos podría ser la señal inicial responsable de disparar la cascada de procesos que llevarán a la muerte del epitelio secretorio.

En este trabajo desarrollamos y validamos un modelo que nos permite evaluar el efecto de aplicar tensión (estiramiento radial, Era) a células epiteliales mamarias creciendo en cultivo. Los estudios aquí presentados se basaron principalmente en los antecedentes reportados en cardiomiocitos, donde se descubrió que tanto el aumento de la sobrecarga hemodinámica *in vivo* como el estrés mecánico aplicado a cardiomiocitos en cultivo induce la expresión de LIF y la activación de la vía JAK/STAT3.

#### 2.1 Desarrollo de un modelo experimental para aplicar estrés mecánico a células creciendo en cultivo

Con el objetivo de dilucidar si el estrés mecánico contribuye al proceso de involución mamaria, diseñamos, construimos y validamos un dispositivo que permite estirar células creciendo sobre un sustrato de silicona (Figura 25 y 26).

Varios laboratorios han desarrollado equipos “artesanales” que utilizan diferentes técnicas para aplicar tensión. Por ejemplo, se han desarrollado dispositivos que utilizan la presión de vacío para estirar un sustrato flexible y aplicar estrés mecánico a las células que crecen sobre él. Este tipo de equipos han sido utilizados por muchos grupos de investigación en diferentes modelos experimentales (Hammerschmidt et al., 2005; Matheson et al., 2006). Sin embargo, estos

dispositivos tienen la desventaja que no son fáciles de construir debido a que es complicado lograr y controlar el vacío. Por otro lado, están los que se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, a través de la empresa Flexcellint (<http://www.flexcellint.com/>) que no sólo tienen un costo bastante alto (U\$S 35.000 aproximadamente), sino que además requieren de asesoramiento especializado para su instalación y un servicio técnico que actualmente no se encuentra en nuestro país.

Otra característica que tienen los sistemas que aplican tensión utilizando diferencias de presiones (Figura 8, panel 1) es que el estímulo resulta heterogéneo (comprometiendo la reproducibilidad) y anisotrópico (varía según la dirección en la cual es examinado), como sucede con el resto de los dispositivos que deforman el sustrato por fuera del plano (Figura 8, panel 2). Otro tipo de dispositivos, son los que han sido diseñados para aplicar tensión en un mismo plano (Figura 8 panel 3) y se caracterizan por deformar el sustrato de manera homogénea e isotrópica. Por último se encuentran aquellos equipos que por tracción en una única dirección permiten estirar el sustrato unidireccionalmente (Figura 8, panel 4).

Por las razones mencionadas, nosotros decidimos no utilizar dispositivos que utilizaran presiones de líquido o vacío para generar el estímulo mecánico y también descartamos aquellos equipos que estiran las células fuera del plano utilizando una platina (Figura 8, panel 2) porque se dificulta la visualización de las células al microscopio y no son fáciles de calibrar. El equipo presentado en este trabajo, fue inspirado en el previamente descrito por Anne Lee (Lee et al., 1996) y se puede ubicar entre aquellos dispositivos que aplican tensión de manera bidireccional (Figura 8, panel 3). La ventaja que tiene nuestro diseño con respecto a su antecesor es que permite aplicar tensiones de hasta un 30%, un rango bastante más amplio que lo permitido por el equipo original (0-10%). La idea de construir un dispositivo que fuese más versátil en cuanto a la intensidad del estímulo aplicado se basa en que hasta el momento se desconoce cuál es el rango de tensión al que están expuestas las células epiteliales mamarias al producirse la acumulación de leche en los alvéolos durante la involución. Los tejidos que más han sido estudiados *in vivo* al respecto son los pulmones y el sistema cardiovascular, donde se vio que los estiramientos a los cuales están expuestos en condiciones fisiológicas y patológicas se encuentran generalmente entre el 5 y el 20 % (Aikawa et al., 2002; Kawamura et

al., 2003; Komuro et al., 1996; Pan et al., 1999; Yamazaki et al., 1993). Teniendo en cuenta que cada tejido (en condiciones fisiológicas como patológicas) tiene propiedades mecánicas particulares (como la rigidez) particulares (Butcher et al., 2009) que le permiten soportar y responder a un amplio rango de tensiones, decidimos diseñar un equipo con la mayor flexibilidad posible al respecto.

En este trabajo presentamos un dispositivo útil para aplicar tensión de manera controlada homogénea y equibiaxial a células creciendo sobre un sustrato deformable como son las membranas de siliconas (Figura 25 y 26). Evaluamos los cambios generados por la tensión aplicada en el área celular y confirmamos, como fue demostrado por Lee y su equipo, que este se transmite eficientemente desde las membranas de silicona cubiertas de colágeno a las células que crecen sobre ella (Figura 26).

La necesidad de dispositivos sencillos y económicamente accesibles, para estudiar el efecto del estrés mecánico sobre diferentes parámetros celulares, se evidencia con la variedad de dispositivos que recientemente se han publicado. Un ejemplo es el que presentaron Rhana y sus colaboradores el año pasado. Este equipo también utiliza el desplazamiento de un émbolo pero en placas de 6 pocillos que poseen un fondo deformable de silicona (Rana et al., 2008). En este trabajo de Tesis presentamos un dispositivo sencillo, que permite registrar a las células antes y después de aplicado el estímulo mecánico y cuyo pequeño tamaño (similar al de una placa de Petri de 6 cm pero con el doble de altura) (Figura 9) permite realizar protocolos de estiramiento a tiempos largos simplemente colocándolo dentro de la estufa de cultivo. Gracias a su reducido costo, y al hecho que puede ser esterilizado por autoclavado, se pueden construir varias unidades factibles de ser utilizadas simultáneamente con diferentes condiciones experimentales (como intensidades y tiempos de estiramientos variables, tratamientos farmacológicos, etc.)

## **2.2 El estrés mecánico induce en células epiteliales mamarias la expresión de genes y cascadas de señales involucrados en la involución.**

Utilizando el dispositivo presentado en este trabajo, analizamos el efecto del estrés mecánico sobre los niveles de expresión de *c-fos* en células epiteliales

mamarias no-tumorales. Los factores de transcripción Ap-1 se encuentran formados por homo o hetero complejos de miembros de la familia de Jun, Fos, Atf y Maf. En numerosos reportes, Ap-1 se ha asociado a una gran variedad de funciones con gran impacto sobre el destino celular (Eferl and Wagner, 2003). Su actividad depende del contexto celular y de la combinación de sus componentes individuales. En el desarrollo mamario post-natal, el bloqueo de Ap-1 produjo una disminución de la proliferación epitelial con un pequeño aumento de la apoptosis (Shen et al., 2006). Durante la involución mamaria, el aumento de la expresión de los miembros de la familia Ap-1 se ha asociado con la muerte celular. Se ha detectado la expresión de los mensajeros de c-Jun, JunB, JunD and c-Fos luego de las 24 horas de involución que alcanza un máximo a las 48 horas (Marti et al., 1994). En particular, se observó el aumento y la activación de la proteína c-Fos cuya expresión fue detectada previamente a la fragmentación del ADN del epitelio secretorio. Esto sugiere que la activación de c-Fos precede a la muerte celular y que su expresión no es una consecuencia de ella.

Los resultados aquí presentados indican que el estiramiento regula positivamente la expresión del mensajero y la proteína de c-Fos (Figura 27 y 28) en células epiteliales mamarias, como sucede en osteoblastos (Inaoka et al., 1995), en células epiteliales pulmonares (Ying et al., 2006) y en cardiomiocitos (Izumo et al., 1988; Komuro et al., 1990) tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo que AP-1 podría tener una participación relevante en los eventos iniciales del proceso de involución.

En la glándula mamaria se ha reportado un aumento de los niveles de fosforilación de ERK1/2 al inicio de la involución mamaria alcanzando un pico a las 24 horas y disminuyendo marcadamente a las 48 horas (Humphreys et al., 2002). En varios tipos celulares se ha demostrado que las MAPKs transducen las señales provenientes de estímulos mecánicos. Por ejemplo, en células del músculo liso, la activación de ERK 1/2 se encuentra involucrada en el aumento de los niveles de expresión de *c-fos* (Oldenhof et al., 2002). Los resultados aquí presentados indican que el mismo tipo de estímulo mecánico que induce el aumento de los niveles de c-Fos en las células mamarias provoca el rápido aumento de los niveles de fosforilación ERK1/2. Esto sugiere que la activación de ERK 1/2 por estrés mecánico se encuentre modulando la expresión y activación de c-Fos como sucede en otros sistemas (Bao et al., 2000; Kawata et al., 1998; Oldenhof et al., 2002). Actualmente,

los mecanismos de regulación de la expresión de del gen *c-fos* por estrés mecánico en células epiteliales mamarias, utilizando el modelo descrito en esta Tesis, están siendo llevados a cabo por Julián Naipauer en el laboratorio del Dr. Omar Coso. Resultados preliminares, utilizando un inhibidor específico de MEK (PD98059), sugieren que la inducción de ERK 1/2 en respuesta al estímulo mecánico en células epiteliales mamarias se encuentra mediando el aumento de la expresión de *c-fos*.

Además del aumento de los niveles de c-Fos, fue interesante encontrar que *lif* responde al estímulo mecánico comportándose como un gen de respuesta temprana (Figura 33), de manera similar a lo observado en cardiomiocitos (Komuro et al., 1990), y que este aumento del mensajero resulta en un aumento de los niveles de secreción de esta citoquina (Figura 34). Estos resultados demuestran, por primera vez, que el estrés mecánico es capaz de inducir la expresión de un citoquina clave en la involución mamaria, responsable principal de activar STAT3 a través de la vía JAK/STAT en el epitelio mamario (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003).

Basados en los antecedentes que plantean que el LIF es el principal activador de STAT3 en el epitelio mamario, evaluamos el efecto del estrés mecánico sobre los niveles de fosforilación de este factor de transcripción. Los resultados obtenidos indican que el estiramiento induce 2 picos de inducción de pSTAT3: uno temprano, a los 15 minutos, que disminuye significativamente a la hora y otro más tardío, a las 6 horas de aplicado el estiramiento continuo (Figura 32). Esta cinética de activación de STAT3 es interesante porque propone que su fosforilación puede estar sucediendo a través de mecanismos diferentes en distintos momentos. Es muy probable que el segundo pico de pSTAT3 (a las 6 horas) se produzca por la acción autocrina del LIF secretado, que se detecta en el MC de 8 horas y seguramente también ya esté presente a las 6 horas. Igualmente, es necesario corroborar esto estirando las células en presencia del anticuerpo bloqueante de LIF y confirmar la anulación de este pico de pSTAT3. Otro de los resultados que apoya la hipótesis de que el segundo pico de activación de STAT3 es producido por el LIF autocrino/paracrino son los experimentos en donde células en reposo fueron tratadas con MCs de célula expuestas a estiramiento por 8 horas y se observa un aumento de los niveles de fosforilación de este factor de transcripción.

Con respecto al mecanismo de activación temprano de STAT3 producido por el estrés mecánico en HC11, pensamos que no se debe estar produciendo por una acción autocrino/paracrino de LIF ya que no se encontraron niveles detectables de esta citoquina por ensayos de ELISA a tiempos menores de una hora (datos no mostrados). Una explicación plausible, para esta aparición temprana de pSTAT3, es que el estrés mecánico esté induciendo la activación de otras quinasas de tirosinas como, por ejemplo, Src. Esta hipótesis se basa en resultados obtenidos en células del músculo liso donde la inhibición de Src usando el inhibidor PP1 evitó el aumento de los niveles de pSTAT3 inducidos por estrés mecánico (Kakisis et al., 2005). Por otro lado, esta hipótesis podría explicar también el mecanismo que induce la rápida activación de ERK 1/2 una vez aplicado el estiramiento. Se ha reportado que en células epiteliales pulmonares, el estrés mecánico induce el aumento de los niveles de fosforilación de FAK, Src, y ERK. El efecto mitogénico observado en estas células fue bloqueado con el inhibidor de Src (PP2) o un ARN pequeño de interferencia contra Src lo que redujo también la activación de ERK 1/2 (Chaturvedi et al., 2007). Actualmente, la estudiante de biología Ana Romarowski, que trabaja en nuestro laboratorio, se encuentra realizando los experimentos con células HC11 estiradas a tiempos cortos en presencia y ausencia del inhibidor de Src, PP2, y evaluará su efecto sobre los niveles de pSTAT3 y pERK.

El pico temprano de activación de STAT3, además, podría estar involucrado en la regulación de la expresión de c-Fos y en la activación de AP-1, según reportes previos en células epiteliales (Jenab and Morris, 1998). En lo que respecta a la regulación de la transcripción del gen *c-fos*, se ha determinado que tanto STAT3 como la vía de ERK cooperan en su inducción. Estos resultados provienen de experimentos en cardiomiocitos donde el aumento de la expresión de *c-fos*, inducido por LIF, fue inhibido en presencia de un dominante negativo de STAT3. Esto sugiere que las mismas vías podrían estar interactuando en las células epiteliales mamarias estiradas.

Varios grupos sugirieron la participación de JNK durante la involución mamaria. Estos trabajos reportaron que los niveles de pJNK aumentan a partir de las 8 horas de involución en las mamas de ratas (Zaragoza et al., 2003) y en ratones se confirmó que la actividad enzimática de esta MAPK en extracto de mamas en involución era mucho mayor que en estadio de lactancia (Hibi et al., 1993). Además,

por inmunohistoquímica se detectaron altos niveles de pc-Jun (sustrato reconocido de JNK) en los núcleos del compartimiento epitelial (Marti et al., 1999). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación que JNK cumple un rol importante en las células epiteliales mamarias durante la involución y señalan a c-Jun como blanco de esta MAPK durante la involución. Los resultados presentados aquí demuestran que el estrés mecánico induce un marcado aumento de los niveles de pJNK a partir de los 15 minutos, alcanzando un máximo a los 30 minutos y volviendo a los valores basales a la hora de aplicado el estímulo (Figura 30). Como mencionamos previamente, en otros sistemas (Junttila et al., 2008) y recientemente en células epiteliales mamarias (Schere Levy et al, manuscrito enviado), se ha descrito que la activación de la JNK regula negativamente los niveles de activación de ERK 1/2. Los resultados aquí mostrados también sugieren que pJNK podría estar involucrada en la disminución de los niveles de pERK.

### **2.3 El estrés mecánico protege de la apoptosis a las células epiteliales mamarias en cultivo**

Varios trabajos han analizado el efecto del estrés mecánico sobre los niveles de activación de AKT en células endoteliales (Dimmeler et al., 1998), en músculo liso (Sedding et al., 2003) y en queratinocitos (Kippenberger et al., 2005). En este estudio observamos que el estrés mecánico dispara una disminución transitoria de los niveles de pAKT en células epiteliales mamarias (Figura 31). La relevancia del apagado de la vía PI3K/AKT ha sido demostrada a través de estudios en ratones que expresan una forma constitutivamente activa de AKT en los cuales se observó un retraso importante en el proceso de involución (Schwertfeger et al., 2001). Además se ha descubierto que, durante la involución mamaria, STAT3 induce la expresión de subunidades regulatorias negativas de PI3K (p55alpha and p50alpha), las cuales inhiben la fosforilación de AKT (Abell et al., 2005). Como mencionamos en la Introducción, estos trabajos en conjunto indican lo crítico que es que los niveles de pAKT disminuyan durante la involución mamaria. En este sentido, pensamos que la disminución de los niveles de pAKT observada, en células epiteliales mamarias, deberían sensibilizar a las células a morir por apoptosis. Sin embargo, al analizar los niveles de actividad de caspasa 3 (Figura 35), encontramos que la aplicación del

estrés mecánico (por 24 horas) protegió a las células de la actividad de caspasas que se induce por mantener a las células HC11 confluentes en medio mínimo. Este resultado aparentemente contradictorio plantea varios puntos de discusión. En primer lugar, sugiere que un pulso de estrés mecánico podría no ser suficiente para inducir la muerte de células epiteliales mamarias. Recordando las cinéticas de aumento y disminución de la activación de ERK 1/2, AKT y JNK, observamos que la aplicación de estímulo enciende una posible señal de supervivencia a través de ERK y disminuye otra provista por pAKT y, desfasadamente, se enciende pJNK que podría ser responsable de bajar los niveles de pERK. Así, a los 30 minutos de aplicado el estiramiento, nos encontramos con una ventana temporal donde las dos señales más relevantes para la supervivencia de las células epiteliales mamarias se encuentran disminuidas. Esta ventana, permanece abierta hasta que los niveles de pAKT se re-establecen, algo que sucede luego de 3 horas de aplicado el estímulo. Un punto importante a tener en cuenta, es que estas células todavía no secretan LIF como observamos mediante el ELISA realizado y esto empieza a suceder recién a partir de las 6-8 horas. Pero qué pasaría si dentro de esta ventana temporal donde las señales de supervivencia se encuentran apagadas la célula recibe la señal paracrina de LIF. En este trabajo presentamos evidencia que el medio condicionado de células estiradas es capaz de inducir la activación de STAT3 en células en reposo (Figura 36) y que esa activación se debe principalmente a LIF (Figura 38). Para determinar si factores secretados por las células estiradas favorecerían la muerte de células que también están siendo estimuladas mecánicamente, nos proponemos analizar la capacidad de los MCs o de LIF recombinante de inducir apoptosis dentro y fuera de las 3 primeras horas de estiramiento sostenido. Asimismo, nos proponemos evaluar el efecto de incrementar el estrés mecánico a lo largo del tiempo para determinar si el aumento progresivo del estímulo provoca por sí mismo el desencadenamiento de la muerte celular. Este razonamiento tiene un correlato fisiológico si pensamos que al interrumpirse el amamantamiento, las células mamarias se encuentran bajo un estrés mecánico progresivo asociado a la acumulación de leche en los alvéolos. Es concebible, por lo tanto, que no sea un estiramiento rápido y sostenido lo que dispara la muerte sino un incremento progresivo que sea aplicado con una cierta velocidad dentro de un cierto rango de tiempo. Hallar las características específicas de este estímulo será otro de los desafíos a enfrentar.

Otro punto para tener en cuenta es que el dispositivo utilizado en este trabajo para estirar células no permite un monitoreo en tiempo real a tiempos largos en condiciones de cultivo (temperatura y CO<sub>2</sub> controladas). A raíz de esto, en colaboración con Roberto Etchenique y Marcelo Salierno del Departamento de Química Inorgánica de la FCEN, se diseñó un nuevo dispositivo que se basa en el que presentamos en este trabajo, pero permite que el estiramiento de las células pueda ser monitoreado en tiempo real bajo el microscopio y ser registrado fotográficamente en condiciones de cultivo adecuadas. Resultados preliminares obtenidos con este nuevo dispositivo indican que luego de aproximadamente 2 horas de aplicado el estímulo mecánico, las células reacomodan sus contactos con el sustrato y con otras células, disminuyendo su área celular. Posiblemente, este “reacomodamiento” permita reducir la tensión que sufren las células por el estiramiento del sustrato flexible (Salierno & Quaglino, datos preliminares). Es interesante destacar, que el momento en el que las células son capaces de reducir la tensión a la que están siendo sometidas coincide con la finalización de la ventana temporal de mayor susceptibilidad a la apoptosis, que se discutió anteriormente.

Los experimentos presentados de actividad de caspasa proponen que el estrés mecánico en estas condiciones es un estímulo protector. Las células HC11 poseen ambos alelos del gen p53 mutados, lo que les confiere resistencia a la apoptosis inducida por estímulos que generan daño al ADN. Sin embargo, si los cultivos de HC11 están confluentes, las células sufren apoptosis masiva en ausencia de suero fetal bovino (SFB), es decir, en ausencia de hormonas y factores de crecimiento, como en el protocolo que seguimos para este trabajo. Por otro lado, el tratamiento con EGF e insulina protegen de la muerte por apoptosis inducida por ausencia de SFB en células HC11 confluentes (Merlo et al., 1995; Romorini et al., 2009). A partir de esto, y teniendo en cuenta la posibilidad que barajamos anteriormente acerca de que el estrés mecánico esté induciendo la activación de la quinasas Src, es tentador especular que un posible mecanismo involucrado en la protección mediada por el estiramiento sea la transactivación del receptor de EGF (Moroni et al., 2005).

Varios tipos celulares necesitan anclarse a la matriz extracelular como requisito para sobrevivir y esto es realizado a través de la unión de las integrinas a motivos específicos en la matriz, señalizando esta unión a través de las quinasas de

contactos focales o FAKs (Bouchard et al., 2008). Hay reportes que indican que durante la involución mamaria se produce una disminución de los niveles de expresión de integrina- $\beta 1$  y FAK a partir de las 6 horas de producido el destete (McMahon et al., 2004) y que en el caso de la  $\beta 1$ -integrina se mantienen bajos a lo largo de todo el período de involución. Los autores del trabajo proponen que sería necesaria una disminución de los contactos entre las células y la membrana basal para que se inicie la apoptosis de las células epiteliales. Esta afirmación se apoya en que durante la involución mamaria, la actividad de caspasa-3 es detectada sólo en las células que aparecen en la luz de alvéolos y conductos entre las 12 y 24 horas luego del destete. Únicamente después de 72 horas, una vez iniciada la fase irreversible, se encuentran células apoptóticas en la pared alveolar. Esto indica que el evento final de muerte, durante la primera fase de la involución, no ocurre hasta que las células se desprenden de la membrana basal (Watson, 2006). Una disminución en la señalización a través de integrinas y FAK, podría disminuir los niveles de activación de Src, como sucede en otros tipos celulares (Bouchard et al., 2008), y, de esta manera, inhibir las señales de supervivencia. Nosotros proponemos que el estrés mecánico podría modular esta vía a través de la regulación de los niveles de ARNm de  $\beta 1$ -integrina. Apoyando esta posibilidad, datos preliminares de Julián Naipauer en el laboratorio del Dr. Omar Coso indican que el estiramiento induce la desestabilización de estas especies de ARNm en células epiteliales mamarias HC11 (Naipauer et al, SAIC 2009).

## 2.4 Conclusiones y Perspectivas

El trabajo presentado en la segunda parte de esta Tesis, brinda nuevas herramientas para investigar *in vitro* el efecto del estrés mecánico sobre el comportamiento celular y los mecanismos subyacentes a estos fenómenos. Además, aporta evidencias de que *in vivo* el estrés mecánico podría ser un estímulo relevante para la regulación de la expresión de genes y activación de cascadas de señales claves durante la involución mamaria. Finalmente, los resultados mostrados aquí también plantean la posibilidad que fuerzas mecánicas se encuentren regulando procesos similares durante el desarrollo tumoral de las células mamarias.

En los últimos años, el campo que estudia del efecto de las fuerzas mecánicas sobre el comportamiento celular ha adquirido relevancia y ha crecido enormemente en el resto del mundo. En Argentina, sólo pudimos identificar otro grupo de investigación además de nuestro que estuviese desarrollando modelos experimentales para estudiar el efecto del estiramiento sobre el comportamiento y la función celular. Dicho equipo es el dirigido por el Dr. Walter Manucha (IMBECU, Universidad Nacional de Cuyo), al cual asesoramos en cuanto a la preparación de las membranas de silicona y el mejoramiento de la adherencia celular.

Actualmente varios grupos de investigación se han interesado en el modelo presentado en esta Tesis y algunos lo han empezado a adaptar, por ejemplo, para realizar estudios por diferentes técnicas de microscopía. Las líneas de trabajo y las colaboraciones que han surgido a partir del presente trabajo incluyen estudiar el efecto del estrés mecánico sobre: la estabilidad de distintos ARN mensajeros, la regulación de la maquinaria de *splicing* y el *splicing* alternativo de diversos genes involucrados en la transformación neoplásica. Además, otros grupos contactados con nosotros han empezado a desarrollar modelos que permitan aplicar estímulos mecánicos a células únicas utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM) y también, con el objetivo de estudiar el proceso de mecano-transducción a escala molecular, nano-manipuladores que permitirán estudiar este proceso a nivel de focos de adhesión individuales. En conjunto, esto demuestra que se está gestando un núcleo interdisciplinario de grupos de investigación interesados en estudiar los mecanismos y el efecto de las fuerzas mecánicas sobre el comportamiento celular, lo que augura el crecimiento y la consolidación de este interesantísimo campo de estudio en nuestro país.

## ABREVIATURAS

<b>AKT</b>	proteína quinasa B
<b>Ap-1</b>	proteína activadora 1
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>BSA</b>	albúmina Sérica Bovina
<b>CPT</b>	cultivo primario tumoral
<b>c-Src</b>	tirosina quinasa celular del virus del sarcoma de Rous virus
<b>DAB</b>	diaminobencidina
<b>EGF</b>	factor de crecimiento epidermal
<b>ER</b>	receptor de estrógeno
<b>ERa</b>	estiramiento radial
<b>ERK</b>	quinasa regulada por señales extracelulares
<b>HC11</b>	línea celular derivada de epitelio mamario de ratón
<b>JAK</b>	quinasa Janus
<b>JNK</b>	quinasa del N-terminal de Jun
<b>LIF</b>	factor Inhibitorio de Leucemia
<b>LIFR</b>	receptor del factor inhibitorio de leucemias
<b>LM3</b>	línea celular derivadas de adenocarcinoma mamario
<b>MAPK</b>	proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MC</b>	medio condicionado
<b>MEM</b>	medio mínimo esencial
<b>MMTV</b>	virus del tumor mamario murino
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PD98059</b>	inhibidor de MEK1/2
<b>PI3K</b>	fosfatidil-inositol 3-quinasa
<b>PR</b>	receptor de progesterona
<b>PRL</b>	prolactina
<b>PRLR</b>	receptor de prolactina

<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa seguida de una reacción de cadena de la polimerasa
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SOCS</b>	proteínas supresoras de señales de citoquinas
<b>STAT</b>	transductor de la señal y activador de la transcripción
<b>STAT3ip</b>	péptido inhibitorio específico de STAT3
<b>TEB</b>	brote del extremo terminal
<b>wild type</b>	salvaje
<b>MEK</b>	quinasa de ERK
<b>SOCS</b>	proteínas supresoras de señalización por citoquinas
<b>C/EBP</b>	proteínas potenciadoras de unión a CCAAT(citidina-citidina-adenosina-adenosina-timidina)

### **Publicaciones que surgieron de esta Tesis**

- Quaglino A, Salierno M, Pellegrotti J, Rubinstein N, Kordon EC. Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells. *BMC Cell Biology*. 2009 Jul 17; 10:55.
- Quaglino A, Schere-Levy C, Romorini L, Meiss RP, Kordon EC. Mouse mammary tumors display Stat3 activation dependent on leukemia inhibitory factor signaling. *Breast Cancer Res*. 2007; 9(5):R69.

### **Publicaciones en las cuales participé durante el transcurso de esta tesis**

- Rubio MF, Werbajh S, Cafferata EG, Quaglino A, Coló GP, Nojek IM, Kordon EC, Nahmod VE, Costas MA. TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B. *Oncogene*. 2006 Mar 2; 25(9):1367-77.
- Gattelli A, Cirio MC, Quaglino A, Schere-Levy C, Martinez N, Binaghi M, Meiss RP, Castilla LH, Kordon EC. Progression of pregnancy-dependent mouse mammary tumors after long dormancy periods. Involvement of Wnt pathway activation. *Cancer Res*. 2004 Aug 1; 64(15):5193-9.
- Schere-Levy C, Buggiano V, Quaglino A, Gattelli A, Cirio MC, Piazzon I, Vanzulli S, Kordon EC. Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res*. 2003 Jan 1; 282(1):35-47.

## **Referencias bibliográficas**

- Abell, K., Bilancio, A., Clarkson, R.W., Tiffen, P.G., Altaparmakov, A.I., Burdon, T.G., Asano, T., Vanhaesebroeck, B., and Watson, C.J. (2005).** Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. *Nat Cell Biol* 7, 392-398.
- Ackler, S., Ahmad, S., Tobias, C., Johnson, M.D., and Glazer, R.I. (2002).** Delayed mammary gland involution in MMTV-AKT1 transgenic mice. *Oncogene* 21, 198-206.
- Aikawa, R., Nagai, T., Kudoh, S., Zou, Y., Tanaka, M., Tamura, M., Akazawa, H., Takano, H., Nagai, R., and Komuro, I. (2002).** Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension* 39, 233-238.
- Alvarez, J.V., Febbo, P.G., Ramaswamy, S., Loda, M., Richardson, A., and Frank, D.A. (2005).** Identification of a genetic signature of activated signal transducer and activator of transcription 3 in human tumors. *Cancer Res* 65, 5054-5062.
- Alvarez, J.V., and Frank, D.A. (2004).** Genome-wide analysis of STAT target genes: elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biol Ther* 3, 1045-1050.
- Andres, A.C., and Strange, R. (1999).** Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 221-228.
- Aoki, Y., Feldman, G.M., and Tosato, G. (2003).** Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 101, 1535-1542.
- Ball, R.K., Friis, R.R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W., and Groner, B. (1988).** Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo J* 7, 2089-2095.
- Bao, X., Clark, C.B., and Frangos, J.A. (2000).** Temporal gradient in shear-induced signaling pathway: involvement of MAP kinase, c-fos, and connexin43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1598-1605.
- Barry, S.P., Davidson, S.M., and Townsend, P.A. (2008).** Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2023-2039.
- Berishaj, M., Gao, S.P., Ahmed, S., Leslie, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W.L., Bornmann, W., and Bromberg, J.F. (2007).** Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 9, R32.
- Bharti, A.C., Donato, N., and Aggarwal, B.B. (2003).** Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol* 171, 3863-3871.
- Bissell, M.J., and Radisky, D. (2001).** Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46-54.
- Bose, S., Chandran, S., Mirocha, J.M., and Bose, N. (2006).** The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol* 19, 238-245.
- Bouchard, V., Harnois, C., Demers, M.J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Gauthier, R., Vezina, A., Noel, D., Fujita, N., Tsuruo, T., et al. (2008).** B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms. *Apoptosis* 13, 531-542.

- Bousquet, C.,** and Melmed, S. (1999). Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropic hormone leukemia inhibitory factor signaling. *J Biol Chem* **274**, 10723-10730.
- Bowman, T.,** Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-2488.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bromberg, J.** (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* **109**, 1139-1142.
- Bromberg, J.,** and Darnell, J.E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468-2473.
- Bromberg, J.F.,** Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W., and Darnell, J.E., Jr. (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* **18**, 2553-2558.
- Bromberg, J.F.,** Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303.
- Brown, T.D.** (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J Biomech* **33**, 3-14.
- Buettner, R.,** Mora, L.B., and Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* **8**, 945-954.
- Buggiano, V.,** Goldman, A., Nepomnaschy, I., Bekinschtein, P., Berguer, P., Lombardi, G., Deroche, A., Francisco, M.V., and Piazzon, I. (1999). Characterization of two infectious mouse mammary tumour viruses: superantigenicity and tumorigenicity. *Scand J Immunol* **49**, 269-277.
- Buggiano, V.,** Levy, C.S., Gattelli, A., Cirio, M.C., Marfil, M., Nepomnaschy, I., Piazzon, I., Helguero, L., Vanzulli, S., and Kordon, E.C. (2002). Origin and progression of pregnancy-dependent mammary tumors induced by new mouse mammary tumor virus variants. *Breast Cancer Res Treat* **75**, 191-202.
- Butcher, D.T.,** Alliston, T., and Weaver, V.M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* **9**, 108-122.
- Cardiff, R.D.** (2001). Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: comparative pathology. *Microsc Res Tech* **52**, 224-230.
- Carpenter, G.** (1999). Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol* **146**, 697-702.
- Catalano, R.D.,** Johnson, M.H., Campbell, E.A., Charnock-Jones, D.S., Smith, S.K., and Sharkey, A.M. (2005). Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8585-8590.
- Catlett-Falcone, R.,** Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., *et al.* (1999). Constitutive

- activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* *10*, 105-115.
- Clarkson**, R.W., Wayland, M.T., Lee, J., Freeman, T., and Watson, C.J. (2004). Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Res* *6*, R92-109.
- Clevenger**, C.V. (2004). Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* *165*, 1449-1460.
- Cotarla**, I., Ren, S., Zhang, Y., Gehan, E., Singh, B., and Furth, P.A. (2004). Stat5a is tyrosine phosphorylated and nuclear localized in a high proportion of human breast cancers. *Int J Cancer* *108*, 665-671.
- Chapman**, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R., and Watson, C.J. (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* *13*, 2604-2616.
- Chaturvedi**, L.S., Marsh, H.M., and Basson, M.D. (2007). Src and focal adhesion kinase mediate mechanical strain-induced proliferation and ERK1/2 phosphorylation in human H441 pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* *292*, C1701-1713.
- Chim**, C.S., Fung, T.K., Cheung, W.C., Liang, R., and Kwong, Y.L. (2004). SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* *103*, 4630-4635.
- Chung**, J., Uchida, E., Grammer, T.C., and Blenis, J. (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* *17*, 6508-6516.
- Dechow**, T.N., Pedranzini, L., Leitch, A., Leslie, K., Gerald, W.L., Linkov, I., and Bromberg, J.F. (2004). Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10602-10607.
- Desrivieres**, S., Kunz, C., Barash, I., Vafaizadeh, V., Borghouts, C., and Groner, B. (2006). The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *11*, 75-87.
- Dhillon**, A.S., and Kolch, W. (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* *404*, 3-9.
- Dhingra**, K., Sahin, A., Emami, K., Hortobagyi, G.N., and Estrov, Z. (1998). Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in breast cancer: a potential autocrine and paracrine growth regulatory mechanism. *Breast Cancer Res Treat* *48*, 165-174.
- Diaz**, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., *et al.* (2006). Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* *12*, 20-28.
- Dien**, J., Amin, H.M., Chiu, N., Wong, W., Frantz, C., Chiu, B., Mackey, J., and Lai, R. (2006). Signal transducers and activators of transcription-3 up-regulates tissue inhibitor of

- metalloproteinase-1 expression and decreases invasiveness of breast cancer. *Am J Pathol* 169, 633-642.
- Dimmeler, S., Assmus, B., Hermann, C., Haendeler, J., and Zeiher, A.M.** (1998). Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 83, 334-341.
- Dolled-Filhart, M., Camp, R.L., Kowalski, D.P., Smith, B.L., and Rimm, D.L.** (2003). Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 9, 594-600.
- Dong, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A.** (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20, 55-72.
- Earnshaw, W.C.** (1999). Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* 397, 387, 389.
- Edwin, F., Wiepz, G.J., Singh, R., Peet, C.R., Chaturvedi, D., Bertics, P.J., and Patel, T.B.** (2006). A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol Biol* 327, 1-24.
- Eferl, R., and Wagner, E.F.** (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 859-868.
- Ernst, M., Novak, U., Nicholson, S.E., Layton, J.E., and Dunn, A.R.** (1999). The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation. Involvement of STAT3. *J Biol Chem* 274, 9729-9737.
- Estrov, Z., Samal, B., Lapushin, R., Kellokumpu-Lehtinen, P., Sahin, A.A., Kurzrock, R., Talpaz, M., and Aggarwal, B.B.** (1995). Leukemia inhibitory factor binds to human breast cancer cells and stimulates their proliferation. *J Interferon Cytokine Res* 15, 905-913.
- Faffe, D.S., and Zin, W.A.** (2009). Lung parenchymal mechanics in health and disease. *Physiol Rev* 89, 759-775.
- Farber, E.** (1984). The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 44, 4217-4223.
- Frank, D.A.** (2007). STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett* 251, 199-210.
- Gadient, R.A., and Patterson, P.H.** (1999). Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 17, 127-137.
- Galm, O., Yoshikawa, H., Esteller, M., Osieka, R., and Herman, J.G.** (2003). SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 101, 2784-2788.
- Garcia-Cardena, G., Comander, J., Anderson, K.R., Blackman, B.R., and Gimbrone, M.A., Jr.** (2001). Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4478-4485.
- Garcia, C.S., Prota, L.F., Morales, M.M., Romero, P.V., Zin, W.A., and Rocco, P.R.** (2006). Understanding the mechanisms of lung mechanical stress. *Braz J Med Biol Res* 39, 697-706.

- Garcia M, J.A., Ward E, Center M, Hao Y, Siegel R (2007).** Global cancer facts and figures 2007. Paper presented at: American Cancer Society (Atlanta, GA).
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., et al. (2001).** Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20, 2499-2513.
- Garcia, R., Yu, C.L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K.L., Smithgall, T., Fujita, D.J., Ethier, S.P., and Jove, R. (1997).** Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 8, 1267-1276.
- Gattelli, A., Cirio, M.C., Quaglino, A., Schere-Levy, C., Martinez, N., Binaghi, M., Meiss, R.P., Castilla, L.H., and Kordon, E.C. (2004).** Progression of pregnancy-dependent mouse mammary tumors after long dormancy periods. Involvement of Wnt pathway activation. *Cancer Res* 64, 5193-5199.
- Gearing, D.P., Gough, N.M., King, J.A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Simpson, R.J., Nice, E.C., Kelso, A., and Metcalf, D. (1987).** Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J* 6, 3995-4002.
- Gewies, A. (2003).** Introduction to Apoptosis ApoReview 27.
- Ghosh, K., Pan, Z., Guan, E., Ge, S., Liu, Y., Nakamura, T., Ren, X.D., Rafailovich, M., and Clark, R.A. (2007).** Cell adaptation to a physiologically relevant ECM mimic with different viscoelastic properties. *Biomaterials* 28, 671-679.
- Gilmore, A.P., Metcalfe, A.D., Romer, L.H., and Streuli, C.H. (2000).** Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 149, 431-446.
- Gimbrone, M.A., Jr., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R., and Garcia-Cardena, G. (2000).** Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 902, 230-239; discussion 239-240.
- Golovkina, T.V., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Buggiano, V., de Olano Vela, M., and Ross, S.R. (1997).** Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. *J Virol* 71, 3895-3903.
- Golubovskaya, V.M., Gross, S., Kaur, A.S., Wilson, R.I., Xu, L.H., Yang, X.H., and Cance, W.G. (2003).** Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and SRC enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol Cancer Res* 1, 755-764.
- Grant, S.L., Hammacher, A., Douglas, A.M., Goss, G.A., Mansfield, R.K., Heath, J.K., and Begley, C.G. (2002).** An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells. *Oncogene* 21, 460-474.
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., et al. (2006).** Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 12, 11-19.
- Haga, S., Terui, K., Zhang, H.Q., Enosawa, S., Ogawa, W., Inoue, H., Okuyama, T., Takeda, K., Akira, S., Ogino, T., et al. (2003).** Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest* 112, 989-998.

- Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Sack, U., Schlenska, A., Gessner, C., Gillissen, A., and Wirtz, H. (2005).** Mechanical stretch alters alveolar type II cell mediator release toward a proinflammatory pattern. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 203-210.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- He, B., You, L., Uematsu, K., Zang, K., Xu, Z., Lee, A.Y., Costello, J.F., McCormick, F., and Jablons, D.M. (2003).** SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14133-14138.
- Heineke, J., and Molkenin, J.D. (2006).** Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 589-600.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003).** Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998).** Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 ( Pt 2), 297-314.
- Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2004).** AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117, 5965-5973.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993).** Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7, 2135-2148.
- Hirsch, E., Costa, C., and Ciruolo, E. (2007).** Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol* 194, 243-256.
- Hochmuth, R.M. (2000).** Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech* 33, 15-22.
- Horseman, N.D., Zhao, W., Montecino-Rodriguez, E., Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S.J., Smith, F., Markoff, E., and Dorshkind, K. (1997).** Defective mammapoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J* 16, 6926-6935.
- Hughes-Fulford, M. (2004).** Signal transduction and mechanical stress. *Sci STKE* 2004, RE12.
- Humphreys, R.C., Bierie, B., Zhao, L., Raz, R., Levy, D., and Hennighausen, L. (2002).** Deletion of Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional competence of the secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli. *Endocrinology* 143, 3641-3650.
- Hutchinson, J., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R., and Muller, W.J. (2001).** Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. *Mol Cell Biol* 21, 2203-2212.
- Hutt, J.A., O'Rourke, J.P., and DeWille, J. (2000).** Signal transducer and activator of transcription 3 activates CCAAT enhancer-binding protein delta gene transcription in G0 growth-arrested mouse mammary epithelial cells and in involuting mouse mammary gland. *J Biol Chem* 275, 29123-29131.

- Hutzen**, B., Friedman, L., Sobo, M., Lin, L., Cen, L., De Angelis, S., Yamakoshi, H., Shibata, H., Iwabuchi, Y., and Lin, J. (2009). Curcumin analogue GO-Y030 inhibits STAT3 activity and cell growth in breast and pancreatic carcinomas. *Int J Oncol* 35, 867-872.
- Inaoka**, T., Lean, J.M., Bessho, T., Chow, J.W., Mackay, A., Kokubo, T., and Chambers, T.J. (1995). Sequential analysis of gene expression after an osteogenic stimulus: c-fos expression is induced in osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 264-270.
- Ingber**, D.E. (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 20, 811-827.
- Isomoto**, H., Kobayashi, S., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Guicciardi, M.E., Frank, D.A., and Gores, G.J. (2005). Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 42, 1329-1338.
- Itoh**, M., Murata, T., Suzuki, T., Shindoh, M., Nakajima, K., Imai, K., and Yoshida, K. (2006). Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells. *Oncogene* 25, 1195-1204.
- Izumo**, S., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1988). Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 339-343.
- Jaalouk**, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 63-73.
- Jackson**, A.L., and Loeb, L.A. (1998). On the origin of multiple mutations in human cancers. *Semin Cancer Biol* 8, 421-429.
- Jenab**, S., and Morris, P.L. (1998). Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1 and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat Sertoli but not germ cells. *Endocrinology* 139, 1883-1890.
- Junttila**, M.R., Li, S.P., and Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 22, 954-965.
- Kakisis**, J.D., Pradhan, S., Cordova, A., Liapis, C.D., and Sumpio, B.E. (2005). The role of STAT-3 in the mediation of smooth muscle cell response to cyclic strain. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1396-1406.
- Kanda**, N., Seno, H., Konda, Y., Marusawa, H., Kanai, M., Nakajima, T., Kawashima, T., Nanakin, A., Sawabu, T., Uenoyama, Y., *et al.* (2004). STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 23, 4921-4929.
- Kane**, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., and Weiss, A. (1999). Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9, 601-604.
- Karin**, M., and Gallagher, E. (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* 57, 283-295.

- Katz, M., Amit, I., and Yarden, Y. (2007).** Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1161-1176.
- Kawamura, S., Miyamoto, S., and Brown, J.H. (2003).** Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J Biol Chem* 278, 31111-31117.
- Kawata, Y., Mizukami, Y., Fujii, Z., Sakumura, T., Yoshida, K., and Matsuzaki, M. (1998).** Applied pressure enhances cell proliferation through mitogen-activated protein kinase activation in mesangial cells. *J Biol Chem* 273, 16905-16912.
- Kellokumpu-Lehtinen, P., Talpaz, M., Harris, D., Van, Q., Kurzrock, R., and Estrov, Z. (1996).** Leukemia-inhibitory factor stimulates breast, kidney and prostate cancer cell proliferation by paracrine and autocrine pathways. *Int J Cancer* 66, 515-519.
- Kelly, P.A., Bachelot, A., Kedzia, C., Hennighausen, L., Ormandy, C.J., Kopchick, J.J., and Binart, N. (2002).** The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol* 197, 127-131.
- Kijima, T., Niwa, H., Steinman, R.A., Drenning, S.D., Gooding, W.E., Wentzel, A.L., Xi, S., and Grandis, J.R. (2002).** STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell Growth Differ* 13, 355-362.
- Kim, C.H., Cho, Y.S., Chun, Y.S., Park, J.W., and Kim, M.S. (2002).** Early expression of myocardial HIF-1 $\alpha$  in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res* 90, E25-33.
- Kim, D.S., and Melmed, S. (1999).** Stimulatory effect of leukemia inhibitory factor on ACTH secretion of dispersed rat pituitary cells. *Endocr Res* 25, 11-19.
- Kippenberger, S., Loitsch, S., Guschel, M., Muller, J., Knies, Y., Kaufmann, R., and Bernd, A. (2005).** Mechanical stretch stimulates protein kinase B/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 280, 3060-3067.
- Komuro, I., Kaida, T., Shibazaki, Y., Kurabayashi, M., Katoh, Y., Hoh, E., Takaku, F., and Yazaki, Y. (1990).** Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem* 265, 3595-3598.
- Komuro, I., Kudo, S., Yamazaki, T., Zou, Y., Shiojima, I., and Yazaki, Y. (1996).** Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *Faseb J* 10, 631-636.
- Kotha, A., Sekharam, M., Cilenti, L., Siddiquee, K., Khaled, A., Zervos, A.S., Carter, B., Turkson, J., and Jove, R. (2006).** Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther* 5, 621-629.
- Kritikou, E.A., Sharkey, A., Abell, K., Came, P.J., Anderson, E., Clarkson, R.W., and Watson, C.J. (2003).** A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* 130, 3459-3468.

- Kushner I**, and A., M. (1993). The acute phase response: An overview. In *Acute phase proteins, molecular biology, biochemistry, and clinical applications*, Mackiewicz A, Kushner I, and B. H., eds., pp. 3-19.
- Lammerding**, J., Kamm, R.D., and Lee, R.T. (2004). Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1015, 53-70.
- Lee**, A.A., Delhaas, T., Waldman, L.K., MacKenna, D.A., Villarreal, F.J., and McCulloch, A.D. (1996). An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am J Physiol* 271, C1400-1408.
- Lee**, T.L., Yeh, J., Van Waes, C., and Chen, Z. (2006). Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther* 5, 8-19.
- Lee**, Y.F., Lin, W.J., Huang, J., Messing, E.M., Chan, F.L., Wilding, G., and Chang, C. (2002). Activation of mitogen-activated protein kinase pathway by the antiandrogen hydroxyflutamide in androgen receptor-negative prostate cancer cells. *Cancer Res* 62, 6039-6044.
- Lerner**, L., Henriksen, M.A., Zhang, X., and Darnell, J.E., Jr. (2003). STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev* 17, 2564-2577.
- Leslie**, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y.B., Paz, K., Darnell, J.E., Albanese, C., *et al.* (2006). Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res* 66, 2544-2552.
- Li**, H., Zhang, Y., Glass, A., Zellweger, T., Gehan, E., Bubendorf, L., Gelmann, E.P., and Nevalainen, M.T. (2005a). Activation of signal transducer and activator of transcription-5 in prostate cancer predicts early recurrence. *Clin Cancer Res* 11, 5863-5868.
- Li**, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K.U., Young, W.S., Hennighausen, L., and Furth, P.A. (1997). Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3425-3430.
- Li**, Y.S., Haga, J.H., and Chien, S. (2005b). Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 38, 1949-1971.
- Lim**, C.P., and Cao, X. (1999). Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem* 274, 31055-31061.
- Ling**, X., and Arlinghaus, R.B. (2005). Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res* 65, 2532-2536.
- Liu**, X., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (1996). Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol Endocrinol* 10, 1496-1506.
- Lo**, H.W., Hsu, S.C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J.Y., and Hung, M.C. (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7, 575-589.

- Lopez-Marure**, R., Gutierrez, G., Mendoza, C., Ventura, J.L., Sanchez, L., Reyes Maldonado, E., Zentella, A., and Montano, L.F. (2002). Ceramide promotes the death of human cervical tumor cells in the absence of biochemical and morphological markers of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1028-1036.
- Lozano-Ascencio**, R., Gómez-Dantés, H., Lewis, S., Torres-Sánchez, L., and López-Carrillo, L. (2009). Tendencias del cáncer de mama en América Latina y el Caribe. *Salud pública Méx* 51.
- Lund**, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Dano, K., and Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122, 181-193.
- Manning**, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marti**, A., Feng, Z., Altermatt, H.J., and Jaggi, R. (1997). Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 73, 158-165.
- Marti**, A., Jehn, B., Costello, E., Keon, N., Ke, G., Martin, F., and Jaggi, R. (1994). Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* 9, 1213-1223.
- Marti**, A., Lazar, H., Ritter, P., and Jaggi, R. (1999). Transcription factor activities and gene expression during mouse mammary gland involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 145-152.
- Marti**, A., Ritter, P.M., Jager, R., Lazar, H., Baltzer, A., Schenkel, J., Declercq, W., Vandenabeele, P., and Jaggi, R. (2001). Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome c release and caspase activation. *Mech Dev* 104, 89-98.
- Masso-Welch**, P.A., Darcy, K.M., Stangle-Castor, N.C., and Ip, M.M. (2000). A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 165-185.
- Masuda**, M., Suzui, M., Yasumatu, R., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Azuma, K., Tomita, K., Komiyama, S., and Weinstein, I.B. (2002). Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62, 3351-3355.
- Matheson**, L.A., Maksym, G.N., Santerre, J.P., and Labow, R.S. (2006). Cyclic biaxial strain affects U937 macrophage-like morphology and enzymatic activities. *J Biomed Mater Res A* 76, 52-62.
- Matos**, E.L., Loria, D.I., and Vilensky, M. (1994). Cancer mortality and poverty in Argentina: a geographical correlation study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 213-218.
- Mayor**, F., Jr., Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., and Murga, C. (2007). Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle* 6, 528-533.
- McMahon**, C.D., Farr, V.C., Singh, K., Wheeler, T.T., and Davis, S.R. (2004). Decreased expression of beta1-integrin and focal adhesion kinase in epithelial cells may initiate involution of mammary glands. *J Cell Physiol* 200, 318-325.

- Merlo**, G.R., Basolo, F., Fiore, L., Duboc, L., and Hynes, N.E. (1995). p53-dependent and p53-independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. *J Cell Biol* 128, 1185-1196.
- Mora**, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., *et al.* (2002). Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 62, 6659-6666.
- Moroni**, M., Veronese, S., Benvenuti, S., Marrapese, G., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Gambacorta, M., Siena, S., and Bardelli, A. (2005). Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 6, 279-286.
- Nakopoulou**, L., Giannopoulou, I., Lazaris, A., Alexandrou, P., Tsirmpa, I., Markaki, S., Panayotopoulou, E., and Keramopoulos, A. (2003). The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. *APMIS* 111, 1027-1036.
- Nelson**, C.M., and Bissell, M.J. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 287-309.
- Nevalainen**, M.T., Xie, J., Torhorst, J., Bubendorf, L., Haas, P., Kononen, J., Sauter, G., and Rui, H. (2004). Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. *J Clin Oncol* 22, 2053-2060.
- Oberhauser**, A.F., Badilla-Fernandez, C., Carrion-Vazquez, M., and Fernandez, J.M. (2002). The mechanical hierarchies of fibronectin observed with single-molecule AFM. *J Mol Biol* 319, 433-447.
- Oldenhof**, A.D., Shynlova, O.P., Liu, M., Langille, B.L., and Lye, S.J. (2002). Mitogen-activated protein kinases mediate stretch-induced c-fos mRNA expression in myometrial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1530-1539.
- Ormandy**, C.J., Binart, N., and Kelly, P.A. (1997). Mammary gland development in prolactin receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2, 355-364.
- Pan**, J., Fukuda, K., Saito, M., Matsuzaki, J., Kodama, H., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., and Ogawa, S. (1999). Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 84, 1127-1136.
- Park**, C.C., Bissell, M.J., and Barcellos-Hoff, M.H. (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 6, 324-329.
- Park**, J.I., Strock, C.J., Ball, D.W., and Nelkin, B.D. (2003). The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 23, 543-554.
- Paszek**, M.J., and Weaver, V.M. (2004). The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 325-342.
- Pensa**, S., Watson, C.J., and Poli, V. (2009). Stat3 and the inflammation/acute phase response in involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14, 121-129.

- Pevzner, P.**, and Tesler, G. (2003). Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7672-7677.
- Polte, T.R.**, Eichler, G.S., Wang, N., and Ingber, D.E. (2004). Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C518-528.
- Puricelli, L.**, Proietti, C.J., Labriola, L., Salatino, M., Balana, M.E., Aguirre Ghiso, J., Lupu, R., Pignataro, O.P., Charreau, E.H., Bal de Kier Joffe, E., *et al.* (2002). Heregulin inhibits proliferation via ERKs and phosphatidylinositol 3-kinase activation but regulates urokinase plasminogen activator independently of these pathways in metastatic mammary tumor cells. *Int J Cancer* 100, 642-653.
- Quaglino, A.**, Schere-Levy, C., Romorini, L., Meiss, R.P., and Kordon, E.C. (2007). Mouse mammary tumors display Stat3 activation dependent on leukemia inhibitory factor signaling. *Breast Cancer Res* 9, R69.
- Quarrie, L.H.**, Addey, C.V., and Wilde, C.J. (1996). Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J Cell Physiol* 168, 559-569.
- Rana, O.R.**, Zobel, C., Saygili, E., Brixius, K., Gramley, F., Schimpf, T., Mischke, K., Frechen, D., Knackstedt, C., Schwinger, R.H., *et al.* (2008). A simple device to apply equibiaxial strain to cells cultured on flexible membranes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H532-540.
- Rane, S.G.**, and Reddy, E.P. (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19, 5662-5679.
- Rawlings, J.S.**, Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281-1283.
- Reich, N.C.** (2009). STAT3 revs up the powerhouse. *Sci Signal* 2, pe61.
- Reichardt, H.M.**, Horsch, K., Grone, H.J., Kolbus, A., Beug, H., Hynes, N., and Schutz, G. (2001). Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur J Endocrinol* 145, 519-527.
- Reichelt, J.** (2007). Mechanotransduction of keratinocytes in culture and in the epidermis. *Eur J Cell Biol* 86, 807-816.
- Reiners, J.J., Jr.**, Lee, J.Y., Clift, R.E., Dudley, D.T., and Myrand, S.P. (1998). PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol* 53, 438-445.
- Resch, H.**, Garhofer, G., Fuchsjäger-Mayrl, G., Hommer, A., and Schmetterer, L. (2009). Endothelial dysfunction in glaucoma. *Acta Ophthalmol* 87, 4-12.
- Richert, M.M.**, Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., and Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 227-241.
- Romorini, L.**, Coso, O.A., and Pecci, A. (2009). Bcl-XL mediates epidermal growth factor dependent cell survival in HC11 mammary epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1793, 496-505.

- Sadoshima**, J., and Izumo, S. (1993). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *Embo J* 12, 1681-1692.
- Sartor**, C.I., Dziubinski, M.L., Yu, C.L., Jove, R., and Ethier, S.P. (1997). Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. *Cancer Res* 57, 978-987.
- Schere-Levy**, C., Buggiano, V., Quaglino, A., Gattelli, A., Cirio, M.C., Piazzon, I., Vanzulli, S., and Kordon, E.C. (2003). Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res* 282, 35-47.
- Schindler**, C., and Plumlee, C. (2008). Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19, 311-318.
- Schreiner**, S.J., Schiavone, A.P., and Smithgall, T.E. (2002). Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain. *J Biol Chem* 277, 45680-45687.
- Schwartz**, J., Ray, D.W., and Perez, F.M. (1999). Leukemia inhibitory factor as an intrapituitary mediator of ACTH secretion. *Neuroendocrinology* 69, 34-43.
- Schwertfeger**, K.L., Richert, M.M., and Anderson, S.M. (2001). Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 15, 867-881.
- Sedding**, D.G., Seay, U., Fink, L., Heil, M., Kummer, W., Tillmanns, H., and Braun-Dullaeus, R.C. (2003). Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 108, 616-622.
- Sehgal**, P.B. (2008). Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol* 19, 329-340.
- Selander**, K.S., Li, L., Watson, L., Merrell, M., Dahmen, H., Heinrich, P.C., Muller-Newen, G., and Harris, K.W. (2004). Inhibition of gp130 signaling in breast cancer blocks constitutive activation of Stat3 and inhibits in vivo malignancy. *Cancer Res* 64, 6924-6933.
- Selbert**, S., Bentley, D.J., Melton, D.W., Rannie, D., Lourenco, P., Watson, C.J., and Clarke, A.R. (1998). Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. *Transgenic Res* 7, 387-396.
- Shen**, Q., Zhang, Y., Uray, I.P., Hill, J.L., Kim, H.T., Lu, C., Young, M.R., Gunther, E.J., Hilsenbeck, S.G., Chodosh, L.A., *et al.* (2006). The AP-1 transcription factor regulates postnatal mammary gland development. *Dev Biol* 295, 589-603.
- Shuai**, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638-2644.
- Siddiquee**, K., Zhang, S., Guida, W.C., Blaskovich, M.A., Greedy, B., Lawrence, H.R., Yip, M.L., Jove, R., McLaughlin, M.M., Lawrence, N.J., *et al.* (2007). Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7391-7396.
- Stambolic**, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.

- Stein, T., Morris, J.S., Davies, C.R., Weber-Hall, S.J., Duffy, M.A., Heath, V.J., Bell, A.K., Ferrier, R.K., Sandilands, G.P., and Gusterson, B.A. (2004).** Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res* 6, R75-91.
- Strange, R., Friis, R.R., Bemis, L.T., and Geske, F.J. (1995).** Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol* 46, 355-368.
- Strange, R., Metcalfe, T., Thackray, L., and Dang, M. (2001).** Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microsc Res Tech* 52, 171-181.
- Subramaniam, D.S., and Isaacs, C. (2005).** Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 6, 147-159.
- Sultan, A.S., Xie, J., LeBaron, M.J., Ealley, E.L., Nevalainen, M.T., and Rui, H. (2005).** Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells. *Oncogene* 24, 746-760.
- Taga, T., and Kishimoto, T. (1997).** Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15, 797-819.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997).** Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801-3804.
- Tanase, M., Biais, N., and Sheetz, M. (2007).** Magnetic tweezers in cell biology. *Methods Cell Biol* 83, 473-493.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J.N. (1998).** Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-850.
- Thangaraju, M., Rudelius, M., Bierie, B., Raffeld, M., Sharan, S., Hennighausen, L., Huang, A.M., and Sterneck, E. (2005).** C/EBPdelta is a crucial regulator of pro-apoptotic gene expression during mammary gland involution. *Development* 132, 4675-4685.
- Thoumine, O., Ott, A., Cardoso, O., and Meister, J.J. (1999).** Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *J Biochem Biophys Methods* 39, 47-62.
- Tischoff, I., Hengge, U.R., Vieth, M., Eil, C., Stolte, M., Weber, A., Schmidt, W.E., and Tannapfel, A. (2007).** Methylation of SOCS-3 and SOCS-1 in the carcinogenesis of Barrett's adenocarcinoma. *Gut* 56, 1047-1053.
- Topper, Y.J., and Freeman, C.S. (1980).** Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60, 1049-1106.
- Turkson, J., Kim, J.S., Zhang, S., Yuan, J., Huang, M., Glenn, M., Haura, E., Sebt, S., Hamilton, A.D., and Jove, R. (2004).** Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol Cancer Ther* 3, 261-269.
- Urtreger, A., Ladedda, V., Puricelli, L., Rivelli, A., Vidal, M.C., Lustig, E., and Bal de Kier Joffe, E. (1997).** Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated to

- the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int Journal of Oncol* 11, 7.
- Vallania, F.,** Schiavone, D., Dewilde, S., Pupo, E., Garbay, S., Calogero, R., Pontoglio, M., Provero, P., and Poli, V. (2009). Genome-wide discovery of functional transcription factor binding sites by comparative genomics: the case of Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5117-5122.
- Van Vliet, K.J.,** Bao, G., and Suresh, S. (2003). The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules *Acta Materialia* 51, 24.
- Vasilevskaya, I.,** and O'Dwyer, P.J. (2003). Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy. *Drug Resist Updat* 6, 147-156.
- Vultur, A.,** Cao, J., Arulanandam, R., Turkson, J., Jove, R., Greer, P., Craig, A., Elliott, B., and Raptis, L. (2004). Cell-to-cell adhesion modulates Stat3 activity in normal and breast carcinoma cells. *Oncogene* 23, 2600-2616.
- Wagner, K.U.,** Krempler, A., Triplett, A.A., Qi, Y., George, N.M., Zhu, J., and Rui, H. (2004). Impaired alveologenesis and maintenance of secretory mammary epithelial cells in Jak2 conditional knockout mice. *Mol Cell Biol* 24, 5510-5520.
- Walker NI, Bennett RE, and JF., K.** (1989). Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am J Anat* 185, 13.
- Wang, F.,** Seta, Y., Baumgarten, G., Engel, D.J., Sivasubramanian, N., and Mann, D.L. (2001). Functional significance of hemodynamic overload-induced expression of leukemia-inhibitory factor in the adult mammalian heart. *Circulation* 103, 1296-1302.
- Watson, C.J.** (2001). Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 115-127.
- Watson, C.J.** (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* 8, 203.
- Watson, C.J.,** and Burdon, T.G. (1996). Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Rev Reprod* 1, 1-5.
- Watson, C.J.,** and Khaled, W.T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* 135, 995-1003.
- Watson, C.J.,** and Miller, W.R. (1995). Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer* 71, 840-844.
- Weber, A.,** Hengge, U.R., Bardenheuer, W., Tischoff, I., Sommerer, F., Markwarth, A., Dietz, A., Wittekind, C., and Tannapfel, A. (2005). SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* 24, 6699-6708.
- Wozniak, M.A.,** and Chen, C.S. (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 34-43.
- Xie, T.X.,** Wei, D., Liu, M., Gao, A.C., Ali-Osman, F., Sawaya, R., and Huang, S. (2004). Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23, 3550-3560.

- Xu, D., and Qu, C.K.** (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* 13, 4925-4932.
- Yamazaki, T., Tobe, K., Hoh, E., Maemura, K., Kaida, T., Komuro, I., Tamemoto, H., Kadowaki, T., Nagai, R., and Yazaki, Y.** (1993). Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268, 12069-12076.
- Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S.M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D.E., and Stark, G.R.** (2005). Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 65, 939-947.
- Ying, B., Fan, H., Wen, F., Xu, D., Liu, D., Yang, D., Chen, G., Dou, L., and Jiang, F.** (2006). Mechanical strain-induced c-fos expression in pulmonary epithelial cell line A549. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 369-372.
- Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C., and Herman, J.G.** (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28, 29-35.
- Yu, H., and Jove, R.** (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4, 97-105.
- Zaragoza, R., Garcia, C., Rus, A.D., Pallardo, F.V., Barber, T., Torres, L., Miralles, V.J., and Vina, J.R.** (2003). Inhibition of liver trans-sulphuration pathway by propargylglycine mimics gene expression changes found in the mammary gland of weaned lactating rats: role of glutathione. *Biochem J* 373, 825-834.
- Zhang, Q., Thomas, S.M., Xi, S., Smithgall, T.E., Siegfried, J.M., Kamens, J., Gooding, W.E., and Grandis, J.R.** (2004). SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. *Cancer Res* 64, 6166-6173.
- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C., and Chen-Kiang, S.** (1995). Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 267, 1990-1994.
- Zhao, L., Hart, S., Cheng, J., Melenhorst, J.J., Bierie, B., Ernst, M., Stewart, C., Schaper, F., Heinrich, P.C., Ullrich, A., et al.** (2004). Mammary gland remodeling depends on gp130 signaling through Stat3 and MAPK. *J Biol Chem* 279, 44093-44100.
- Zhao, L., Melenhorst, J.J., and Hennighausen, L.** (2002). Loss of interleukin 6 results in delayed mammary gland involution: a possible role for mitogen-activated protein kinase and not signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* 16, 2902-2912.