

Tesis Doctoral

Efecto de compuestos alfa2 y beta-adrenérgicos en modelos experimentales de cáncer de mama humano

Pérez Piñero, Cecilia

2011

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

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

Cita tipo APA:

Pérez Piñero, Cecilia. (2011). Efecto de compuestos alfa2 y beta-adrenérgicos en modelos experimentales de cáncer de mama humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pérez Piñero, Cecilia. "Efecto de compuestos alfa2 y beta-adrenérgicos en modelos experimentales de cáncer de mama humano". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**EFECTO DE COMPUESTOS ALFA2 Y BETA-
ADRENÉRGICOS EN MODELOS
EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA
HUMANO**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Cecilia Pérez Piñero

Director de tesis: Dra. Isabel A. Lüthy

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

Buenos Aires, 2011.

EFECTO DE COMPUESTOS ALFA2 Y BETA-ADRENÉRGICOS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA HUMANO

La expresión de receptores β -adrenérgicos (RA- β) es conocida tanto en células tumorales mamarias humanas como en modelos experimentales. Sin embargo, el efecto descrito para agonistas y antagonistas sobre la proliferación celular y crecimiento tumoral es paradójico, impidiendo su utilización como terapia adyuvante, especialmente en tumores refractarios.

La expresión de RA- β_2 fue confirmada en las células humanas por inmunofluorescencia y RT-PCR. La incorporación de [3 H]-timidina se encontró aumentada por epinefrina (por acción RA- α_2) y disminuida por los agonistas β , isoproterenol o β_2 salbutamol. Estos agonistas redujeron el crecimiento de los tumores estudiados (IBH-4 e IBH-6). Este efecto fue revertido por el antagonista β -adrenérgico propranolol. El antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina y los agonistas β -adrenérgicos isoproterenol y salbutamol fueron igualmente eficaces disminuyendo el crecimiento tumoral y la activación de Erk1/2 (fosforilación analizada por *western blot*). La señalización de estos RA en cuanto a la disminución de la fosforilación de Erk1/2 demostró ser dependiente de AMPc y de la activación de la PKA.

Cuando se realizaron experimentos de migración, se reveló un efecto modulador de este fenómeno por parte de los compuestos adrenérgicos, tanto por parte de las catecolaminas endógenas epinefrina y norepinefrina como de los agonistas β -adrenérgicos.

En los modelos experimentales de cáncer de mama estudiados, los agonistas β -adrenérgicos inhiben la proliferación celular y el crecimiento tumoral. Este efecto está probablemente mediado por la inhibición de la fosforilación de Erk1/2. Estos compuestos fueron tan eficaces como el antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina, brindando la posibilidad de evaluar nuevas terapias adyuvantes para el tratamiento del cáncer de mama.

Palabras Clave: tumores mamarios, salbutamol, isoproterenol, propranolol, rauwolscina, receptores adrenérgicos.

ALPHA2 AND BETA-ADRENERGIC ACTION ON HUMAN BREAST CANCER MODELS

β -adrenoceptor (β -AR) expression is known in both human breast cancer cells and experimental animal models. However, the reported effect of the agonists and antagonists on cell proliferation and tumour growth is paradoxical, precluding their utilization as possible adjuvant therapy, mainly in the cases of refractory tumours.

β_2 -AR expression was confirmed in the human cells tested by immunofluorescence and RT-PCR. [3 H]-thymidine incorporation was increased by epinephrine (by α_2 -AR action) and decreased in every tested cell line by the β -agonist isoproterenol and/or the β_2 -agonist salbutamol. Isoproterenol and/or salbutamol reduced tumour growth in both tumours tested (IBH-4, IBH-6). This effect was reversed by the β -adrenergic antagonist propranolol. The α_2 -adrenergic antagonist rauwolscine and the β -adrenergic agonists isoproterenol or salbutamol performed equally well in lowering tumour growth. Erk1/2 phosphorylation inhibition was mainly mediated by the PKA pathway.

When the migration potential was assessed, the endogenous catecholamines and also β -adrenergic compounds were able to modulate the migration of the cells.

In the experimental models studied, the β -adrenergic agonists inhibit breast cancer cell proliferation and tumour growth. This effect is probably mediated by Erk1/2 phosphorylation inhibition. The β -adrenergic agonists perform equally well as the α_2 -adrenergic antagonist rauwolscine, providing possible novel therapeutic adjuvant treatments for breast cancer.

Keywords: mammary tumour, salbutamol, isoproterenol, propranolol, rauwolscine, adrenoceptors.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Fundación Sales, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2004-05-26046) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (PIP 2004 # 5351 y PIP 2009 # 692).

Quiero agradecer muy especialmente,

A Isabel, por darme lugar en el laboratorio cuando todavía no sabía lo que era hacer investigación. Por permitirme crecer profesionalmente durante todos estos años con mucha libertad y al mismo tiempo estar presente para ayudarme y guiarme. Gracias!!

A las chicas del laboratorio, Ari y Lilo. Gracias por todo!! Desde la ayuda con los westerns, las células y los ratones hasta los mates compartidos. A Gabita, por su ayuda y amistad durante el tiempo que estuvo con nosotras!!

Al Dr. Enschladen y toda la gente del laboratorio de Alemania (Carina, Janina, Sonja, etc). Por abrirme las puertas de su instituto y mostrarme como se trabaja del otro lado del Atlántico.

Al Dr. Hugo Gass del Hospital Zonal General de Agudos "Magdalena V. de Martínez" de Tigre y la Fundación Oncológica Encuentro por las muestras de pacientes.

A la gente del "pasillo", por hacer más llevadero el trabajo y estar siempre dispuestos a dar una mano cuando es necesaria: Vanina, Paula, Virginia, Marin, JC, Lucre, Mariel, Ines, Gaby, Juani, Ana, Carli, Vale, Leopoldin, Aleja, Lara y Flor. A la gente de zonas aledañas: Juan, Panza, Toti, Rami, etc. Por los mates después de las 19hs...

A todos los integrantes del laboratorio Lanari, actuales y pasados. Gracias por los infinitos préstamos, charlas y consejos!

A la Dra. Claudia Lanari, por aceptarme en la nueva etapa que voy a emprender próximamente.

A las chicas del bioterio, Nati y Pao. Por ayudarme siempre con mis ratonas.

A todos los que de alguna forma colaboraron con esta tesis prestando reactivos, aparatos, etc.

A mis amigos: Lilo, Mariel, Fede y Lucas. Gracias!!!!

A mi familia, por el apoyo constante.

A Diego, por estar incondicionalmente....

INDICE

ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
Epidemiología del Cáncer de Mama.....	10
Desarrollo Mamario.....	14
Clasificación del Cáncer de Mama	16
Tratamiento del Cáncer de Mama.....	20
Receptores Adrenérgicos	22
Receptores β -adrenérgicos	27
Receptores Adrenérgicos y Cáncer.....	31
Receptores Adrenérgicos en la glándula mamaria normal y en modelos tumorales de cáncer de mama.....	36
OBJETIVOS	38
Objetivo General	39
Objetivos específicos	40
MATERIALES Y MÉTODOS	42
Cultivo celular	43
Preparación de las suspensiones celulares para la inyección en ratones desnudos.....	43
Animales.....	43
Tumores	44
Tratamientos.....	44
Ensayos de Proliferación	45
Ensayos de Inmunofluorescencia e Inmunocitoquímica.....	45
Ensayos de Inmunohistoquímica para receptores β_2 -adrenérgicos	46
Técnica de TUNEL.....	47
RT-PCR.....	47
Western blot para Erk y Akt.....	48
Ensayos de migración en geles de colágeno	49
Análisis estadístico	50
RESULTADOS	51
CAPITULO I	52
Expresión de receptores adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas	53
Efecto in vitro de compuestos adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas ...	59
Efecto de compuestos adrenérgicos sobre la fosforilación de las proteínas Erk1/2 en las líneas tumorales mamarias humanas	66
CAPITULO II	71

Expresión de receptores β_2 -adrenérgicos en modelos in vivo de cáncer de mama humano	72
Efecto de compuestos β -adrenérgicos en modelos in vivo de cáncer de mama humano.	75
Mecanismos de señalización en los tumores mamarios humanos	86
CAPITULO III	91
Rol de compuestos adrenérgicos en la migración de células tumorales mamarias humanas	92
DISCUSIÓN	103
Expresión de receptores β -adrenérgicos en líneas celulares mamarias humanas	104
Efecto in vitro de compuestos β -adrenérgicos	106
Vías de señalización asociadas a la activación de los receptores β -adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas	108
Inhibición β -adrenérgica del crecimiento tumoral	112
Comparación de acciones α_2 y β -adrenérgicas sobre el crecimiento tumoral	115
Mecanismos de señalización involucrados en el crecimiento tumoral.....	117
Rol de compuestos adrenérgicos en la migración de células tumorales mamarias humanas	121
CONCLUSIÓN	131
BIBLIOGRAFÍA	133

ABREVIATURAS

ADN Acido desoxirribonucleico	PBS Buffer fosfato salino
ADNc Acido desoxirribonucleico copia	PCR Reacción en cadena de la polimerasa
ARNm Acido ribonucleico mensajero	Prop Propanolol o propranolol
CAF Fibroblastos asociados a tumor	RA Receptores adrenérgicos
CDIS Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Rau Rauwolscina
Dex Dexmedetomidina	RA-α Receptor <i>alfa</i> adrenérgico
DMEM/F12 medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Ham-F12 (1:1)	RA-β Receptor <i>beta</i> adrenérgico
EC₅₀ Concentración efectiva 50	RE Receptor de estrógenos
EGF Factor de crecimiento epidermal	REα Receptor de estrógenos <i>alfa</i>
EGFR Receptor del factor de crecimiento epidérmico	REβ Receptor de estrógenos <i>beta</i>
EPAC Proteína intercambiadora activada directamente por AMPc	RP Receptor de progesterona
FITC Isotiocianato de fluoresceína	RT Reacción de retrotranscripción
FSK Forskolina	Salb Salbutamol
GAPDH gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	SERM Modulador selectivo del receptor de estrógenos
GPCR Receptores acoplados a proteína G	SFB Suero fetal bovino
GRK Quinasa de receptores acoplados a proteína G	Src Tirosina Quinasa Src
Iso Isoproterenol	TBS Buffer Tris Salino
MAPK o Erk1/2 Proteínas quinasas activadas por mitógenos p44/42 o quinasas activadas por señales extracelulares	TK Tirosina Quinasa
	VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular
	WB Western blot

INTRODUCCIÓN

Epidemiología del Cáncer de Mama

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres (23%) con una estimación de 1,38 millones de casos nuevos en el año 2008 (Ferlay y col., 2010). Es el cáncer más común tanto en regiones en desarrollo como en países industrializados, con un estimado de 690.000 nuevos casos en cada región (Ferlay y col., 2010).

Las tasas de incidencia varían desde 19,3 por 100.000 mujeres en Africa del Este hasta 89,9 por 100.000 en Europa del Este, siendo mayores en países industrializados y menores en países en desarrollo (Ferlay y col., 2010). Estos datos están representados en la figura 1.

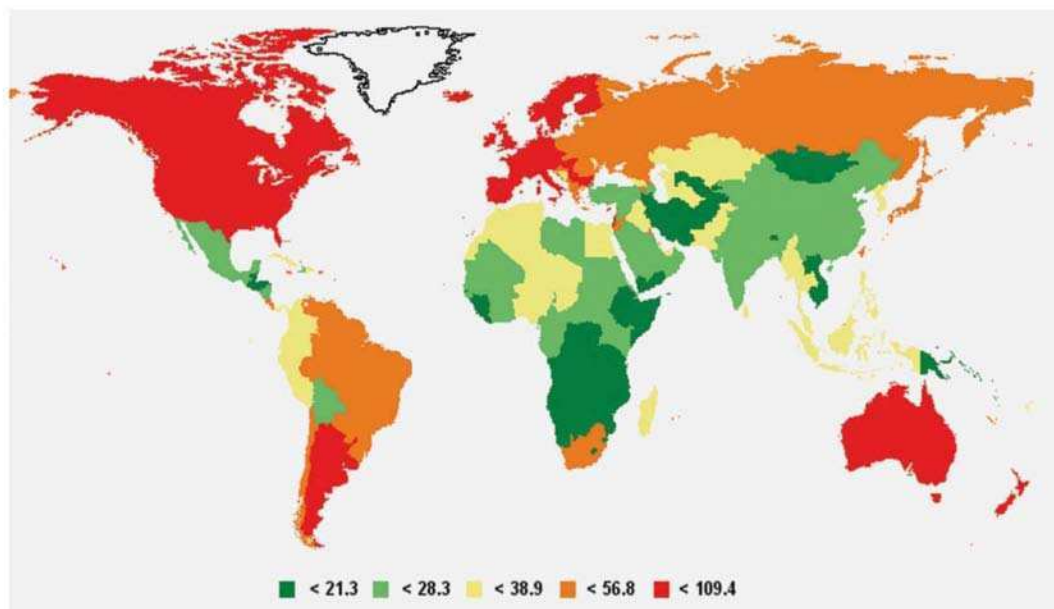


Figura 1. Incidencia global de cáncer de mama. Tomado de Ferlay y col., 2010.

Los índices de mortalidad por esta enfermedad (458.000 muertes, 13,7%) son muy disímiles a los de incidencia, ubicándose en primer lugar y seguido por cáncer de pulmón (12,8%) cuando se considera a las mujeres en la mayoría de los países del mundo (Ferlay y col., 2010). En Estados Unidos, el número de muertes estimadas por cáncer de pulmón supera a la mortalidad estimada por cáncer de mama (Jemal y col., 2009). En la figura 2 se muestra un gráfico comparando la incidencia y la mortalidad por cáncer de mama según la localización geográfica.

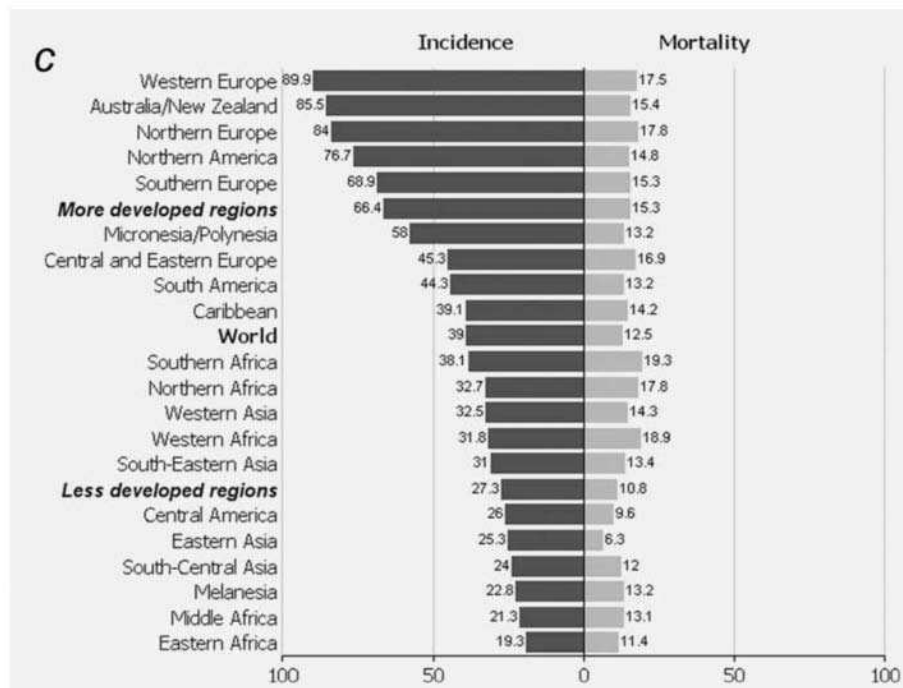


Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de mama. Tomado de Ferlay y *col.*, 2010.

En nuestro país hay un trabajo recientemente publicado por el Ministerio de Salud de la Nación el cual provee datos epidemiológicos de la enfermedad. La mortalidad anual por

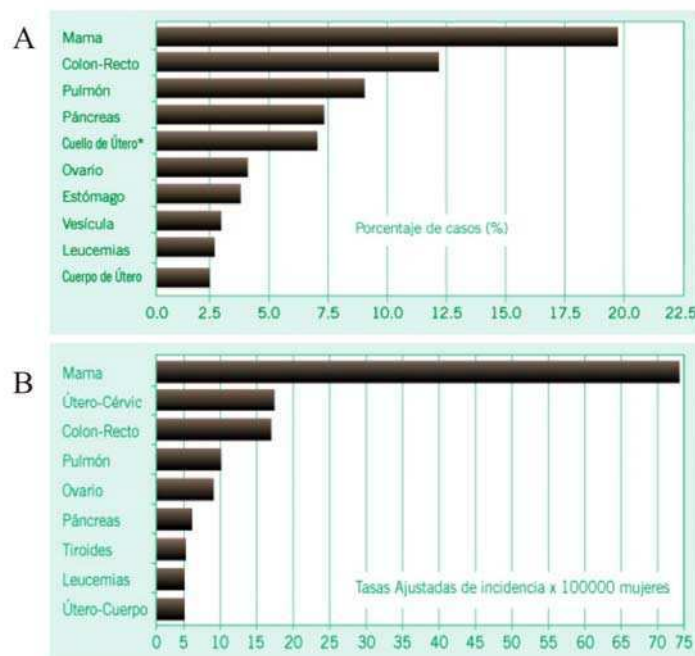


Figura 3. Tasa de mortalidad por cáncer en Argentina (Panel A) y tasa de incidencia en las principales localizaciones en mujeres de Argentina (Panel B). Tomado de Viniegra y *col.*, 2010.

esta enfermedad en el año 2009 fue de 5400 mujeres (Viniegra y *col.*, 2010). Asimismo, como puede observarse en la figura 3, la mama es el sitio de mayor incidencia en mujeres para el desarrollo de neoplasias (Viniegra y *col.*, 2010).

El pronóstico del cáncer de mama es generalmente bastante bueno, como se ilustra en la tasa estimada de supervivencia de la figura 4. El promedio de supervivencia, luego de 5 años desde la fecha de diagnóstico, es del 73% en países desarrollados y del 57% en países en desarrollo (Parkin y *col.*, 2005).

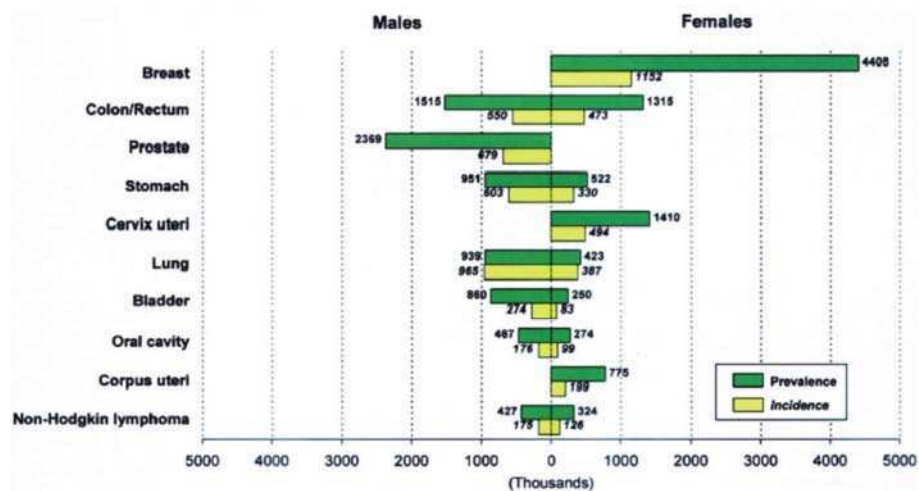


Figura 4. Número estimado de nuevos casos de cáncer (incidencia) y casos prevalentes (supervivencia de 5 años) en el 2002. Los datos se muestran por tipo de cáncer y sexo (Tomado de Parkin y *col.*, 2005).

El riesgo de contraer la enfermedad aumenta con la edad, la mayoría de los casos ocurre en mujeres de 50 años o mayores (Stamp, 2002, Biglia y *col.*, 2004). Factores genéticos, incluyendo los genes de mayor susceptibilidad (BRCA-1 y BRCA-2), pueden ser los responsables de hasta el 10% de los casos de cáncer desarrollados en países del primer mundo. La mayoría de los casos, podrían deberse a diferentes exposiciones ambientales (Parkin, 2004).

La incidencia del cáncer de mama comienza en los primeros años de edad reproductiva y continua aumentando en mujeres de 50 años o mayores. La edad y la localización geográfica son factores determinantes en el riesgo de padecer esta enfermedad. Además, la historia familiar de cáncer de mama y las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 también aumentan el riesgo de enfermedad (Hulka y Moorman, 2008). En mujeres postmenopáusicas el aumento en la densidad mamaria aumenta el riesgo de neoplasia así como la hiperplasia atípica y alteraciones moleculares en lesiones benignas de la glándula (Hulka y Moorman, 2008, Martin y *col.*, 2009).

El uso de anticonceptivos orales de manera prolongada y la terapia de reemplazo hormonal también han sido clasificados como factores de riesgo (Hulka y Moorman, 2008, Casey y *col.*, 2008). La utilización de tamoxifeno y otros moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (RE) reducen el riesgo de cáncer de mama en mujeres con alta probabilidad de padecer la enfermedad (Hulka y Moorman, 2008).

También existen factores ambientales y de la dieta que pueden aumentar el riesgo, como el consumo de alcohol (Parkin, 2004, Hulka y Moorman, 2008).

Con respecto a las hormonas y el cáncer de mama, aproximadamente el 80% de los carcinomas mamarios son positivos para el receptores de estrógeno (RE) y los tumores primarios pueden ser influenciados por los estrógenos circulantes (Folkerd y Dowsett, 2010). Asimismo la síntesis local de estrógenos en tejidos como la mama, puede resultar en concentraciones tisulares de la hormona mucho más elevadas que las de la circulación. Este hecho ocurre en tumores de mujeres postmenopáusicas, en donde los niveles de estrógenos intratumorales pueden ser hasta 8 veces mayores que los circulantes en plasma (Folkerd y Dowsett, 2010).

La progesterona también está asociada a un mayor riesgo de cáncer de mama. Un gran número de mujeres postmenopáusicas que recibieron terapia de reemplazo hormonal (estrógenos+progestágenos) tuvieron mayor incidencia de cáncer de mama en comparación con mujeres tratadas únicamente con estrógenos. Actualmente, es importante evaluar si el uso de progesterona en mujeres premenopáusicas provoca un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad (Campagnoli y *col.*, 2009).

Resumiendo, la etiología del cáncer de mama es aún pobremente comprendida. Los factores de riesgo identificados explican solamente una pequeña proporción de casos. Los mismos son edad, localización geográfica (país de origen), nivel socioeconómico, factores reproductivos, hormonas exógenas en edad temprana (anticonceptivos orales), factores de riesgo relacionados con el estilo de vida (alcohol, dieta, obesidad y actividad física), historia familiar de cáncer de mama, densidad mamográfica, historia de ciertas enfermedades benignas de la mama, radiación ionizante, densidad ósea, altura, niveles séricos de IGF-1 y prolactina. Adicionalmente, existen algunos factores genéticos, como los genes de alta penetrancia (BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, ATM, NBS1 or LKB1) y los de baja penetrancia como citocromos P450, la familia de glutatión S-transferasa (GSTM1, GSTP1), genes de reparación del ADN (XRCC1, XRCC3, ERCC4/XPF) y también genes relacionados con los sistemas de señalización (PR, ER, TNF- α o HSP70)

(Feigelson y *col.*, 2008, Hulka y Moorman, 2008, Martin y *col.*, 2009, Nasir y *col.*, 2009, Campagnoli y *col.*, 2009, Casey y *col.*, 2008, Fackenthal y Olopade, 2007, Mueck y *col.*, 2004, Biglia y *col.*, 2004, Parkin, 2004, Narod, 2010, Swaminathan y *col.*, 2008, Clevenger y *col.*, 2003, Tworoger y Hankinson, 2008).

Desarrollo Mamario

La mama es un órgano bilateral que atraviesa cambios dramáticos en tamaño, forma y función en relación con el crecimiento durante la infancia, la pubertad, el embarazo, la lactancia y la regresión post-menopáusica (Russo y Russo, 2004, Russo y Russo, 2008). Es uno de los pocos órganos que no está completamente desarrollado luego del nacimiento. Se desarrolla progresivamente desde la infancia a la pubertad, bajo el estímulo de la hipófisis y las hormonas ováricas (Russo y *col.*, 2001a). La condición de diferenciación total es alcanzada hacia el final de un embarazo completo, bajo estímulos de nuevos órganos endocrinos como la placenta y la liberación de hormonas por el mismo embrión en desarrollo (Russo y *col.*, 2001a).

El desarrollo de la mama está rigurosamente controlado por el ovario y puede ser definido por varios parámetros tales como la apariencia externa, el área total, el volumen, el grado de ramificación, el número de estructuras presentes en la glándula y el grado de diferenciación de las estructuras individuales (lóbulos y alvéolos) (Russo y *col.*, 2002a, Russo y Russo, 2008).

El aumento del tejido glandular se debe al crecimiento y la división de los pequeños brotes de los ductos primarios y secundarios. Estos crecen, dividiéndose dicotómicamente. Los ductos forman brotes terminales (TEB). Los brotes terminales luego darán origen a nuevas ramas y brotes alveolares (Russo y Russo, 2008, Russo y Russo, 2004). En la figura 5 se esquematizan las estructuras lobulares de la mama humana.

Se sabe que el riesgo de desarrollar cáncer de mama muestra una relación inversa con haber atravesado un embarazo a término en edad temprana. Este rol de protección parecería estar relacionado con el intervalo de tiempo entre la menarca y el primer embarazo, ya que se ha observado un riesgo mayor de desarrollar la enfermedad cuando este intervalo temporal supera los 14 años. Entonces, el embarazo para ser protector debe ocurrir antes de los 30 años de edad (Russo y Russo, 2004).

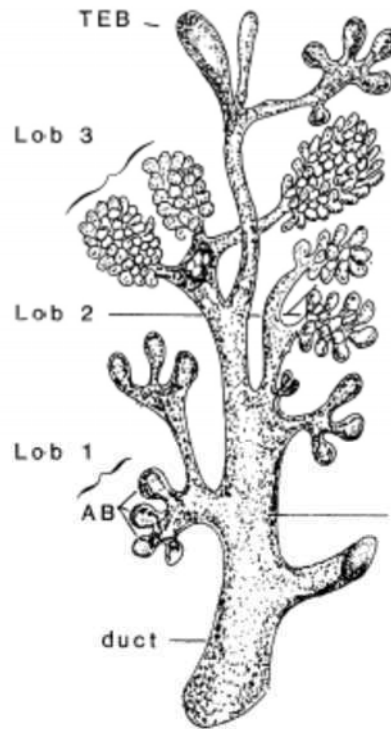


Figura 5. Representación de las estructuras lobulares de la mama humana. Tomado de Russo y *col.*, 2004.

La glándula mamaria está compuesta por el parénquima mamario, formando un sistema de ductos ramificados a partir de los cuales se desarrollan los acinos; y el estroma adiposo, el cual provee el sustrato sobre el que se desarrolla y funciona el parénquima.

A través de estudios de desarrollo mamario normal y de carcinogénesis mamaria espontánea o inducida emerge un concepto importante: el lóbulo tipo 1, es decir, la estructura más indiferenciada presente en la mama de mujeres jóvenes nulíparas ha sido determinado como el sitio de origen de los carcinomas ductales. El lóbulo tipo 1 es afectado por procesos pre-neoplásicos y neoplásicos (Russo y Russo, 2008, Russo y *col.*, 2002a).

Se encontró que las estructuras lobulares más diferenciadas también pueden ser afectadas por lesiones neoplásicas. Estas lesiones originan tumores con un tipo histológico y malignidad que presentan una relación inversa al grado de diferenciación de la estructura en la cual se originó la lesión (Russo y Russo, 2008). Las estructuras mamarias más indiferenciadas originan lesiones neoplásicas más agresivas. Esto tiene importancia clínica, ya que éstas son más numerosas en mujeres nulíparas, las cuales estarían frente a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Russo y Russo, 2008, Russo y *col.*, 2001b, Russo y *col.*, 2002a).

Se sabe que los estrógenos y la progesterona promueven la proliferación y diferenciación del epitelio mamario normal. Clásicamente ambas hormonas esteroides actúan a través de un receptor nuclear que, en su estado activo, regula la expresión de genes específicos. Sin embargo, el mecanismo a través del cual estas moléculas provocan su acción mitogénica y la diferenciación celular no ha sido claramente establecido (Russo y Russo, 2008, Lanigan y *col.*, 2007). Uno de los mecanismos de acción clásico para estas hormonas esteroides postula que la proliferación celular es la respuesta a una estimulación directa, como resultado de la interacción del estradiol (E₂) unido al receptor de estrógenos (RE) y el ADN (Russo y Russo, 2004, Russo y Russo, 2008).

Clasificación del Cáncer de Mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, la cual se desarrolla a través de un proceso continuo (Polyak, 2001, Marusyk y Polyak, 2010, Weigelt y *col.*, 2010, Vargo-Gogola y Rosen, 2007, Michor y Polyak, 2010, Polyak, 2007, Navin y Hicks, 2010). Existen lesiones premalignas, como la hiperplasia ductal atípica, la cual se caracteriza por poseer un número anormal de células en el ducto o lóbulo mamario (el tejido normal posee un epitelio con dos capas de células luminales y mioepiteliales) (Vargo-Gogola y Rosen, 2007, Stamp, 2002). Se cree que la hiperplasia es el precursor del carcinoma ductal *in situ* (CDIS), siendo el último una lesión no invasiva con células anormales. Con cada estadio, el riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo aumenta. El CDIS puede dar origen al carcinoma invasivo pero no está claro cómo predecir cuáles lesiones son las que van a progresar (Stamp, 2002, Vargo-Gogola y Rosen, 2007). Una vez que el carcinoma invadió el tejido adyacente, el riesgo de desarrollar metástasis aumenta significativamente, siendo habitualmente los ganglios linfáticos los primeros sitios de metástasis (Vargo-Gogola y Rosen, 2007). Todos estos estadios se ejemplifican en la figura 6.

La clasificación más utilizada en la clínica es la de receptores hormonales. Se utilizan como marcadores el receptor de estrógeno (RE α), el receptor de progesterona (RP) y el receptor HER2/neu (Kurian y *col.*, 2010, Stamp, 2002). Además, el descubrimiento de la heterogeneidad morfológica en el cáncer de mama está reflejada a nivel transcripcional, lo cual permitió la clasificación de la enfermedad invasiva en cinco

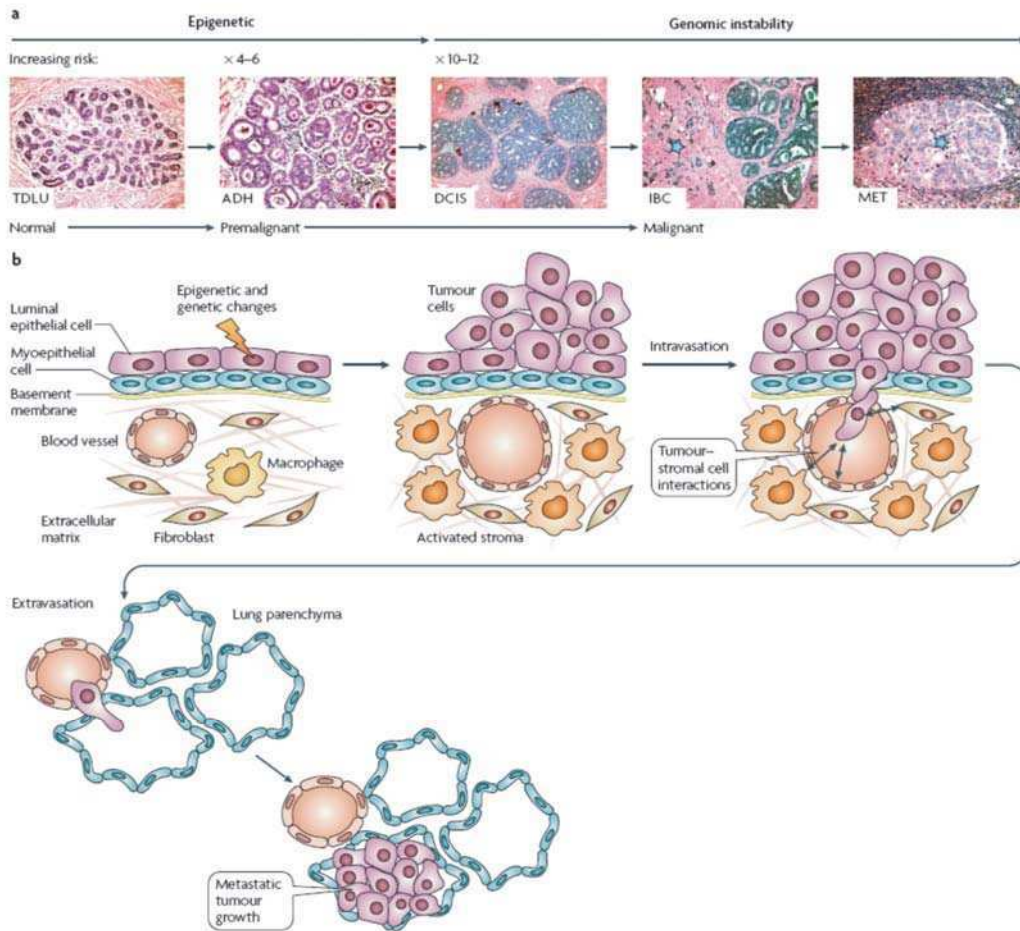


Figura 6. Biología del cáncer de mama. TDLU: unidades lobulares de los ductos terminales; ADH: hiperplasia ductal atípica; DCIS: carcinoma ductal *in situ*; IBC: carcinoma de mama invasor; MET: metástasis en ganglio linfático. Tomado de Vargo-Gogola y Rosen, 2007.

grupos principales (que representan el 80% de los carcinomas mamarios invasivos): luminal A, luminal B, símil mama normal, HER2/neu positivo y carcinoma basal. Los carcinomas luminales poseen expresión moderada a alta del RE α y de citoqueratinas luminales, siendo el luminal A el de mejor pronóstico clínico (Vargo-Gogola y Rosen, 2007). Los carcinomas basales, los cuales fueron descritos como agresivos clínicamente, no expresan ninguno de los tres marcadores nombrados anteriormente, también conocidos como triples negativos (RE (-), RP(-), HER2/neu (-)) (Russo y col., 2010, Vargo-Gogola y Rosen, 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de HER2/neu es observada en 15-25% de los carcinomas invasivos de mama y también es considerada como un factor de pronóstico negativo (Knauer y col., 2010).

Con respecto al origen de la enfermedad, el paralelismo encontrado entre las células progenitoras o células madre (*stem cells*) de la mama y las células tumorales ha llevado al desarrollo de teorías que postulan a las células madre tumorales como las responsables del inicio de la enfermedad (Vargo-Gogola y Rosen, 2007, Campbell y

Polyak, 2007, Petersen y Polyak, 2010, Charafe-Jauffret y *col.*, 2008). Esta teoría propone a las células madre tumorales como responsables de la iniciación, la progresión y la recurrencia tumoral ya que poseen capacidad de autorrenovación y diferenciación. Además derivan de las células madre mamarias normales presentes en la glándula luego de adquirir múltiples mutaciones que las convierten en células tumorales (Campbell y Polyak, 2007). A raíz de esta hipótesis sobre el origen del cáncer de mama, se han desarrollado una amplia gama de técnicas con el objetivo de identificar a las células madre tumorales (ejemplo: marcadores de fenotipo $CD44^+/CD24^{-/low}$) y hacerlas blanco de tratamientos específicos (Shipitsin y *col.*, 2007, Dontu, 2008, Wicha y *col.*, 2006). Esta hipótesis no puede explicar la aparición de clones resistentes a los tratamientos (Campbell y Polyak, 2007, Polyak, 2008, Polyak y Hahn, 2006).

Por otro lado, existe otra hipótesis sobre la iniciación tumoral y es la llamada teoría de la evolución clonal. El modelo de la evolución clonal explica a la heterogeneidad tumoral como consecuencia de la inestabilidad genómica, en donde las células adquieren a lo largo del tiempo varias combinaciones de mutaciones. Luego se selecciona las células más aptas y más agresivas en cuanto a la progresión tumoral. Entonces, la iniciación tumoral ocurre una vez que múltiples mutaciones tuvieron lugar en una única célula, otorgándole una ventaja adaptativa con respecto a las células vecinas (Polyak, 2008, Campbell y Polyak, 2007, Polyak y Hahn, 2006). A medida que el tumor progresa la inestabilidad genética y la proliferación descontrolada permiten la producción de nuevas células con mutaciones adicionales y con nuevas características. Cualquier célula tumoral podría ser potencialmente invasiva, causar metástasis y adquirir resistencia a las terapias produciendo recurrencia de la enfermedad (Campbell y Polyak, 2007, Polyak y Hahn, 2006).

También hay que destacar la importancia del microambiente tumoral en el desarrollo y la progresión tumoral. La glándula mamaria está compuesta por varios tipos celulares, cuya estrecha relación permite el normal desarrollo de la misma así como cumplir con su función fisiológica (Polyak y Kalluri, 2010). Los ductos y los alvéolos están formados por una capa de células epiteliales luminales secretoras de leche, durante la lactancia y esta capa está rodeada por células mioepiteliales, ubicadas justo por encima de la membrana basal (Polyak y Kalluri, 2010). El estroma adyacente está compuesto por matriz extracelular y una variedad de tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales, leucocitos) y provee no sólo sostén para la glándula sino que regula la

función del epitelio mamario a través de interacciones parácrinas, físicas y hormonales (Polyak y Kalluri, 2010). En la figura 7 se esquematiza el microambiente tumoral.

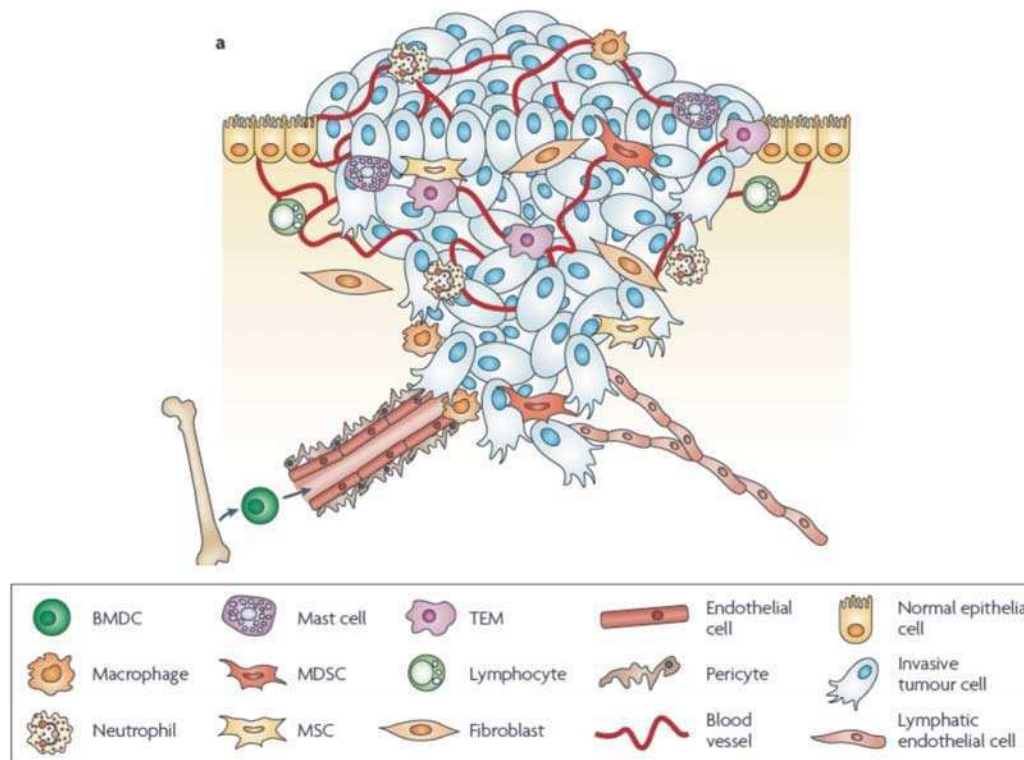


Figura 7. Microambiente tumoral. Las células tumorales se encuentran rodeadas de un complejo microambiente formado por una amplia variedad de células, incluyendo células endoteliales linfáticas y sanguíneas, fibroblastos estromales, células derivadas de médula ósea incluyendo macrófagos, células mieloides supresoras, monocitos expresando TIE2 (Receptor de Angiopoyetina 2) y células madre mesenquimales. BMDC: células derivadas de médula ósea; MDSC: células mieloides supresoras; TEM: Monocitos expresando TIE-2; MSC: células madre mesenquimales. Tomado de Joyce y Pollard, 2009.

Los tumores mamarios generalmente se inician en el compartimento epitelial y en las fases iniciales están confinados a los ductos glandulares hasta que se transforman en tumores invasivos y atraviesan la membrana basal (Polyak y Kalluri, 2010). Esta ruptura de la membrana basal ocurre debido a una combinación de señales emitidas tanto por las células epiteliales del tumor como por las células estromales (Polyak y Kalluri, 2010).

A lo largo de la progresión tumoral, se ha descubierto que el estroma próximo a las células tumorales atraviesa cambios genotípicos y epigenéticos (Li y col., 2007, Tyan y col., 2011). Entre los componentes estromales, los fibroblastos demostraron poseer un rol predominante en la progresión tumoral. En cáncer de mama, se propuso que los fibroblastos están “activados” colaborando con el desarrollo del tumor (Tyan y col.,

2011). Estudios recientes demostraron que los fibroblastos asociados a tumores derivados de carcinomas mamarios invasivos, también conocidos como CAF (*cancer-associated fibroblasts*), poseen un mayor potencial para promover el crecimiento tumoral y la angiogénesis en comparación con fibroblastos provenientes de mama normal (Tyan y col., 2011, Orimo y col., 2005, Fabris y col., 2010). Estos resultados sugieren que las células tumorales pueden alterar a los fibroblastos vecinos de forma tal que estos últimos influyan sobre el proceso de tumorigénesis.

Además, los cambios en el estroma muchas veces acompañan la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis (Krause y col., 2010, Egeblad y Werb, 2002, Bissell y Radisky, 2001, Joyce y Pollard, 2009). Algunos de estos cambios pueden ser la inducción o sobreexpresión de moléculas como factores de crecimiento, enzimas encargadas de degradar matriz extracelular, factores angiogénicos y citoquinas (Krause y col., 2010, Hofmeister y col., 2008, Joyce y Pollard, 2009).

Tratamiento del Cáncer de Mama

En general, el cáncer de mama es dependiente de hormonas. El riesgo de desarrollar esta enfermedad ha sido ligado tradicionalmente a la exposición a estrógenos, ya que la mayoría de los tipos de cáncer mamario poseen receptores para esta hormona (Russo y col., 2002a, Russo y col., 2002c). El contenido de RE α en un tumor mamario es considerado un factor de importancia en el pronóstico de la enfermedad. El descubrimiento del subtipo RE β permite pensar que aquellas células antes consideradas RE α negativas puedan ser positivas para este otro subtipo de receptor (RE β) (Russo y col., 2002a, Russo y col., 2002b). El RE β se expresa sólo y también se co-expresa con RE α en el tejido mamario normal y canceroso. Se ha sugerido que la presencia de RE β antagoniza los efectos de RE α en el epitelio mamario, ya que durante la lactancia su expresión es máxima y la isoforma dominante co-represora está aumentada (Kass y col., 2004).

El rol predominante asignado al RE α como fundamental en el origen y evolución del fenotipo tumoral en cáncer de mama ha sido puesto en duda por hallazgos clínicos y experimentales, los cuales sugieren que el receptor de progesterona juega un papel igualmente importante (Lanari y col., 2009, Chlebowski y col., 2003, Beral, 2003).

Las manipulaciones endócrinas se encuentran entre las terapias sistemáticas más efectivas y menos tóxicas disponibles para el tratamiento del cáncer de mama (Clarke y *col.*, 2001, Alvarez y *col.*, 2010). Las drogas antiestrogénicas son efectivas en pacientes pre y postmenopáusicas, y se utilizan como adyuvantes en enfermedad metastásica y como prevención química. Estas drogas son bien toleradas generando una respuesta positiva en el 70% de las pacientes seleccionadas para el tratamiento por la presencia de receptores hormonales (Clarke y *col.*, 2001, Alvarez y *col.*, 2010, Jordan y *col.*, 2009). Un beneficio adicional de algunos moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), es la reducción del riesgo y severidad de osteoporosis (Clarke y *col.*, 2001, Alvarez y *col.*, 2010, Jordan y O'malley, 2007, Jordan y *col.*, 2009). El antiestrógeno más utilizado es el tamoxifeno, el cual se administra oralmente como citrato (Clarke y *col.*, 2001, Alvarez y *col.*, 2010, Jordan y O'malley, 2007, Jordan y *col.*, 2009).

Los beneficios de los SERM incluyen el mejoramiento del intervalo libre de enfermedad y la sobrevida por cáncer de mama. Sin embargo, la mayoría de las pacientes que inicialmente respondían al tratamiento experimentan resistencia a estas drogas (Clarke y *col.*, 2001, Alvarez y *col.*, 2010, Alvarez, 2010). Entre los posibles mecanismos involucrados en la resistencia se encuentran la inmunidad del huésped, su endocrinología, la farmacocinética del antiestrógeno y la competencia de la misma con ligandos endógenos (Clarke y *col.*, 2001, Alvarez y *col.*, 2010, Alvarez, 2010). En los últimos años, los inhibidores de aromatasa se han convertido en una terapia hormonal de primera línea en pacientes con cáncer de mama avanzado con tumores positivos para receptores hormonales (Dowsett y *col.*, 2005). También se describió resistencia a inhibidores de aromatasa. Esta resistencia se debe a hipersensibilidad a los estrógenos, en ausencia de los mismos, como resultado de la señalización aumentada por los factores de crecimiento (Dowsett y *col.*, 2005). Para aquellas pacientes que presentan receptores hormonales negativos, tanto con ganglios positivos como negativos, la quimioterapia sistémica mejora el tiempo libre de enfermedad y la sobrevida (Albain, 2004). Para mujeres de todas las edades carentes de co-morbilidad importante, con alto riesgo, ganglios linfáticos y receptores hormonales negativos, se recomienda considerar la quimioterapia adyuvante (Albain, 2004, Alvarez, 2010). En mujeres de mayor edad, los regímenes conteniendo antraciclina proveerían los mejores beneficios. HER-2 está sobre-expresado en el 20-25% de las pacientes y está asociado con un fenotipo tumoral agresivo y con una tasa de sobrevida disminuida. Para las pacientes que poseen HER-2 sobre-expresado, el tratamiento de elección es un anticuerpo monoclonal humanizado

dirigido contra el dominio extracelular de la proteína HER-2, el cual se llama Herceptin (trastuzumab) (Alvarez, 2010). La respuesta objetiva a la monoterapia con Herceptin es baja, entre 12 y 34%. Corrientemente la administración de Herceptin se utiliza combinada con quimioterapia como paclitaxel o docetaxel, aumentando la respuesta de la paciente, el tiempo al comienzo de la progresión y la sobrevida total con respecto a la droga sola. Sin embargo, la mayoría de las pacientes que presentan una respuesta inicial en regímenes basados en Herceptin adquieren resistencia dentro del año de tratamiento (Alvarez, 2010).

Hay 4,4 millones de sobrevivientes de cáncer de mama, y aproximadamente el 25-30% de los nuevos casos son mujeres de menos de 50 años. La terapia adyuvante prolongó la sobrevida, pero la calidad de esa sobrevida está influenciada por efectos persistentes de la terapia. Los agentes alquilantes basados en quimioterapia causan destrucción de los folículos ováricos y alteran la maduración folicular. Como resultado las pacientes presentan amenorrea reversible, menstruaciones irregulares o amenorrea irreversible. Las mujeres más jóvenes tienen un menor riesgo de amenorrea, aunque la quimioterapia puede ocasionar una menopausia precoz con todos los efectos psicológicos que ello implica (Knobf, 2006, Parkin *y col.*, 2005).

Por lo tanto, pese a toda esta gama de terapias disponibles en el presente para el cáncer de mama, la mayoría de los tratamientos poseen acciones secundarias desagradables o resistencia. Entonces, se justifica seguir buscando terapias adyuvantes que mejoren la calidad de vida de las pacientes. Asimismo, el estrés psicológico originado por el diagnóstico y tratamiento; y los compuestos adrenérgicos liberados durante el mismo, provocan consecuencias biológicas directas sobre la evolución de los tumores. Por otro lado, los compuestos adrenérgicos son administrados en la clínica para otras enfermedades y pueden influenciar la evolución del cáncer de mama. Este aspecto también debe ser estudiado adecuadamente.

Receptores Adrenérgicos

Los efectos biológicos de las catecolaminas endógenas (epinefrina y norepinefrina) son mediados por nueve subtipos diferentes de receptores adrenérgicos (Brede *y col.*, 2004). Los RA pertenecen a la familia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G (Brede *y col.*, 2004). Estos receptores regulan aspectos críticos tales como el

control de la presión sanguínea, la contractilidad del miocardio, la función pulmonar, el metabolismo y actividad del sistema nervioso central entre otros (Malbon y *col.*, 2001).

Las catecolaminas son secretadas por la médula adrenal y a partir de neuronas distribuidas en todo el sistema nervioso. La síntesis y liberación de estas hormonas está muy regulada asegurando su influencia en el estado interno del cuerpo y las funciones del organismo (Stanford, 2001). El sistema adrenérgico juega un rol importante en la regulación de la homeostasis corporal ya sea en la salud como en la enfermedad (Philipp y Hein, 2004).

En 1948 Ahlquist estableció una clasificación farmacológica para los RA mediante la utilización de aminas sintéticas (Ahlquist, 1948). Inicialmente los RA se diferenciaron en dos tipos: α y β . Los receptores α -adrenérgicos mediaban principalmente las funciones excitatorias y fueron diferenciados en 1970s en RA- α_1 y RA- α_2 . Los receptores β -adrenérgicos mediaban principalmente la función inhibitoria y una única función excitatoria (la función cardíaca). Años después, Lands propuso la división de los receptores β -adrenérgicos (Lands, 1951). En la actualidad mediante técnicas de clonado molecular se han identificado 9 subtipos de receptores adrenérgicos. Estos pueden ser divididos en tres grupos: α_1 , α_2 y β . Cada uno ellos se compone de tres subtipos de receptores. Estos subtipos son: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 , β_3 (Philipp y Hein, 2004). Debido a la falta de ligandos selectivos para los distintos subtipos de receptores, la función fisiológica precisa así como el potencial terapéutico de los mismos no ha sido totalmente elucidado (Philipp y Hein, 2004).

Los RA son parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Philipp y Hein, 2004, Robert, 2010). Los GPCR están formados por una cadena polipeptídica continua, provista de siete dominios transmembrana. Cada uno de estos dominios posee una serie de 22 a 25 aminoácidos hidrofóbicos que permiten la formación de una hélice alfa inserta entre los fosfolípidos de la membrana celular (Robert, 2010). El extremo N-terminal de los RA es extracelular, mientras que el C-terminal se encuentra en el interior de la célula.

La unión de un ligando al receptor induce un cambio conformacional, originando la transmisión de una señal al interior de la célula mediante la activación de proteínas G heterotriméricas (Rosenbaum y *col.*, 2009). Entonces, se puede considerar que los receptores existen en dos formas: una activa y otra inactiva y que la presencia de ligandos estabiliza una de las dos formas (Robert, 2010, Rosenbaum y *col.*, 2009).

Con respecto a las proteínas G, están formadas por tres subunidades heterólogas (α , β y γ), las cuales se encuentran establemente asociadas en su estado inactivo y en este estado están unidas a GDP. Al unirse al ligando correspondiente el receptor interactúa con la proteína G en el lado citoplasmático de la membrana celular, ocasionando el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G y la disociación de la misma del heterodímero $\beta\gamma$. De esta forma se inicia una cascada de señalización que actúa sobre moléculas efectoras entre las cuales se encuentran la adenilil ciclasa, la fosfolipasa C, etc (Robert, 2010).

La actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α regula la hidrólisis de GTP a GDP y la subsiguiente reasociación del complejo $\alpha\beta\gamma$ que conducirá a una proteína G inactiva. Resumiendo, las proteínas G estimulan a su sistema efector mediando el efecto fisiológico del ligando específico con el cual interacciona el receptor (Saunders y Limbird, 1999, Robert, 2010)

Las similitudes entre los miembros de la familia de RA se pierden cuando se analiza la vía señalización de cada uno de ellos. A pesar de ser capaces de unirse a muchos agonistas comunes y estar acoplados a proteínas G, los RA difieren en la especificidad y la naturaleza de su señalización río abajo (Malbon y *col.*, 2001, Urban y *col.*, 2007). La especificidad de unión a la proteína G está determinada por los dominios intracelulares del receptor, particularmente el segundo y tercer dominio y también está involucrada la región amino terminal (Degraff y *col.*, 2002).

Un gran número de drogas han sido desarrolladas para modular la señalización adrenérgica (Philipp y Hein, 2004, Kazani y Israel, 2010, Taira y *col.*, 2008). Los agonistas y antagonistas adrenérgicos constituyen la clase más grande de drogas terapéuticas prescritas para la falla cardíaca congestiva, hipertensión, asma, etc. (Taira y *col.*, 2008, Cazzola y Matera, 2008, Ho y *col.*, 2005, Pertovaara y *col.*, 2005).

Los miembros de la familia RA- α_1 transducen su unión a catecolaminas mediante la activación de proteínas Gq/11, lo cual resulta en la activación de la fosfolipasa C y en la generación de inositol fosfatos (elevando el $[Ca^{2+}]$ intracelular) y diacilglicerol (activando la proteína quinasa C). La unión de agonistas a los RA- α_1 también puede activar canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Malbon y *col.*, 2001).

Los RA- α_2 activan miembros de la familia Gi y Go, las cuales inhiben la adenilil ciclasa (disminuyendo los niveles de AMPc y la actividad de la proteína quinasa A). También

inhiben canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y activan canales de Ca^{2+} dependientes de K^+ (Malbon y *col.*, 2001).

En humanos los receptores α_2 -adrenérgicos están codificados en genes sin intrones y se localizan en cromosomas distintos según el subtipo del cual se trate: RA- α_{2A} en el cromosoma 10 (antiguamente llamado α_2 -C10), RA- α_{2B} en el cromosoma 2 (antiguamente llamado α_2 -C2) y RA- α_{2C} en el cromosoma 4 (antiguamente llamado α_2 -C4). Estos subtipos de RA- α_2 presentan áreas de homología ubicadas en la región transmembrana. Por el contrario, las áreas de heterogeneidad se ubican tanto en la región intracelular como en el dominio extracelular. Las modificaciones post-traduccionales varían según el subtipo de RA- α_2 , presetando el RA- α_{2A} glicosilación cerca del extremo N-terminal y palmitoilación cerca del extremo C-terminal, mientras que el RA- α_{2B} únicamente presenta palmitoilación en el C-terminal y el RA- α_{2C} sólo está glicosilado cerca del extremo N-terminal (Saunders y Limbird, 1999).

El hecho que muchas células expresen múltiples miembros de la familia de RA demuestra que un único ligando, como es el caso de la epinefrina, puede activar simultáneamente múltiples proteínas G acopladas a diversos efectores (Malbon y *col.*, 2001). De todas formas, cabe destacar que todos los RA- α_2 pueden ser activados por epinefrina y norepinefrina, antagonizados por yohimbina, rauwolscina y prazosin variando su afinidad relativa entre los distintos subtipos.

Con respecto a las funciones fisiológicas de los receptores α adrenérgicos, los RA- α_1 contribuyen a la regulación del tono vascular en el ratón. Los receptores α_1 han sido implicados en el desarrollo de la hipertensión e hipertrofia vascular. A pesar de su rol prominente en la regulación vascular, estos receptores también afectan la estructura cardíaca y su funcionamiento (Philipp y Hein, 2004).

Se han desarrollado ratones *knock out* para los RA- α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}). Los ratones se desarrollan aparentemente de forma normal, salvo aquellos que carecen del subtipo α_{2B} . Estos últimos no nacen con la frecuencia esperada según las leyes de Mendel, indicando que este subtipo de receptor podría cumplir un rol durante el desarrollo embrionario (Philipp y *col.*, 2002).

La principal función del RA- α_{2B} parece ser el control del desarrollo vascular en la placenta de ratón. Los ratones que carecen de los tres tipos de receptores α_2 - no sobreviven más allá del día 11,5 de gestación debido a un defecto en la formación de los

vasos sanguíneos del saco vitelino y la placenta. Los ratones deficientes en RA- α_{2A} y RA- α_{2C} se desarrollan normalmente y la delección adicional del gen RA- α_{2B} genera los defectos placentarios. Además, el RA- α_{2B} se expresa en células del trofoblasto humano, pudiendo cumplir la misma función en humanos que en ratón (Philipp y Hein, 2004, Brede y col., 2004).

Los agonistas α_2 -adrenérgicos son potentes analgésicos y pueden potenciar el efecto analgésico de los opioides. En ratones, todos los subtipos están involucrados en la regulación de la percepción del dolor. El subtipo α_{2A} media la anti-nocicepción inducida por la aplicación sistémica de agonistas α_2 incluyendo a la clonidina y la dexmedetomidina (Philipp y col., 2002).

El óxido nítrico, el cual es usado como un potente analgésico inhalante con la anestesia, requiere el subtipo α_{2B} para su efecto anti-nociceptivo. En ratones con este subtipo delecionado, el efecto analgésico del óxido nítrico es totalmente abolido (Philipp y col., 2002).

Los agonistas α_2 sintéticos son usados en la fase post-operatoria o en cuidados intensivos como sedativos, hipnóticos y agentes analgésicos. Los efectos sedativos en ratón son mediados únicamente por el subtipo de receptor α_{2A} (Philipp y col., 2002). Los RA- α_2 también afectan algunas funciones comportamentales. El subtipo α_{2C} inhibe el procesamiento de información sensorial en el sistema nervioso central del ratón. Por otro lado, la activación de los RA- α_2 resultó en la inhibición de la locomoción. Se comprobó que la activación del subtipo α_{2C} altera la ejecución de patrones espaciales y no espaciales, mientras que la estimulación de RA- α_{2A} y/o RA- α_{2B} favorece la memoria espacial en ratones (Philipp y col., 2002). Por otro lado, los RA- α_2 están involucrados en la regulación de la temperatura corporal. Dos subtipos: α_{2A} y α_{2C} podrían estar involucrados en la acción hipotérmica de los agonistas α_2 . Otras funciones importantes de los agonistas α_2 adrenérgicos es su efecto inhibitorio en la presión intraocular. Algunos se utilizan actualmente en pacientes con glaucoma para disminuir la presión intraocular (Philipp et al., 2002). En el tejido adiposo los RA- α_2 inhiben la lipólisis y son blancos potenciales para el tratamiento de la obesidad (Philipp y col., 2002).

Receptores β -adrenérgicos

En humanos, el gen del RA- β_1 se encuentra en el cromosoma 10, el β_2 en el cromosoma 5 y el β_3 en el cromosoma 8 y ninguno posee intrones, al igual que los genes de los RA- α_2 (Johnson, 2006). Los RA- β están divididos en tres grupos β_1 , β_2 y β_3 y clásicamente se los asocia a sistema cardiovascular, músculo liso del sistema respiratorio y tejido adiposo, respectivamente (Johnson, 2006). Existe un 65-70% de homología entre los diferentes subtipos de RA- β (Johnson, 2006).

El receptor β_2 -adrenérgico fue el primer tipo de receptor acoplado a proteínas G en ser clonado y es uno de los miembros más estudiados de esta familia (Rosenbaum y *col.*, 2009, Hein y Kobilka, 1995). La estimulación con agonistas adrenérgicos β_{1-3} generalmente activa la adenilil ciclasa por acción de la subunidad α_s de la proteína G, generando un aumento en los niveles de AMPc y activando la proteína quinasa A.

En el sistema cardiovascular están presentes los tres subtipos de RA- β y son funcionales tanto en los vasos sanguíneos como en el corazón. El subtipo β_1 media el efecto cronotrópico e ionotrópico de las catecolaminas endógenas, mientras que ratones con delección del RA- β_2 no presentan alteraciones en la respuesta cardíaca a las catecolaminas. Los tres subtipos de RA- β difieren en el camino de señalización intracelular así como en la localización subcelular (Philipp y Hein, 2004). Los RA- β_1 y β_2 forman la interfase entre las neuronas del sistema nervioso simpático y el músculo cardíaco. Estos dos tipos de receptores homólogos cumplen funciones diferentes en la regulación de esta función cardiovascular (Shcherbakova y *col.*, 2007). En miocitos provenientes de animales neonatos y adultos, la estimulación de los RA- β_1 promueve la activación de la subunidad α_s de la proteína G llevando a una activación de la PKA la cual lleva a un aumento en la tasa de contracción. Por el contrario, los RA- β_2 al unirse a su ligando pueden acoplarse secuencialmente tanto a proteínas $G\alpha_s$ como $G\alpha_i$, generando un efecto bifásico en la tasa de contracción independiente de la activación de PKA (Shcherbakova y *col.*, 2007). Estas diferencias funcionales observadas entre los RA- β_1 y β_2 podrían deberse a que estos receptores se encuentren en compartimentos diferentes de la membrana celular de los miocitos, y por este motivo se encuentren en compartimentos de señalización diferentes (Shcherbakova y *col.*, 2007, Xiang y *col.*, 2002b, Xiang y *col.*, 2002a).

La estimulación β -adrenérgica sostenida promueve la remodelación patológica del sistema cardiovascular, generando hipertrofia en los miocitos, apoptosis y necrosis y así contribuyendo a la insuficiencia cardíaca crónica (Zheng y *col.*, 2004). Los RA- β_1 serían los responsables de inducir la hipertrofia y la apoptosis en las células musculares, mientras que los RA- β_2 serían los encargados de mediar un efecto cardíaco protector (Zheng y *col.*, 2004). El conocimiento de los mecanismos moleculares permite sacar provecho de los β bloqueantes en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica y también realizar terapias selectivas, bloqueando los RA- β_1 y activando de forma moderada los RA- β_2 (Zheng y *col.*, 2004).

Por otro lado, los agonistas β son utilizados como medicamentos de primera línea para el tratamiento del asma y la obstrucción pulmonar crónica. Estos receptores, principalmente el subtipo β_2 , al activarse provocan la relajación del músculo liso de las vías respiratorias (Barisione y *col.*, 2010).

Determinar cómo los agonistas y antagonistas se unen a los RA- β ha sido el objetivo de varios grupos de investigación durante más de 20 años. Los GPCR existen en un equilibrio entre el estado inactivo y el estado activo en el cual se pueden acoplar a las proteínas G correspondientes (Warne y *col.*, 2011). La unión a agonistas completos como la epinefrina o norepinefrina, aumenta la probabilidad que la conformación del receptor sea la activa. En ausencia de ligando, los RA- β muestran baja actividad implicando que existe una proporción de los receptores que está en su estado activado (siendo la actividad basal del RA- β_2 cinco veces mayor que la actividad del RA- β_1) (Warne y *col.*, 2011). Se sabe que la actividad basal del RA- β_2 es importante fisiológicamente ya que existe un polimorfismo en humanos que reduce la misma (T164I) y su expresión está asociada a enfermedades cardíacas (Warne y *col.*, 2011).

Los RA- β_2 son los miembros de la familia de GPCR más caracterizados y estudiados. Los sitios de interacción entre agonista y receptor han sido caracterizados por estudios de mutagénesis. También se han estudiado mediante métodos biofísicos los cambios conformacionales asociados a la unión de agonistas (Rasmussen y *col.*, 2007). El grupo de Kobilka y colaboradores ha estudiado la relación entre estructura y función de este receptor. Mediante la unión covalente de un fluoróforo al dominio del receptor que se acopla a la proteína G (RA- β_2), se encontró que en ausencia de ligando este dominio oscila en una única conformación detectable (Ghanouni y *col.*, 2001). La unión a un antagonista no cambia esta conformación pero sí reduce la flexibilidad del dominio.

Asimismo, cuando se produce la unión de los RA- β_2 a un agonista completo, el dominio de unión a la proteína G oscila entre dos conformaciones diferentes. Mediante estudios de FRET, este grupo también reportó que el extremo C terminal de RA- β_2 es una estructura relativamente flexible y posiblemente desordenada (Granier *y col.*, 2007). Sin embargo, los cambios conformacionales provocados por la unión de ligandos específicos pueden ser detectados entre el extremo C terminal y el extremo citoplasmático del dominio transmembrana TM6. La unión de catecolaminas estudiada mediante FRET, induce cambios similares a los observados con agonistas inversos, lo cual sugiere que puede reflejar el cambio conformacional necesario para la activación de la vía de las MAPK mediada por arrestinas.

El RA- β_2 fue originalmente cristalizado unido al agonista inverso carazolol usando dos aproximaciones diferentes. Los primeros cristales fueron obtenidos a partir de RA- β_2 unido al fragmento Fab de anticuerpo que reconocía un epítoto compuesto por los aminoácidos del extremo C terminal del tercer *loop* intracelular conectando TM5 y TM6 (Rasmussen *y col.*, 2007). La segunda aproximación fue realizada reemplazando el tercer *loop* intracelular por una proteína lisosomal del fago T4 (Cherezov *y col.*, 2007).

Las estructuras cristalinas de los RA- β_2 activados por ligandos difusibles representan conformaciones inactivas unidas a agonistas inversos. A diferencia de la activación del receptor de rodopsina por la luz, los agonistas son mucho menos eficientes en estabilizar los estados activados del RA- β_2 , haciendo muy difícil capturar este estado en una estructura cristalina (Rasmussen *y col.*, 2011). Estudios con fluorescencia utilizando concentraciones saturantes del agonista completo isoproterenol no estabilizan una conformación activa del RA- β_2 (Rasmussen *y col.*, 2011). Este hecho podría deberse a la rápida tasa de disociación y asociación de los agonistas β_2 . Cuando se une covalentemente al RA- β_2 con un agonista, la estructura cristalina que se obtiene es la correspondiente al estado inactivo (Rasmussen *y col.*, 2011). Experimentos realizados por el grupo de Kobilka y colaboradores utilizando receptores β_2 marcados con una sonda fluorescente muestran que la estabilización del estado activo tiene como requisito la presencia tanto del agonista como de la proteína Gs (Rasmussen *y col.*, 2011). Por este motivo, se este mismo grupo desarrollo una proteína que se une al receptor en su estado activado y estabiliza esta conformación, actuando como reemplazo de la proteína Gs (Rasmussen *y col.*, 2011).

El conocimiento de las estructuras provee una comprensión de las diferencias farmacológicas entre las distintas clases de ligandos, permitiendo ahondar los conocimientos de las funciones de los GPCR y proporcionando una base sólida para el diseño de nuevos ligandos basado en el conocimiento de las estructuras de forma tal de poder tener eficacias predictivas de los mismos (Warne *y col.*, 2011).

Todo el conocimiento de la estructura del RA- β_2 provee nuevos puntos de vista para estudiar el proceso de activación del mismo (Kobilka y Schertler, 2008). Un ejemplo de ello es la presencia de varios aminoácidos mutados que llevan a una actividad basal elevada (mutantes activos constitutivamente). En la estructura cristalina, estos aminoácidos estabilizan el estado inactivo del receptor.

Los RA- β_2 , como se mencionó anteriormente, pueden mediar su acción a través de la unión a proteínas *Gas* (dependiente de AMPc y PKA) y *Gai*. La activación de la señalización mediada por las proteínas *Gai* provoca la estimulación de la vía de las MAPK (Erk1/2 y p38) y requiere la fosforilación del receptor por parte de la PKA (como resultado el receptor se desacopla de la proteína *Gas*) (Johnson, 2006). Luego, el heterodímero $\beta\gamma$ actúa como intermediario interaccionando con otras proteínas tales como la tirosina quinasa Src, Raf y Ras, culminando en la activación de la vía de las MAPK (Johnson, 2006). De todas formas, ésta no es la única vía de señalización posible. Hay descrita una variedad de formas en las cuales los GPCR regulan la vía de las MAPK, a través de *Gas* y *Gai* (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). En la figura 8 se muestran algunas de las vías de señalización del RA- β_2 .

La unión del agonista al receptor, causa la desensibilización de los mismos. El proceso de desensibilización está ampliamente descrito para los RA- β_2 y ocurre debido a la fosforilación del mismo mediada por PKA o GRK (quinasas de receptores acoplados a proteínas G). Esta fosforilación resulta en la unión de β -arrestinas y el desacople del receptor de la proteína *Gas*, limitando el funcionamiento del mismo. También se pueden reclutar fosfodiesterasas localmente y así metabolizar el AMPc generado, terminado el efecto de la activación del receptor. Sin embargo, la desensibilización es un proceso transitorio y puede ser revertido en unos minutos (Johnson, 2006).

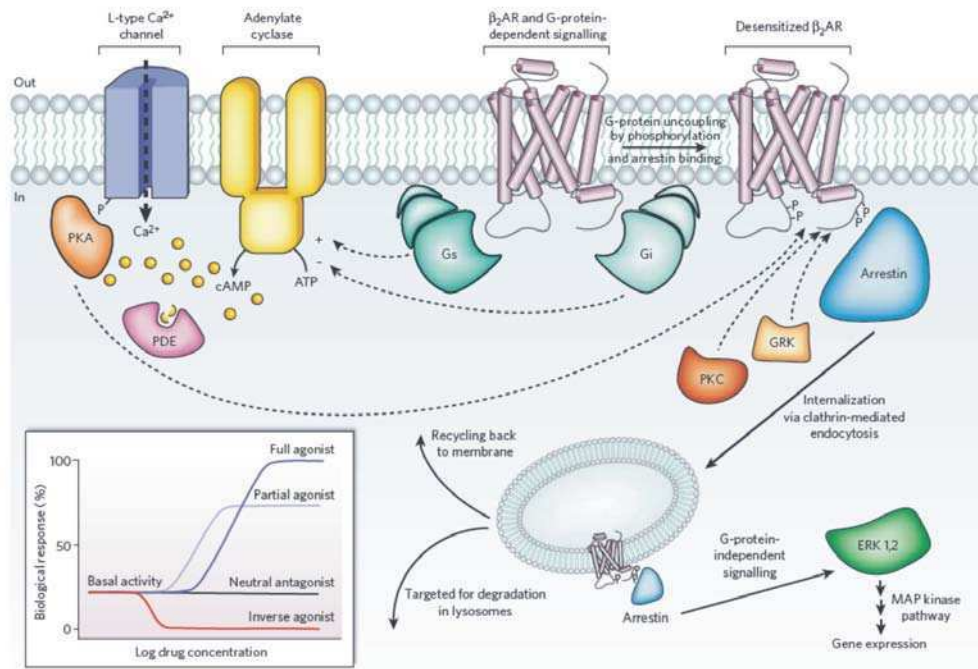


Figura 8. Transducción de señales en GPCR. Hay una variedad de vías de señalización reguladas por los RA- β_2 . Los RA- β_2 pueden activar a proteínas Gas y Gai y regular diferencialmente la adenilil ciclasa (AC). La adenilil ciclasa genera AMPc y este segundo mensajero activa a la proteína quinasa A (PKA). PKA regula la actividad de varias proteínas celulares, incluyendo canales de calcio y los RA- β_2 . La activación de RA- β_2 también lleva a la fosforilación de quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK) y el subsiguiente acoplamiento a arrestinas. Las proteínas arrestinas promueven la activación de Erk1/2, previenen la activación de proteínas G y promueven la internalización del receptor a través de vesículas revestidas con clatrina. Tomado de Rosenbaum *et al*, 2009.

Luego de una exposición de agonista más prolongada ocurre la internalización del receptor y la eliminación del mismo de la membrana celular, en un proceso denominado internalización de receptores (Johnson, 2006). Por último, cuando la exposición al agonista ha ocurrido por horas, ocurre la regulación negativa o *downregulación* del receptor. Mediante este proceso los RA se degradan y se restablece la presencia de los mismos en la membrana celular mediante la transcripción y traducción dentro de la célula (Johnson, 2006).

Receptores Adrenérgicos y Cáncer

La depresión es uno de los problemas de salud mental más comunes en el mundo, siendo de particular importancia en pacientes con cáncer. Hay evidencias indicando que la depresión causa angustia y sufrimiento en los pacientes, disminuyendo la tasa de

atención médica y aumentando la duración de las estancias de internación (Mitchell y *col.*, 2011).

Además, existen una gran cantidad de estudios epidemiológicos indicando que el estrés, la depresión crónica y la falta de apoyo social podrían ser factores de riesgo para el desarrollo y la progresión del cáncer (Antoni y *col.*, 2006, Thaker y Sood, 2008). Estudios celulares y moleculares han identificado los potenciales mediadores de dichos efectos.

Factores ambientales y psicosociales inician la cascada de información en el sistema nervioso central y en la periferia; luego se dispara la respuesta al estrés de “lucha o huida” en el sistema nervioso autónomo. La respuesta del sistema nervioso autónomo al estrés está mediada principalmente por la activación del sistema simpático y la subsecuente liberación de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) (Antoni y *col.*, 2006, Malbon y *col.*, 2001). Las mismas son liberadas a partir de neuronas simpáticas y la médula adrenal (Malbon y *col.*, 2001). Asimismo, los niveles de catecolaminas están aumentados en individuos que experimentan estrés agudo y/o crónico y son responsables de los efectos generados por el sistema nervioso autónomo sobre el sistema cardíaco, respiratorio y vascular entre otros (Antoni y *col.*, 2006, Thaker y Sood, 2008). Datos epidemiológicos muestran la influencia de algunas características psicológicas y sociales en la aparición diferencial de cáncer, la progresión de la enfermedad y la mortalidad (Antoni y *col.*, 2006, Thaker y Sood, 2008, Thaker y *col.*, 2007). Particularmente con respecto al cáncer de mama, hay estudios demostrando que la combinación de estrés extremo y bajo apoyo social aumenta significativamente la incidencia de esta enfermedad (Thaker y Sood, 2008, Thaker y *col.*, 2007, Antoni y *col.*, 2009, McGregor y Antoni, 2009, Antoni y *col.*, 2006, Den Heijer y *col.*, 2010a, Den Heijer y *col.*, 2010b, Den Heijer y *col.*, 2010c, Knopf, 2006).

Asimismo, existen datos de pacientes de cáncer mostrando que el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad generan estados de estrés y aquellos que demuestran tener comportamiento depresivo parecen experimentar una progresión de la enfermedad más rápida. Por el contrario, el apoyo social y el optimismo estarían asociados a una tasa de supervivencia mayor (Antoni y *col.*, 2006, Thaker y Sood, 2008, Thaker y *col.*, 2007).

Por lo tanto, el estrés o las hormonas/neurotransmisores asociadas al mismo podrían jugar un rol en la incidencia y en la progresión tumoral, aunque se ignoran los mecanismos por los cuales ello puede ocurrir. Uno de los estos mecanismos posibles

sería la acción de las catecolaminas endógenas sobre los receptores adrenérgicos presentes en los tumores.

Hay una enorme cantidad de bibliografía con respecto a la influencia de las catecolaminas endógenas en diversos modelos de cáncer. Dependiendo del tipo tumoral, los receptores adrenérgicos y las catecolaminas endógenas pueden estimular o inhibir la proliferación de células tumorales. Por ejemplo, en diversos modelos de cáncer de mama (humanos y murinos), nuestro grupo describió un efecto promotor del crecimiento tumoral mediado por los RA- α_2 (Bruzzone y *col.*, 2008). Existen otros grupos de investigación que describieron la presencia de los RA- β en líneas tumorales mamarias humanas (Slotkin y *col.*, 2000, Badino y *col.*, 1996, Draoui y *col.*, 1991, Vandewalle y *col.*, 1990). En un modelo de cáncer mamario de ratas se asoció a los RA- β con un aumento del crecimiento tumoral (Marchetti y *col.*, 1991, Marchetti y *col.*, 1989). Por el contrario, el grupo de Carie y Sebti demostró que un agonista β_2 -adrenérgico es capaz de revertir el crecimiento tumoral en un modelo de mama humano mediante el bloqueo de la vía de señalización de Erk1/2 (Carie y Sebti, 2007).

En un modelo de cáncer de páncreas humano, los RA- β_2 fueron asociados al efecto carcinogénico de la nicotina como promotores de la proliferación celular y del crecimiento tumoral mediante la activación de la vía de Erk1/2 y este efecto era revertido por la acción de β bloqueantes (Schuller y Al-Wadei, 2010, Al-Wadei y *col.*, 2009).

Además, existe una gran cantidad de modelos en los cuales la norepinefrina y la epinefrina son capaces de aumentar la migración celular, sabiendo que es un prerequisite para el establecimiento de metástasis. Este hecho fue reportado en varias líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de próstata (Entschladen y *col.*, 2005a, Lang y *col.*, 2004, Entschladen y *col.*, 2004, Drell y *col.*, 2003, Voss y Entschladen, 2010). También se estudió el efecto de las catecolaminas endógenas sobre la migración de células de cáncer de ovario humano, y se observó que la norepinefrina provocaba un aumento en este parámetro (Sood y *col.*, 2010, Sood y *col.*, 2006, Thaker y *col.*, 2006, Yang y *col.*, 2006).

Por último, existen numerosos reportes implicando a las catecolaminas endógenas en el proceso de angiogénesis tumoral. La angiogénesis es un proceso crítico para el crecimiento de los tumores sólidos. La norepinefrina es capaz de aumentar la expresión de VEGF a través de la unión a los RA- β en células tumorales de ovario (Thaker y *col.*,

2006, Yang y *col.*, 2006, Tilan y Kitlinska, 2010, Lutgendorf y *col.*, 2003). Además, el mismo efecto fue logrado mediante la aplicación de estrés por inmovilización en animales portadores de tumores y revertido mediante la administración simultánea de estrés por inmovilización y β -bloqueantes (Thaker y *col.*, 2006). Existen estudios clínicos que muestran una correlación entre el apoyo social y los niveles de VEGF. En pacientes con cáncer de ovario con mayor apoyo social, los niveles de VEGF eran menores comparados con personas carentes de apoyo afectivo (Lutgendorf y *col.*, 2002). En la figura 9 se ilustra el efecto de las hormonas del estrés en el microambiente tumoral.

Por último, con respecto al establecimiento de metástasis, en un modelo de cáncer de próstata, la norepinefrina fue capaz de aumentar el establecimiento de metástasis en los ganglios linfáticos, mientras que el tumor primario no presentaba un crecimiento diferencial con respecto al control (Palm y *col.*, 2006). Asimismo, el grupo de Sloan y colaboradores demostró que el estrés por inmovilización es capaz de aumentar 30 veces el establecimiento de metástasis, utilizando un modelo *in vivo* de cáncer de mama. El número de metástasis en ganglios linfáticos y pulmones fue significativamente mayor en los animales estresados comparados con los controles (Sloan y *col.*, 2010).

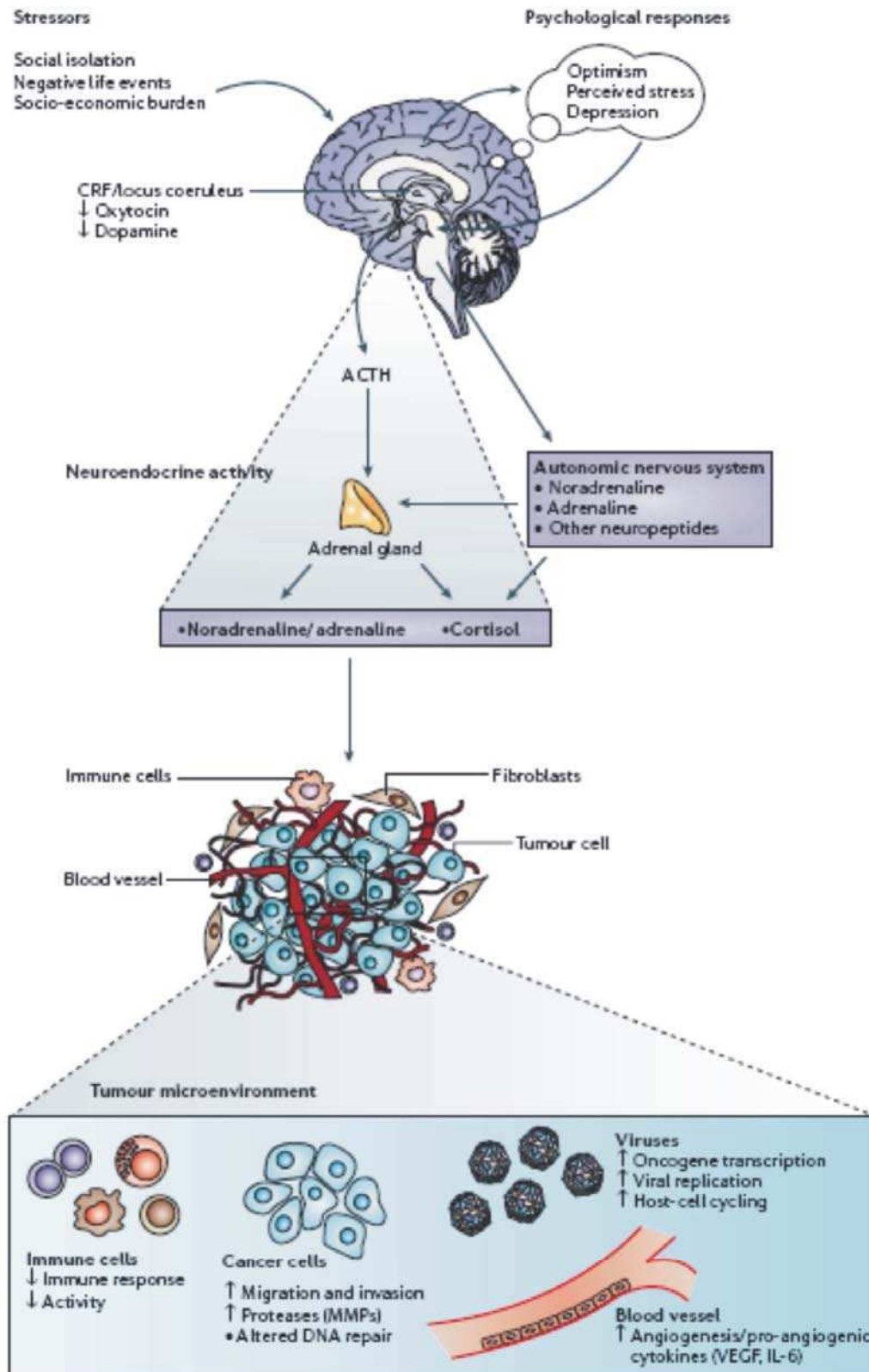


Figura 9. Efecto de factores asociados al estrés en el microambiente tumoral. Catecolaminas, glucocorticoides y otras hormonas del estrés son liberadas por la glándula adrenal, el cerebro y terminales del sistema nervioso simpático y pueden modular múltiples componentes del microambiente tumoral. Tomado de Antoni *et al*, 2006.

Receptores Adrenérgicos en la glándula mamaria normal y en modelos tumorales de cáncer de mama

Mediante ensayos de unión a ligandos radiactivos se describió la presencia de receptores α - y β -adrenérgicos en la glándula mamaria de bovinos en el período de lactancia. Se demostró la presencia de diferentes tipos de receptores adrenérgicos (RA- α_1 , RA- α_2 y RA- β_2) en el área de la mama, en los ductos y en el parénquima mamario (Hammon y *col.*, 1994). La mayoría de estos receptores se encontraron en el sistema de eyección de leche (Hammon y *col.*, 1994).

Al analizar la presencia de ARN mensajero en glándula mamaria normal de bovinos mediante RT-PCR se observó que todos los subtipos de RA- α estaban presentes, salvo el subtipo RA- α_{1D} . Entre los RA- α_1 , la máxima expresión fue para el subtipo α_{1A} , seguido por el RA- α_{1B} . Para los RA- α_2 el máximo nivel de mensajero fue correspondiente al subtipo α_{2A} seguido por el RA- α_{2B} y por último el RA- α_{2C} . También se encontró expresión de mensajero de los receptores β -adrenérgicos, principalmente del subtipo RA- β_2 (Inderwies y *col.*, 2003b, Inderwies y *col.*, 2003a, Inderwies y *col.*, 2003c).

Nuestro grupo de investigación describió y caracterizó los RA- α_2 en líneas tumorales y no tumorales mamarias humanas (Vazquez y *col.*, 1999). La expresión de estos receptores fue analizada a nivel de ARNm mediante RT-PCR y a nivel proteico mediante ensayos de unión a ligando radioactivo y ensayos de inmunocitoquímica (Vazquez y *col.*, 2006, Vazquez y *col.*, 1999).

Todas las líneas celulares exhibieron una unión significativa al antagonista [3 H]-Rauwolscina. Se encontró que los agonistas epinefrina, norepinefrina y el agonista α_2 -clonidina aumentaban significativamente la incorporación de timidina tritiada en todas las líneas mamarias humanas, tanto tumorales como no tumorales, en un rango de concentraciones de 10-30 pM, con una concentración efectiva 50 (EC₅₀) de 10 pM para epinefrina, 14.2 pM para norepinefrina y 0.298 pM para clonidina en el caso particular de las células MCF-7 (Vazquez y *col.*, 2006, Vazquez y *col.*, 1999). Además, se evaluó la expresión y funcionalidad de RA en los fibroblastos del estroma tumoral. Los fibroblastos también respondieron a la incubación con agonistas α_2 -específicos con un aumento en la proliferación celular (Bruzzone y *col.*, 2010).

Del mismo modo se describió el efecto de los agonistas α_2 -adrenérgicos en modelos *in vivo* de cáncer de mama. Se utilizaron dos modelos diferentes. El primero fue el modelo de carcinomas ductales de mama originados por administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona en ratones Balb/c (Lanari y *col.*, 2009). Se trabajó con tumores hormono-dependientes e independientes. El otro modelo utilizado fue la inoculación de líneas de cáncer de mama humano en ratones inmunodeficientes (Bruzzone y *col.*, 2010). Los agonistas clonidina y dexmedetomidina provocaron un aumento significativo del crecimiento tumoral. En todos los casos, el efecto era revertido por la administración conjunta con un antagonista α_2 (rauwolscina). Este antagonista además, se comportó como un agonista inverso, provocando una disminución del crecimiento tumoral *per se* (Bruzzone y *col.*, 2008, Luthy y *col.*, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudios epidemiológicos indican que el estrés y la depresión crónica pueden actuar como factores de riesgo en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. Particularmente, los niveles endógenos de catecolaminas se encuentran aumentados en muchas pacientes que presentan esta enfermedad. Se han realizado una gran variedad de estudios para lograr determinar si las catecolaminas endógenas afectan directamente la progresión tumoral.

En particular, nuestro grupo describió la presencia de receptores α_2 -adrenérgicos en líneas tumorales de mama humana. El efecto biológico asociado a la activación de los mismos provocó la estimulación de la proliferación celular y del crecimiento tumoral. Asimismo, el uso de un antagonista específico generó una disminución del crecimiento tumoral, dando indicios de su acción como agonista inverso.

Por otro lado, el rol de los receptores β -adrenérgicos en modelos de cáncer de mama humano no ha sido analizado en profundidad. Estos receptores han sido estudiados exhaustivamente en enfermedades del sistema cardiovascular y respiratorio, habiendo muchas drogas disponibles que actúan a través de ellos.

Entonces, el objetivo general del presente trabajo fue estudiar el efecto de los compuestos β -adrenérgicos en modelos tumorales mamarios humanos, realizando una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*, siendo la finalidad última el posible uso de estos compuestos ampliamente utilizados en la clínica como terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama y el mejoramiento de la calidad de vida de pacientes que poseen esta enfermedad.

Objetivos específicos

1) Estudiar la expresión de receptores β_2 -adrenérgicos en diversos modelos tumorales mamarios humanos.

- a) Analizar por medio de RT-PCR la presencia de los receptores β_2 -adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas, así como en modelos tumorales mamarios humanos establecidos en ratones desnudos.
- b) Analizar mediante ensayos de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e inmunocitoquímica la presencia a nivel proteico de los receptores β_2 -adrenérgicos utilizando líneas celulares mamarias humanas y modelos *in vivo* de tumores mamarios humanos.

2) Estudiar el efecto biológico de los compuestos adrenérgicos en modelos *in vitro*.

- a) Realizar ensayos de incorporación de timidina tritiada como parámetro de la proliferación celular con la finalidad de evaluar el efecto de los compuestos β -adrenérgicos en las líneas tumorales mamarias humanas MCF-7, MDA-MB-231, HS-578T, IBH-4, IBH-6 e IBH-7.
- b) Realizar ensayos de proliferación celular utilizando el agonista natural epinefrina de forma de observar el resultado global de la estimulación adrenérgica (mediado tanto por receptores α - como β -adrenérgicos).

3) Estudiar el efecto de los compuestos β -adrenérgicos sobre el crecimiento tumoral.

- a) Realizar ensayos *in vivo* utilizando como modelo tumoral las líneas celulares IBH-4 e IBH-6 creciendo en ratones desnudos. Estudiar el efecto de los compuestos β -adrenérgicos en el crecimiento tumoral (salbutamol, isoproterenol, propanolol).
- b) Evaluar si la disminución observada en el volumen tumoral luego del tratamiento con agonistas β -adrenérgicos se debe a un aumento en la apoptosis. Utilizar la técnica de TUNEL (marcación *in situ* del ADN fragmentado) para estudiar este parámetro.

4) Comparación de acciones α_2 y β -adrenérgicas sobre el crecimiento tumoral

- a) Realizar ensayos *in vivo* utilizando como modelo tumoral las líneas celulares IBH-4 e IBH-6 creciendo en ratones desnudos. Comparar el efecto de los agonistas β -adrenérgicos y el antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina en el crecimiento tumoral.
- b) Evaluar el porcentaje de apoptosis en los tumores provenientes de cada tratamiento mediante la técnica de TUNEL.

5) Estudiar el efecto de los compuestos adrenérgicos sobre los mecanismos de señalización intracelulares.

- a) Estudiar si hay cambios en la fosforilación de las proteínas Erk1/2 y Akt luego de los tratamientos con agonistas β -adrenérgicos y el antagonista α_2 -rauwolscina tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* utilizando la técnica de *Western blot*.
- b) Estudiar si los agonistas β -adrenérgicos activan la vía clásica de señalización de los RA- β (a través de la proteína quinasa A, PKA) o si la proteína EPAC esta involucrada en este proceso. Realizar ensayos de *Western blot* utilizando análogos específicos activadores de las proteínas PKA y/o EPAC en modelos *in vitro*.

6) Estudiar la capacidad de invasión y migración de líneas tumorales mamarias humanas frente a tratamientos con compuestos adrenérgicos.

- a) Analizar la migración e invasión de las células tumorales mamarias humanas mediante la utilización de video-microscopía en tres dimensiones.
- b) Estudiar las vías de señalización involucradas en la migración celular, utilizando inhibidores y activadores específicos de tirosinas quinasas, fosfolipasa C, análogos de AMPc, anticuerpos bloqueantes, etc y observar como se modifica la migración de las células con los tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células tumorales mamarias humanas MCF-7, MDA-MB-231, HS-578T, IBH-4, IBH-6 e IBH-7 fueron cultivadas como ya ha sido descrito (Vazquez y *col.*, 2004). Brevemente, se mantuvo a las células en medio DMEM:F12 (1:1, Gibco) suplementado con 10% SFB (Natocor) inactivado por calor, glutamina 2 mM (Sigma), insulina bovina 2 µg/ml, penicilina 100 UI/ml (Sigma), estreptomicina 100 µg/ml (Sigma) y HEPES 15 mM. Las células crecieron en botellas de plástico, y fueron incubadas a 37 °C en CO₂ 5 % y subcultivadas al llegar al 80% de confluencia usando tripsina 0,25% – EDTA 0,025% (Sigma).

Preparación de las suspensiones celulares para la inyección en ratones desnudos

Las células IBH-4 e IBH-6 fueron dispersadas con tripsina 0.25% – EDTA 0.025%, lavadas tres veces con PBS o medio de cultivo sin suero, ajustando la concentración a $1-2 \times 10^7$ células viables y resuspendidas en un volumen final de 200 µl. Las células fueron inoculadas de forma subcutánea (sc) en el flanco derecho del animal a través de una aguja 21-gauge introducida 1–2 cm. para prevenir el derrame del inóculo celular (Bruzzone y *col.*, 2009).

Animales

Los animales utilizados para los experimentos *in vivo* fueron ratones desnudos congénitamente atímicos con base Swiss (N:NIH(S)-nu), criados en el *Bioterio de la Universidad de La Plata*. Todos los ratones fueron hembras sexualmente maduras de 8 semanas de edad, y se alojaron en racks ventilados, en condiciones libres de patógenos con un fotoperíodo de luz-oscuridad de 12 hs y en condiciones controladas de humedad y temperatura (20 ± 2 °C). Las cajas, camas, comida y agua fueron esterilizadas por autoclavado. Se mantuvo la esterilidad durante los procedimientos quirúrgicos utilizados para inocular las células que dieron origen a los tumores sólidos, la remoción de tumores y el trasplante de los mismos. El cuidado y la manipulación de los animales estuvo de acuerdo con los lineamientos institucionales, la Guía de Cuidado y Uso de

Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life y National Research, 1996) que está siendo revisada y está disponible por internet (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life, 2010) y los Lineamientos del Comité del Reino Unido para el Bienestar de los Animales Experimentales en Investigación en Cáncer (United Kingdom Co-Ordinating Committee on Cancer Research, 1998).

Tumores

Las líneas tumorales mamarias humanas IBH-4 e IBH-6 fueron inoculadas a los ratones desnudos como ya fue descrito. Luego, los pasajes *in vivo* fueron realizados por transplante con trocar. El crecimiento tumoral fue monitoreado cada dos días. Se midieron los dos diámetros mayores y se calculó el volumen con la siguiente fórmula: volumen = $(4/3) \pi \times \text{menor radio}^2 \times \text{mayor radio}$ (Bruzzone y col., 2008). Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen tumoral superaba los 2000 mm³ y los tumores fijados en formalina al 4% en PBS para realizar los estudios histológicos posteriores.

Tratamientos

Un día luego del transplante del tumor, los animales comenzaron a recibir inyecciones diarias de las drogas. Se utilizaron dos esquemas experimentales diferentes: En uno de ellos, se analizó el efecto β -adrenérgico. Para ello, los animales fueron separados en 4 grupos de 10 animales cada uno: a) el grupo agonista β : inyectado con isoproterenol (1,0 mg/kg/día) o salbutamol (1,2 mg/kg/día); b) el grupo antagonista β : inyectado con propanolol (1,0 mg/kg/día) y c) el grupo reversión recibió salbutamol o isoproterenol + propanolol a las dosis indicadas. El grupo control (d) recibió en todos los casos solución fisiológica. Para el segundo esquema experimental los 4 grupos de 10 animales fueron: a) el grupo agonista β : inyectado con salbutamol (1,2 mg/kg/día) o isoproterenol (1,0 mg/kg/día); b) el grupo antagonista α_2 inyectado con rauwolscina: 0,5 mg/kg/día y el grupo combinado: recibió salbutamol o isoproterenol + rauwolscina a las dosis indicadas. El grupo control (d) recibió en todos los casos solución fisiológica. La vía de administración de las drogas fue mediante la inyección subcutánea de las soluciones

acuosas de compuestos adrenérgicos o solución fisiológica en los animales control. Todos los compuestos adrenérgicos fueron adquiridos en Sigma.

Ensayos de Proliferación

Se realizaron ensayos de proliferación en las líneas humanas MCF-7, MDA-MB-231, HS-578T, IBH-4, IBH-6 e IBH-7. Las células fueron sembradas a una concentración de 5000 células/pocillo en medio con 2% SFB adsorbido con carbón y los experimentos duraron 72 hs. Los agonistas β -adrenérgicos y la epinefrina fueron agregados en soluciones preparadas en ácido ascórbico 10 mM, congeladas y diluidas inmediatamente antes de su uso. 0.2 μ Ci/pocillo de [3 H]-timidina fueron agregados junto con el último cambio de medio. Luego de 24 hs, las células fueron cosechadas en un cosechador Nunc Cell Harvester 8, y los filtros fueron contados en un contador de centelleo líquido.

Ensayos de Inmunofluorescencia e Inmunocitoquímica

Las células fueron cultivadas en cámaras comerciales Lab-Tek Chamber Slide System en medio de cultivo DMEM:F12 suplementado con 10% SFB; 2 días antes de la inmunocitoquímica el medio fue cambiado a 2% de SFB adsorbido con carbón. La fijación fue realizada con formalina al 4% en PBS durante 20 minutos. Luego, las células fueron bloqueadas con 10% SFB (sin decomplementar) y permeabilizadas con Triton X-100 0,1% en SFB 4%. Posteriormente se realizó la incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-RA- β_2 humano (RA- β_2 (H-20): sc-569, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una concentración 1:50.

Para la inmunofluorescencia luego de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron varios lavados con PBS y las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG de burro anti-conejo en 4% SFB, conjugado a fluoresceína (FITC). El anticuerpo primario fue omitido en los controles. Los núcleos fueron teñidos con 0,1 μ g/ml yoduro de propidio por 1 min, y las células fueron montadas con Vectashield H-1000. Las secciones fueron analizadas bajo microscopio confocal Nikon (Objetivos plan Apo 40X / 0.95 oil o Apo 60X / 1.40 oil).

Para la inmunocitoquímica se reveló con el kit Dako, el cual incluye un anticuerpo secundario biotinilado (anticabra, anticonejo, antiratón), estreptavidina-peroxidasa para amplificar la señal y diaminobenzidina (DAB) como sustrato de la peroxidasa.

En el caso de las inmunofluorescencias para PKC el protocolo seguido fue el mismo que el descrito anteriormente y los anticuerpos utilizados fueron: PKC α dilución 1:500 (Cat. 610107 BD Biosciences), PKC β dilución 1:250 (Cat. 610127 BD Biosciences), PKC γ dilución 1:250 (Cat. 611158 BD Biosciences), PKC δ dilución 1:250 (Cat. 610397 BD Biosciences). Anticuerpo secundario hecho en cabra (anti-conejo): *AlexaFluor 488 Goat anti-rabbit* (Cat. A11008 Invitrogen) dilución 1:500. Actina-Faloidina: *AlexaFluor 568 Phalloidin* (Cat. A12380 Invitrogen) dilución 1:500.

Ensayos de Inmunohistoquímica para receptores β_2 -adrenérgicos

Se realizaron ensayos inmunohistoquímica para confirmar la expresión de RA- β_2 en los tumores mamarios. Para ello, los tumores se extrajeron y se fijaron en formalina al 4% en PBS. Se enviaron al laboratorio de patología para realizar los tacos en parafina y los cortes con micrótopo, a partir de los cuales se realizaron los ensayos de inmunohistoquímica. Los cortes fueron desparafinados mediante la inmersión en xileno (10 min) e hidratados mediante la inmersión en alcoholes graduación decreciente (10 min, alcohol 100%, 95%, 90%, 70%). La peroxidasa endógena fue bloqueada mediante el tratamiento con 10% H₂O₂ durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS, se realizaron tres ciclos de 3 minutos cada uno con buffer citrato 0,01 M, pH 6 en microondas a una potencia de 600 W. Los sitios no específicos se bloquearon con 2% BSA durante 60 min. Los cortes se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario RA- β_2 (dilución 1:50) a 4°C (RA- β_2 (H-20): sc-569, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Luego de tres lavados con PBS (10 minutos cada uno), se realizó la incubación durante 45 min con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (LSAB+ System, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). La unión con el anticuerpo fue visualizada por incubación con DAB durante 5 min. En los controles negativos se omitió el anticuerpo primario. Se realizó la contratinción nuclear con hematoxilina (Merck) durante 10 seg, seguido de la deshidratación gradual en alcoholes (10 min en cada alcohol: 70%, 90%, 95% y 100%) y la inmersión en xileno (10 min) para realizar el posterior montaje con bálsamo de Canadá.

Técnica de TUNEL

Los cortes en los cuales se realizó la técnica de TUNEL (marcación *in situ* del DNA fragmentado) fueron procesados según el protocolo descrito en el kit comercial utilizado: *ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon*. Se realizó la desparafinización con xileno (10 min) e hidratación en alcoholes de graduación decreciente (100%, 95%, 90%, 70%), luego se bloqueó la peroxidasa endógena y en lugar de realizar la incubación con un anticuerpo, se incubó con la enzima TdT (Transferasa terminal) durante 1 hora, la cual se encarga de añadir los nucleótidos al extremo 3'OH libre del ADN que luego serán detectados. El paso siguiente fue la incubación con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano) durante 30 min, mediante el cual se detectan los nucleótidos anteriormente incorporados por la enzima TdT. La unión con el anticuerpo fue visualizada por incubación con DAB durante 5 min y la contratincción nuclear fue realizada con hematoxilina (Merck) durante 10 seg.

Los núcleos marcados son los correspondientes a las células apoptóticas. El porcentaje de células apoptóticas se calculó como el número de células apoptóticas / número de células totales*100. Se contaron 10 campos correspondientes a los cortes histológicos en un aumento de 40x.

RT-PCR

Se sembraron las células en placas de petri de 100 mm de diámetro en medio DMEM:F12 suplementado con 10% SFB. Cuando llegaron a 80% de confluencia, fueron incubadas en medio sin suero por otras 48 hs. Luego, fueron lavadas con PBS y el ARN total fue extraído por incubación con Tri Reagent durante 5 min. a temperatura ambiente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego se agregaron 0,2 ml cloroformo/ml de extracto inicial. Estas muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 3 min. y centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min. a 4°C. La fase acuosa fue subsecuentemente incubada con isopropanol frío (0,5 ml) por 10 min. a temperatura ambiente con agitación suave y centrifugada nuevamente a 12000 rpm por 10 min. El precipitado de ARN fue lavado con etanol al 75% en agua, centrifugado a 6800 rpm durante 5 min., resuspendido en agua DEPC. Posteriormente se midió su concentra-

ción con un espectrofotómetro. El ARN fue retrotranscrito a 42 °C por 15 min. en un volumen final de 20 µl conteniendo 200 unidades de Superscript II RNase HK Transcriptasa Reversa, 4 mM oligo dT18, Tris-HCl 50 mM pH 8.3, MgCl₂ 3 mM, KCl 75 mM, DTT 10 mM, dNTPs 500 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 40 unidades RNase OUT (Recombinant RNase Inhibitor) (Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen). La reacción fue terminada por calentamiento a 99°C durante 5 min. y reposo por 5 min. a 5 °C. También se realizó una incubación paralela con el extracto de ARN pero en ausencia de la enzima transcriptasa reversa de forma tal de excluir cualquier posible contaminación con ADN genómico. Este control es particularmente importante en genes sin intrones como es el caso de RA-β₂.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en presencia de 30 µM de cada *primer* oligonucleotídico, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), y 0,05 unidades/ml Taq DNA polimerasa (Taq DNA Polymerase, Invitrogen). Tres microlitros de ADNc fueron amplificados en la mezcla de PCR y se completó a un volumen final de 25 µl con agua molecular.

Una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min. fue seguida por 35 ciclos a 95°C por 35 seg., 60°C por 35 seg. y 72°C por 1 min., seguido de una única incubación a 72°C por 8 min. Como control negativo se realizó una reacción con agua en lugar de ADNc en cada PCR para comprobar la pureza de los reactivos. Los *primers* usados fueron los siguientes: RA-β₂ *forward* 5'-GGACTTCCATTGATGTGCTGT-3' y *reverse* 5'-GTCAGCAGGCTCTGGTACTTG-3' (amplicón de 112 pb). Para la detección de los transcriptos de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se utilizaron los siguientes *primers*: *forward* 5'-TTCGTCATGGGTGTGACC-3' y *reverse* 5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3', dando un producto de PCR de 300 pb. Este control sirvió para evaluar la integridad del ARN y del proceso de RT-PCR. Los productos de PCR fueron analizados usando electroforesis en geles de 2% de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador (*ladder*) de ADN de 100 pb para determinar el tamaño de los productos de PCR.

Western blot para Erk y Akt

Los extractos de tumor (50-100 µg proteína total/calle) fueron separados en geles discontinuos de 10% poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas fueron disueltas en buffer

de muestra (Tris 6 mM pH 6,8, SDS2%, azul de bromofenol 0,002%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 5%) y hervidas durante 5 min. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,2 μ m y se realizó el bloqueo de las mismas durante una hora en agitación a temperatura ambiente utilizando 5% leche descremada en 0,1% TBST (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1% v/v). Luego, las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-Erk1 (Erk 1; sc-94, Santa Cruz Biotech) o fosfo-Erk (pErk; sc-7383; Santa Cruz Biotech) o anti-Akt (Akt (pan) #4685, Cell Signaling) o fosfo-Akt (pAkt #4058, Cell Signaling). Los anticuerpos fueron incubados toda la noche a 4°C (dilución 1:1000) en agitación. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo e IgG ovino anti-ratón conjugado a peroxidasa (Amersham Life Science; dilución 1:2000 en leche descremada 5% en TTBS 0,1%). La señal fluorescente fue generada con una solución ECL *Western blotting detection solution* (2,2 mg Luminol Sigma, 0,33 mg ácido p-Cumárico Sigma, 15 μ l peróxido de hidrógeno 30% Merck, 333 μ l Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 4,6 ml agua destilada), y las membranas fueron expuestas a una película autoradiográfica (Curix RP1, Agfa, Argentina) entre 10 seg. y 20 min. La intensidad de las bandas fue cuantificada solamente en películas no saturadas. La cuantificación fue realizada con el programa ImageJ. Cada experimento fue repetido 3 veces a menos que se aclare lo contrario en las figuras correspondientes.

Ensayos de migración en geles de colágeno

Para realizar los ensayos de migración en geles de colágeno se utilizaron cámaras de vidrio *no comerciales* construidas en el momento previo a su utilización.

Las células se tripsinizaron y se contaron. Se utilizaron 9×10^5 células para los experimentos realizados con la línea IBH-6 y 7×10^5 células para los experimentos realizados con la línea MDA-MB-231. Se mezclaron las células con la solución de colágeno (1,63 mg/ml colágeno tipo I, PureCol, Inamed) conteniendo los compuestos a utilizar en su concentración final: epinefrina 10 μ M, norepinefrina 10 μ M, rauwolscina 1 μ M, salbutamol 1 μ M, clonidina 1 μ M, propanolol 10 μ M, análogos de AMPc 100 μ M (8-Br-AMPc, 8-CPT-AMPc, 6-Bnz-AMPc, Biolog), inhibidores de tirosinas quinasas (PP2 50 nM, AG18 500 nM, PP3 50 nM, Calbiochem), activador de la fosfolipasa C (3m3FBS, 50 μ M, Calbiochem), inhibidor de la PLC y su respectivo control (U73122,

500 ng/ml; U73342, 500 ng/ml Sigma), anticuerpo específico bloqueante de CXCR1 y el correspondiente control de isotipo (50 µg/ml, R&D Systems).

Luego de sellar las cámaras, se colocaron en la estufa de cultivo a 37°C durante 3 min. para permitir la polimerización del colágeno.

La migración celular fue monitoreada durante 15 hs a 37°C mediante el uso de video-microscopía en tiempo real. Para el análisis de la actividad migratoria, treinta células de cada experimento fueron elegidas al azar y se analizaron los caminos recorridos por las mismas mediante sus proyecciones en dos dimensiones utilizando un software adecuado. Cada experimento de migración fue repetido 3 veces.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para el efecto de agonistas *in vitro* y el efecto de los diferentes tratamientos sobre la fosforilación de Erk1/2 fue realizado por ANOVA seguido de test de Dunnett-Kramer. Los resultados de los experimentos *in vivo* fueron analizados por ANOVA seguido de test de Tukey-Kramer (Dowdy y Wearden, 1983). Para los ensayos de migración se realizó ANOVA seguido de test de Dunnett-Kramer. En el caso particular del experimento de migración utilizando el anticuerpo bloqueante del receptor CXCR1 se realizó el análisis mediante test t de Student ya que se trataba únicamente de dos grupos (Control y CXCR1).

RESULTADOS

Expresión de receptores adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas

Los primeros experimentos fueron realizados con la finalidad de verificar la expresión del gen del receptor β_2 -adrenérgico (ADRB2) mediante la técnica de RT-PCR. Asimismo, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia con el propósito de detectar la presencia de estos receptores a nivel proteico en las líneas tumorales mamarias humanas utilizadas en el presente trabajo. Las líneas celulares con las cuales se trabajó fueron: MCF-7, MDA-MB-231, HS-578T adquiridas en la ATCC y las líneas desarrolladas en nuestro laboratorio a partir de muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama: IBH-4, IBH-6 e IBH-7 (Vazquez y col., 2004).

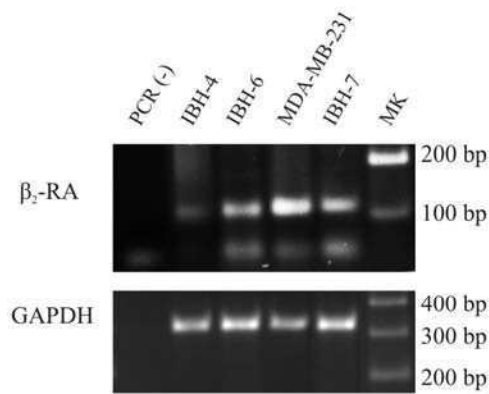
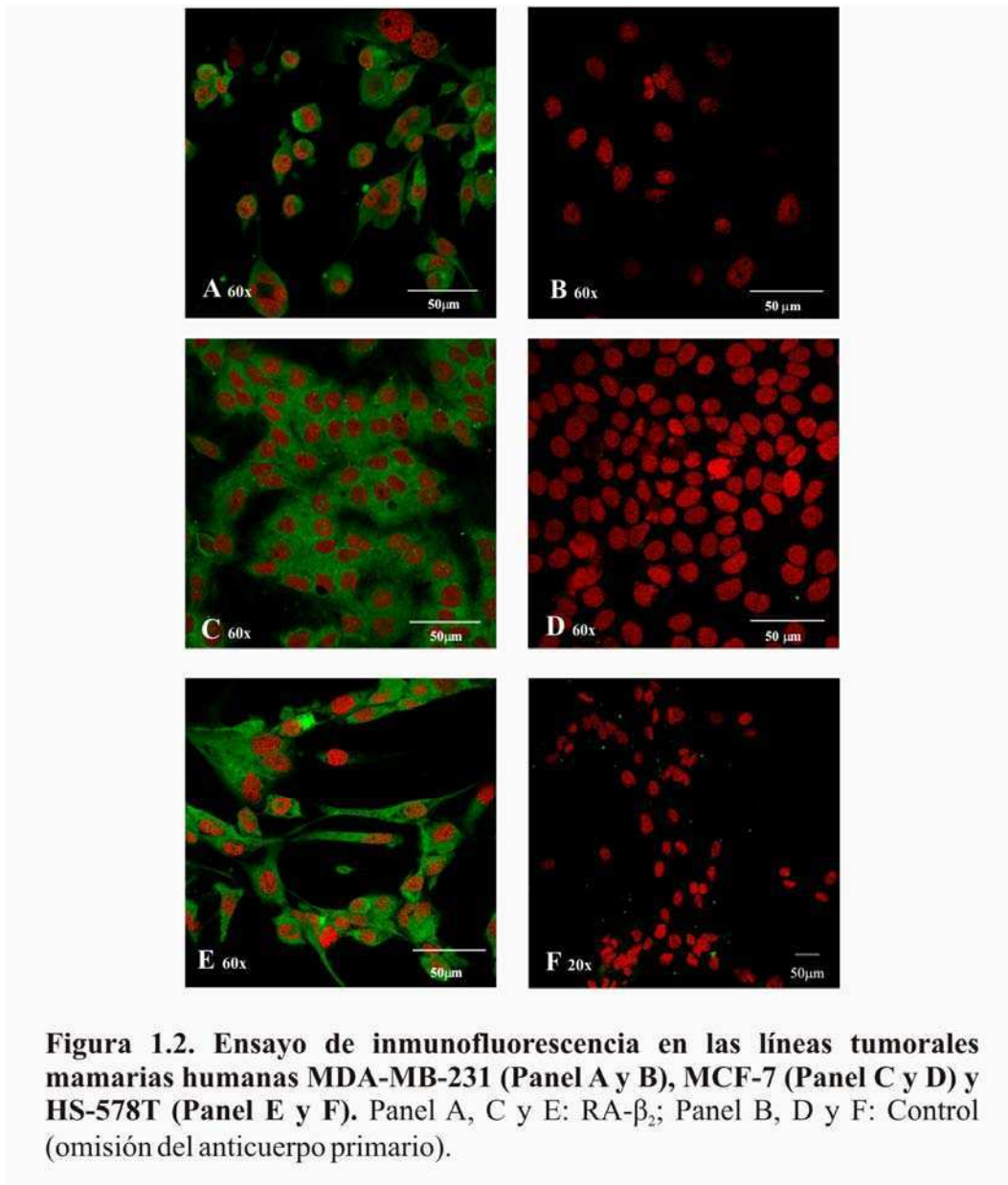


Figura 1.1. RT-PCR para el receptor β_2 -adrenérgico. Se utilizó el gen de la enzima GAPDH como control de expresión constitutiva. El producto de PCR para el RA- β_2 fue de 112pb y para GAPDH de 300pb.

En la figura 1.1 se muestran los resultados correspondientes a la RT-PCR para el receptor β_2 -adrenérgico. Se observa que todas las líneas celulares expresan el receptor β_2 -adrenérgico. En la línea MDA-MB-231 la expresión del mismo fue descrita por otros grupos (Slotkin y col., 2000, Vandewalle y col., 1990) pero se realizó la RT-PCR partiendo de muestras de ARN de las células MDA-MB-231 como control positivo. También se comprobó la presencia del RA- β_2 en la línea celular MCF-7 (resultado no mostrado). A modo de control se utilizó el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de expresión constitutiva (control de expresión). Cabe destacar que en las líneas tumorales mamarias desarrolladas en el laboratorio (IBH-4, IBH-6 e IBH-7) si bien la expresión del receptor es detectable mediante la técnica de PCR a tiempo final, los niveles de ARN mensajero para este gen (RA- β_2) no parecen ser muy elevados. Una posibilidad a futuro para realizar la cuantificación de los niveles de expresión sería realizar PCR cuantitativa (PCR a tiempo real, qPCR).

En la figura 1.2 se muestran los resultados correspondientes a los ensayos de inmunofluorescencia realizados en las líneas celulares adquiridas en la ATCC (MDA-MB-231, MCF-7, HS-578T). La tinción para detectar RA- β_2 resultó positiva en las tres líneas celulares estudiadas (Panel A, C y E).



En los ensayos de inmunofluorescencia, los receptores se marcaron de color verde (anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo FITC), mientras que la contratinción nuclear fue realizada con yoduro de propidio (rojo).

En la figura 1.3 se muestran los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia correspondientes a las líneas IBH-6 e IBH-7 (RA- β_2 : Panel A y C, Control: Panel B y D). Al igual que en las líneas anteriormente nombradas, la marcación resultó positiva para el RA- β_2 , siendo su localización tanto citoplasmática como en la membrana celular. En menor medida se observa localización nuclear pero en ningún caso se observó co-localización del RA- β_2 con el ADN celular (teñido con ioduro de propidio en los ensayos de inmunofluorescencia).

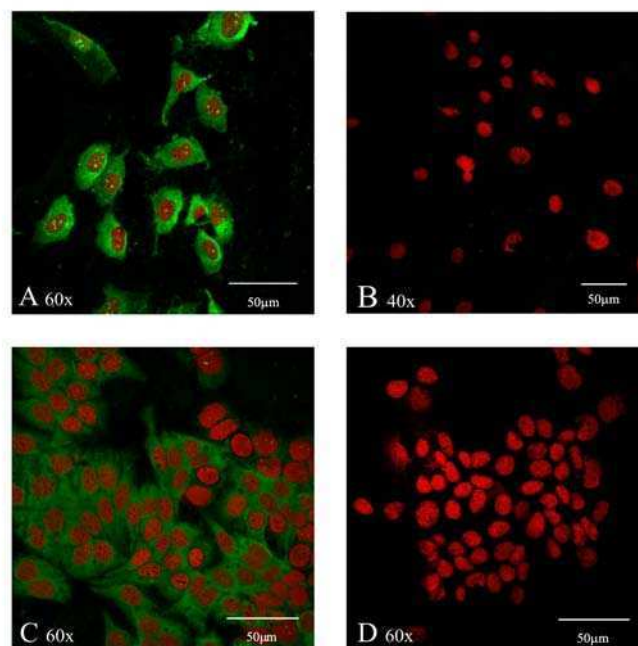


Figura 1.3. Ensayo de inmunofluorescencia en las líneas tumorales mamarias humanas IBH-6 (Panel A y B) e IBH-7 (Panel C y D). Panel A y C: RA- β_2 ; Panel B y D: Control (omisión del anticuerpo primario).

También se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para detectar la presencia del RA- β_2 en todas las líneas celulares anteriormente nombradas. Los resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia. La figura 1.4 muestra las fotografías correspondientes a las líneas tumorales mamarias MDA-MB-231 y HS-578T.

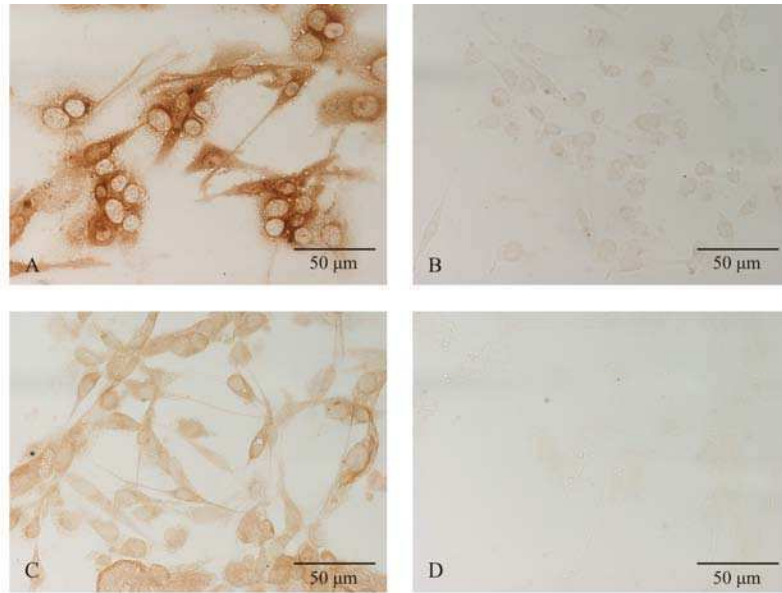


Figura 1.4. Ensayo de inmunocitoquímica en las líneas tumorales mamarias humanas MDA-MB-231 (Panel A y B) y HS-578T (Panel C y D). Panel A y C: RA-β₂; Panel B y D: Control (omisión del anticuerpo primario). Aumento 40x.

La figura 1.5 corresponde a las líneas IBH-4, IBH-6, IBH-7 (RA-β₂: Panel A, C y E).

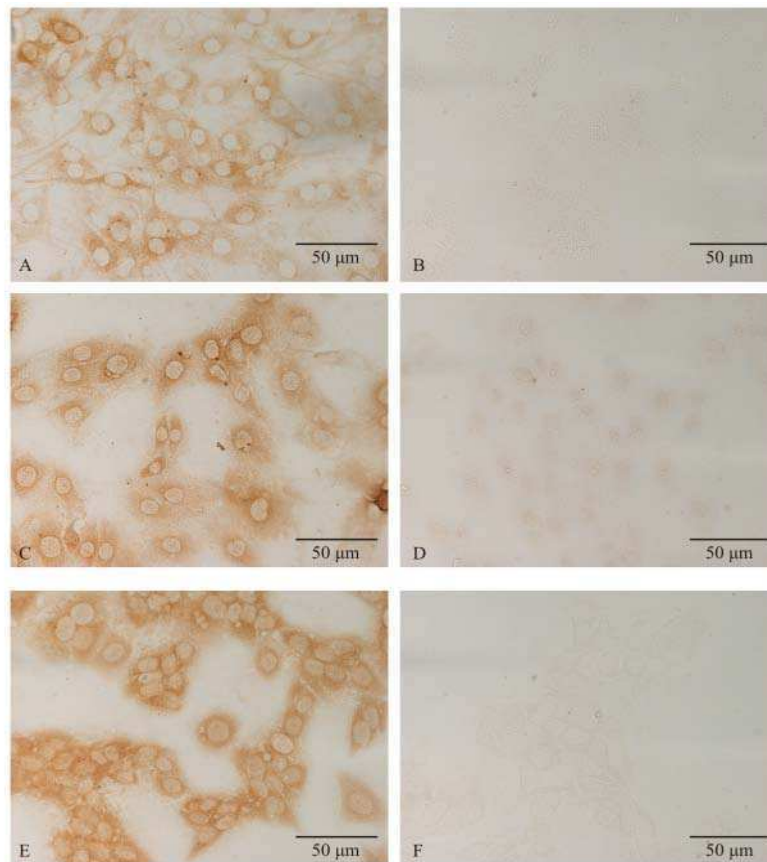


Figura 1.5. Ensayo de inmunocitoquímica en las líneas tumorales mamarias humanas IBH-4 (Panel A y B), IBH-6 (Panel C y D) e IBH-7 (Panel E y F). Panel A, C y E: RA-β₂; Panel B, D y F: Control (omisión del anticuerpo primario). Aumento 40x.

Todos estos resultados confirman la presencia del receptor β_2 -adrenérgico en el citoplasma celular.

Además, se quiso estudiar si estos receptores estaban presentes en tumores de mama humanos mediante ensayos de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Con este motivo se utilizaron cortes parafinados de dos tumores, provenientes de pacientes del Hospital Zonal General de Agudos "Magdalena V. de Martínez" de Tigre (Figura 1.6).

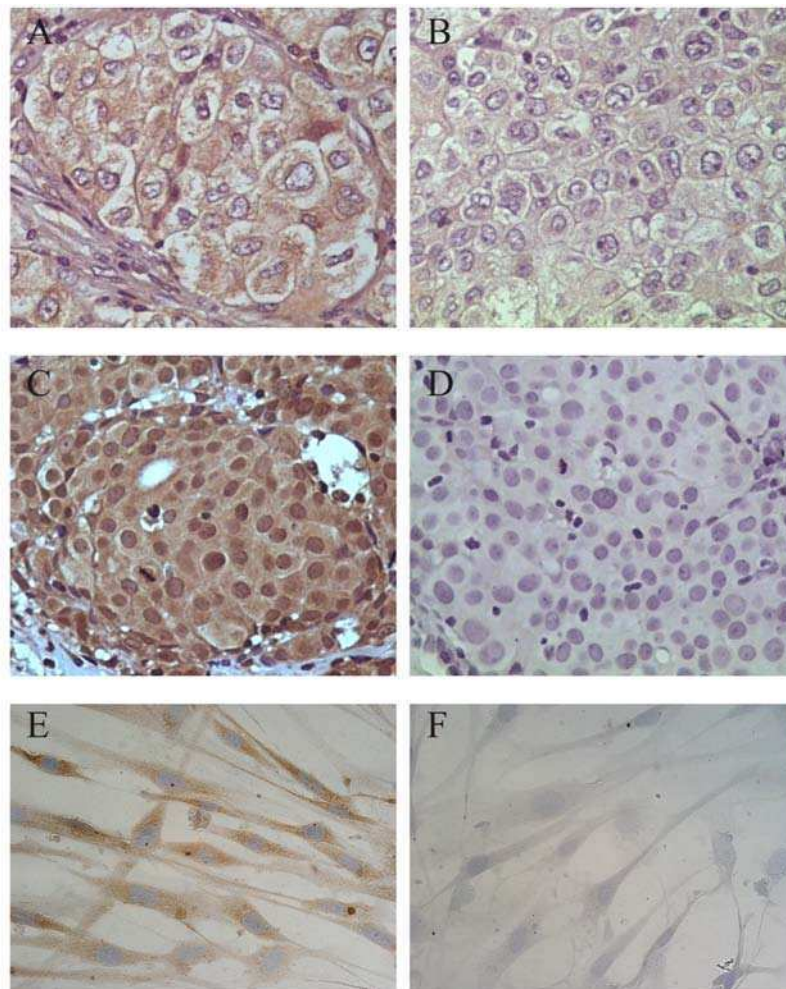


Figura 1.6. Ensayo de inmunohistoquímica para el RA- β_2 en tumores mamarios humanos: Triple negativo, RE(-) RP(-) HER2/neu(-) (Panel A y B), Doble positivo, RE(+) RP(+) HER2/neu(-) (Panel C y D); ensayo de inmunocitoquímica en fibroblastos asociados a tumor provenientes de una muestra de tumor humano doble positivo RE(+) RP(+) HER2/neu(-), muestra de cultivo primario (Panel E y F). Panel A, C y E: RA- β_2 ; Panel B, D y F: Control (omisión del anticuerpo primario). La contratinción nuclear se realizó con hematoxilina. Aumento 40x.

Los cortes provinieron de dos pacientes con cáncer de mama, una de ellas poseía un tumor triple negativo para los receptores RE(-), RP(-), HER2/neu(-). El segundo corte

provino de un tumor doble positivo para los receptores RE(+), RP(+),HER2/neu(-). Además, se realizaron cultivos primarios de muestras de tumores mamarios humanos y luego de separar la fracción epitelial de los fibroblastos asociados a tumor, se sembraron estos últimos en multicámaras comerciales (*labtek*) y se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para detectar a los RA- β_2 .

En todos los casos se detectó marcación positiva para el RA- β_2 , localizándose principalmente en el citoplasma y en la membrana celular. En estas muestras no se detectó marca nuclear de los RA- β_2 .

Efecto in vitro de compuestos adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas

Con respecto al efecto *in vitro* de los compuestos adrenérgicos, la bibliografía aporta datos contrapuestos, en algunos casos los receptores β -adrenérgicos son asociados a un aumento en la proliferación celular, mientras que en otros casos se los asocia a una inhibición de este parámetro.

Entonces, el paso siguiente fue estudiar el efecto biológico de los agonistas β -adrenérgicos *in vitro* utilizando la técnica de incorporación de timidina tritiada a los núcleos celulares y elucidar cuál es el efecto de estos compuestos en los modelos tumorales de mama humana utilizados en el laboratorio.

En un principio se estudió el efecto del agonista natural epinefrina. Este compuesto es capaz de unirse a los nueve subtipos de receptores adrenérgicos (α_1 -, α_2 - y β -) y en un tejido/célula es probable que coexistan varios subtipos de receptores. Por este motivo, el resultado neto observado luego de la incubación con epinefrina sería el balance entre las respuestas generadas por los diferentes RA.

En la figura 1.7 se observan los resultados correspondientes a los ensayos de proliferación celular luego de la estimulación con epinefrina en las células MCF-7, HS-578T y MDA-MB-231. Todas estas líneas tumorales mostraron un aumento significativo de la proliferación celular luego de la estimulación con epinefrina durante 72 hs. En el caso de las células MCF-7 (Panel A), los datos ajustan a una distribución gaussiana con un valor máximo de incorporación de [3 H]-Timidina para la concentración de epinefrina de 0,3 nM ($169,55 \pm 6,1$ % respecto al control, $p < 0,01$).

En la línea HS-578T (Panel B) los datos ajustan a una curva sigmoidea con una concentración efectiva 50 (EC_{50}) de epinefrina correspondiente a 0,16 nM (ejemplo: $148,7 \pm 9,5$ % vs control $p < 0,01$ para la concentración 1 nM de epinefrina; $191 \pm 12,6$ % vs control $p < 0,01$ para la concentración 0,1 μ M).

Las células MDA-MB-231 (Panel C) presentaron una EC_{50} de epinefrina de 2,2 pM. A modo de ejemplo, para la concentración 1 nM de epinefrina la incorporación de [3 H]-Timidina fue de $138,65 \pm 7$ % vs control, $p < 0,05$; para la concentración de epinefrina 0,1 nM la incorporación de timidina fue de $124,28 \pm 8,2$ % vs control, $p < 0,05$.

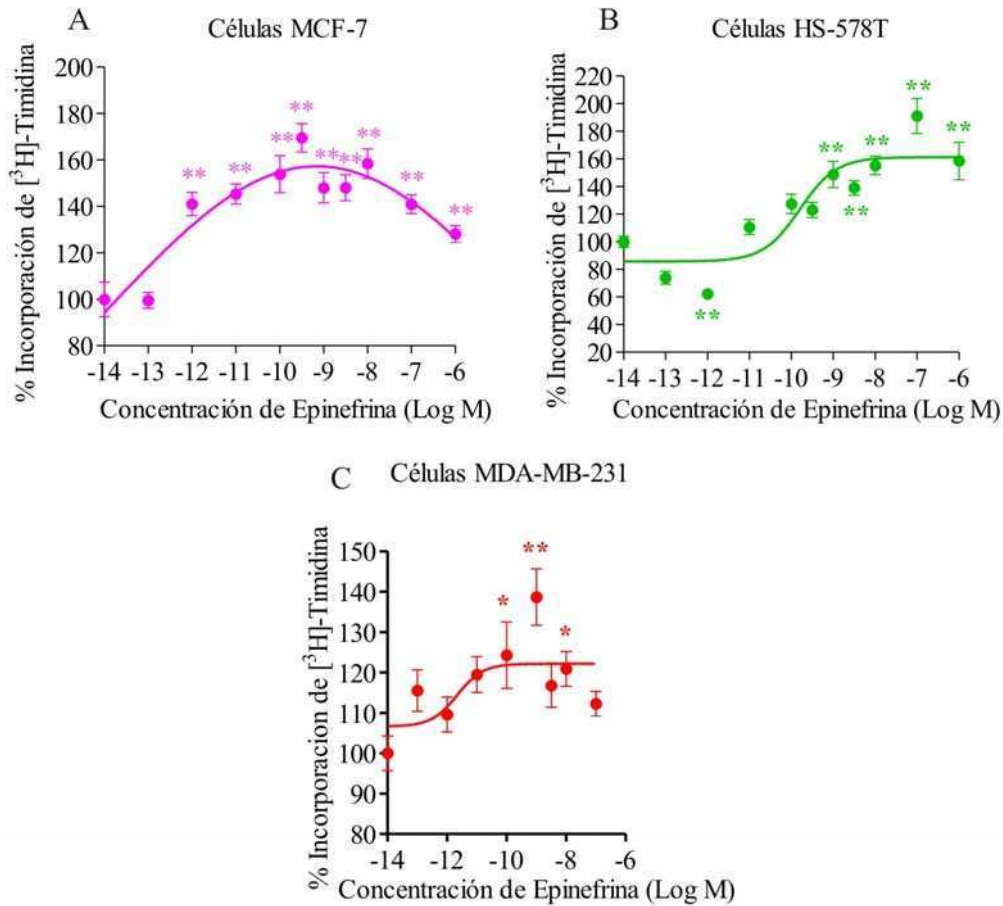


Figura 1.7. Efecto del agonista adrenérgico epinefrina en la incorporación de [³H]-Timidina en las líneas celulares MCF-7 (Panel A), HS-578T (Panel B), y MDA-MB-231 (Panel C). Los resultados se expresan como porcentaje de incorporación de [³H]-Timidina con respecto al control, el cual representa el 100% (sin epinefrina). Análisis estadístico: ANOVA seguido de test de Dunnett *p<0,05; **p<0,01.

Los resultados correspondientes a las líneas celulares desarrolladas en el laboratorio también muestran un efecto mitogénico de la epinefrina *in vitro*. En las tres líneas estudiadas el agonista natural provocó un aumento significativo de la proliferación celular. En la figura 1.8 se muestran los gráficos correspondientes (Células IBH-4, Panel A; Células IBH-6, Panel B; Células IBH-7, Panel C). Los valores de concentración efectiva 50 (EC₅₀) de epinefrina son los siguientes: IBH-4: 7,9 pM; IBH-6: 4,7 nM; IBH-7: 0,145 nM.

En las células IBH-4, para la concentración de epinefrina 1 nM, la incorporación de timidina tritiada fue de 138,2 ± 8,8 % con respecto al control p<0,01, para la concentración 10 nM la incorporación fue de 141,3 ± 7,5 % con respecto al control p<0,01.

En las células IBH-6, para la concentración de epinefrina 3 nM, la incorporación de timidina fue de $127,2 \pm 5,85$ % con respecto al control $p < 0,01$; 10 nM, $137,39 \pm 7,4$ % con respecto al control $p < 0,01$.

Por último, en la línea IBH-7, para la concentración de epinefrina 1 nM, la incorporación de timidina tritiada fue de $130,29 \pm 5,23$ % con respecto al control $p < 0,01$, para la concentración 10 nM la incorporación fue de $137,15 \pm 4,3$ % vs control $p < 0,01$.

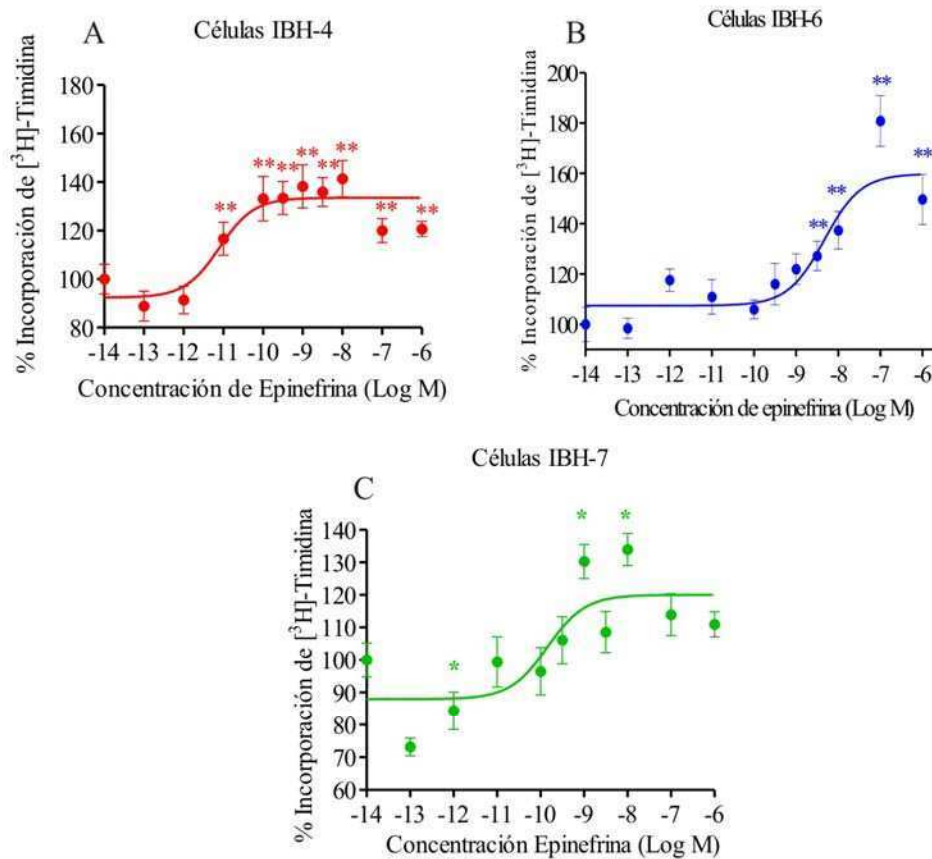


Figura 1.8. Efecto del agonista adrenérgico epinefrina en la incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina en las líneas celulares IBH-4 (Panel A), IBH-6 (Panel B) e IBH-7 (Panel C). Los resultados se expresan como porcentaje de incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina con respecto al control, el cual representa el 100% (sin epinefrina). Análisis estadístico: ANOVA seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La acción de la epinefrina resultó ser mitogénica en todas las líneas celulares estudiadas. Asimismo, la incubación en las mismas condiciones con 10 ng/ml de EGF y con 1nM de estradiol o progesterona también provoca en estas líneas tumorales un aumento de la proliferación celular del mismo orden de magnitud que el obtenido luego de la incubación con epinefrina (Vazquez y col., 2004).

El siguiente objetivo fue elucidar el efecto del agonista β -adrenérgico isoproterenol y el agonista β_2 -adrenérgico salbutamol en los ensayos de proliferación *in vitro*.

En la figura 1.9 se muestran los resultados de las curvas dosis-respuesta en las líneas tumorales mamarias humanas MCF-7, HS-578T y MDA-MB-231.

En las células MCF-7 (Panel A) los datos ajustan a una distribución gaussiana aunque ninguno de los valores de estimulación sea significativo. En realidad, parecería un artefacto matemático y no una respuesta biológica. La incorporación de timidina resultó significativamente menor comparada con el control para las concentraciones del agonista 3 nM ($88,52 \pm 4,5 \%$ vs $100 \pm 8,22 \%$, $p < 0,01$), 0,1 μ M ($84,24 \pm 6,89 \%$ vs $100 \pm 8,22 \%$, $p < 0,01$) y 1 μ M ($82,42 \pm 8,9 \%$ vs $100 \pm 8,22 \%$, $p < 0,05$).

Se comparó el efecto del agonista β no selectivo isoproterenol y del selectivo β_2 salbutamol en las células HS-578T (Panel B y C), las células respondieron a ambos con una disminución de la proliferación celular. La concentración efectiva 50 (EC_{50}) del agonista β_2 salbutamol fue de 0,039 nM, con valores de incorporación de timidina de $66,58 \pm 6,25 \%$ vs $100 \pm 6,042 \%$, $p < 0,01$ para 0,3 nM de salbutamol; $67,46 \pm 3,08 \%$ vs $100 \pm 8,22 \%$, $p < 0,01$ para 1 nM de salbutamol y $46,22 \pm 7,59 \%$ vs $100 \pm 8,22 \%$, $p < 0,01$ para la concentración más elevada del agonista (1 μ M).

En el caso del agonista β no selectivo isoproterenol, los datos correspondientes a las células HS-578T (Panel C) también ajustaron a una distribución sigmoidea, con un valor de EC_{50} de 17,41 nM. La máxima inhibición de la proliferación fue obtenida para la concentración de 0,1 μ M isoproterenol ($80,84 \pm 5,28 \%$ vs $100 \pm 3,078 \%$, $p < 0,01$).

Por último, las células MDA-MB-231 (Panel D) respondieron de la misma manera al agonista β_2 salbutamol, mostrando más sensibilidad que las otras líneas en los experimentos de proliferación celular luego de la incubación con el mismo. En estas células, el valor de EC_{50} (2,63 pM) fue mucho menor comparado con las demás líneas celulares estudiadas. A modo de ejemplo, los valores fueron de $77,91 \pm 3,73 \%$ vs $100 \pm 2,46 \%$, $p < 0,01$ para una concentración 0,1 nM de salbutamol.

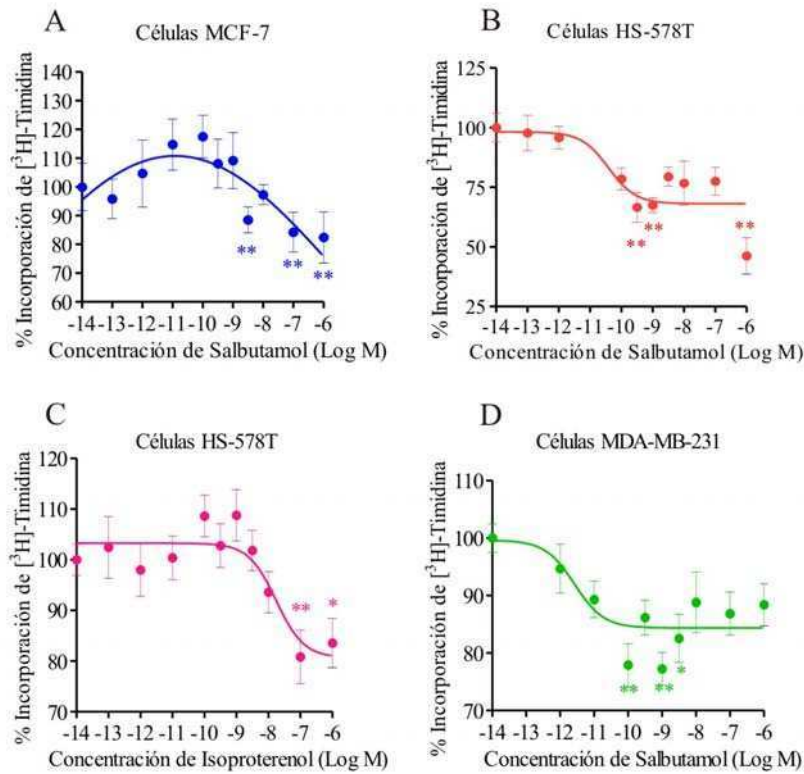


Figura 1.9. Efecto de los agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y salbutamol) en la incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina en las líneas celulares MCF-7 (Panel A), HS-578T (Panel B), HS-578T (Panel C) y MDA-MB-231 (Panel D). Los resultados se expresan como porcentaje de incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina con respecto al control, el cual representa el 100% (en ausencia de agonista). Análisis estadístico: ANOVA seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Con respecto a las líneas desarrolladas en el laboratorio, se estudió el efecto de los agonistas β -adrenérgicos en células epiteliales provenientes de cultivos primarios de los tumores IBH-6 e IBH-4 derivados de animales sin tratar. Los resultados se muestran en la figura 1.10.

En la mayoría de los casos, los datos ajustaron a una distribución sigmoidea, con valores de EC_{50} entre 0,03 nM y 90 nM. En las células IBH-6 (Panel A), el agonista isoproterenol provocó la disminución significativa de la proliferación para las siguientes concentraciones: 1 nM, $68,7 \pm 3,604$ % vs control $p < 0,05$; 10 nM, $71,46 \pm 5,63$ % vs control $p < 0,05$; 0,1 μM , $67,02 \pm 6,11$ % vs control $p < 0,05$; 1 μM , $66,39 \pm 5,58$ % vs control $p < 0,01$.

En esta misma línea celular (Panel B), el agonista β_2 salbutamol provocó una disminución aun mayor de la proliferación. A modo de ejemplo, para 0,1 nM del agonista se observó lo siguiente: $59,88 \pm 5,62$ % vs control $p < 0,05$ y una máxima inhibición para 1 μM ($32,12 \pm 1,76$ % vs control $p < 0,01$).

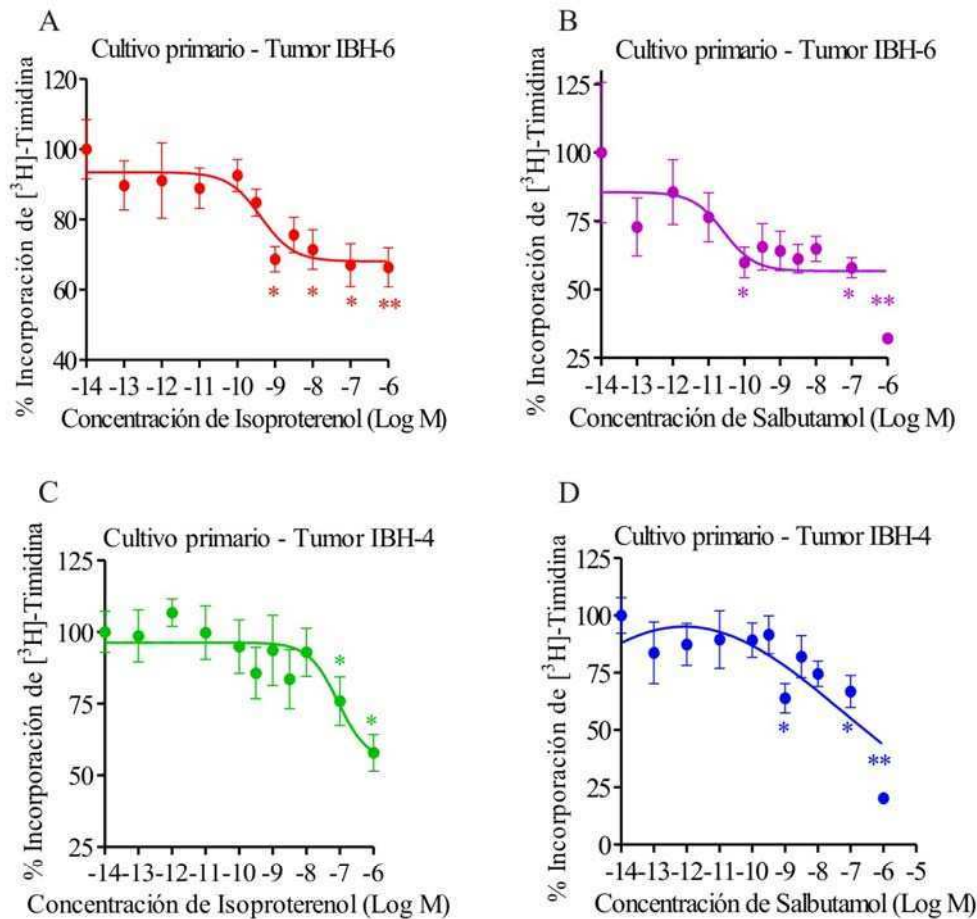


Figura 1.10. Efecto de los agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y salbutamol) en la incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina en las líneas celulares IBH-6 (Panel A y B) e IBH-4 (Panel C y D). Los resultados se expresan como porcentaje de incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina con respecto al control, el cual representa el 100% (en ausencia de agonista). Análisis estadístico: ANOVA seguido de test de Dunnett * p < 0,05; ** p < 0,01.

En la línea IBH-4 (Panel C), la incubación con isoproterenol provocó una disminución significativa de la proliferación celular para las concentraciones 0,1 μM y 1 μM ($75,87 \pm 8,49$ % vs control p < 0,05 y $57,86 \pm 6,38$ % vs control p < 0,05 respectivamente). Al utilizar el agonista β_2 -adrenérgico salbutamol (Panel D), se observó una respuesta significativa para menores concentraciones (0,1 nM: $63,865 \pm 6,42$ % vs control p < 0,05; 0,1 μM : $66,83 \pm 6,99$ % vs control p < 0,05 y 1 μM $20,24 \pm 2,38$ % vs control p < 0,01).

En la siguiente tabla (Tabla 1.1) se muestran los valores de EC_{50} de todos los experimentos de proliferación celular realizados con epinefrina, ordenados según la línea celular correspondiente. En la Tabla 1.2 se muestran los datos correspondientes a las curvas de proliferación realizadas utilizando los agonistas β -adrenérgicos isoproterenol y/o salbutamol. En el caso que los datos hayan sido ajustados a una curva gaussiana, se presenta la concentración a la cual se obtuvo la mayor incorporación $[^3\text{H}]$ -

Timidina (epinefrina) o la menor incorporación de la misma (isoproterenol y salbutamol).

Células	Concentración de Epinefrina
MCF-7	0,3 nM
HS-578T	0,16 nM
MDA-MB-231	2,2 pM
IBH-4	7,9 pM
IBH-6	4,7 nM
IBH-7	0,145 nM

Tabla 1.1. Concentración efectiva 50 de epinefrina (EC_{50}) / Concentración de máxima incorporación de [3H]-Timidina según la línea celular.

Células	Tratamiento	Concentración
MCF-7	Salbutamol	1 μ M
HS-578T	Isoproterenol	17,41 nM
	Salbutamol	39 pM
MDA-MB-231	Salbutamol	2,63 pM
IBH-4	Isoproterenol	87,3 nM
	Salbutamol	1 μ M
IBH-6	Isoproterenol	42 nM
	Salbutamol	26,32 pM

Tabla 1.2. Concentración efectiva 50 de isoproterenol y salbutamol (EC_{50}) / Concentración de mínima incorporación de [3H]-Timidina según la línea celular.

En base a todos los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con epinefrina, se concluye que la acción estimuladora de la proliferación celular estaría mediada principalmente por los RA- α_2 , mientras que a altas concentraciones del agonista natural (0,1 μ M, 1 μ M) el efecto β -adrenérgico inhibitorio comenzaría a apreciarse (los valores de incorporación de timidina empiezan a disminuir). Por el contrario, el efecto biológico neto mediado por los RA- β (estudiado con los agonistas isoproterenol y salbutamol) es inhibitorio de la proliferación celular en todas las líneas tumorales mamarias estudiadas.

Efecto de compuestos adrenérgicos sobre la fosforilación de las proteínas Erk1/2 en las líneas tumorales mamarias humanas

Las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) modulan una gran variedad de actividades celulares, las cuales están evolutivamente conservadas y sirven de nexo entre las señales extracelulares y la maquinaria intracelular, controlando procesos tales como crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (Raman y *col.*, 2007, Dhillon y *col.*, 2007).

En particular, resultó de interés estudiar la vía de las quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (Erk1/2, también conocidas como p42 y p44 MAPK), las cuales son activadas principalmente por factores de crecimiento (Turjanski y *col.*, 2007).

El objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar el efecto de los compuestos adrenérgicos (en particular los agonistas β -adrenérgicos) sobre la fosforilación de las proteínas Erk1/2 utilizando las líneas celulares mamarias humanas MDA-MB-231, IBH-4 e IBH-6 y la técnica de *Western blot*.

En la figura 1.11 se muestran los resultados correspondientes a la línea MDA-MB-231 luego de la incubación *in vitro* con ambos agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y salbutamol). Estas células mostraron una inhibición significativa de la fosforilación de Erk1/2 a todos los tiempos de incubación estudiados. El agonista β isoproterenol y el agonista β_2 salbutamol fueron utilizados a una concentración final de 10 nM y el efecto inhibitorio de la razón pErk/Erk resultó significativo aun después de 4hs de incubación con ambos agonistas (pErk/Erk para Iso: $0,81 \pm 0,15$ vs Control $1,04 \pm 0,45$, $p < 0,05$; Salb: $0,71 \pm 0,14$ vs Control, $p < 0,05$). Estos resultados estarían indicando que la vía de señalización es modulada por los agonistas adrenérgicos aun a bajas concentraciones y a largos tiempos de incubación con los mismos.

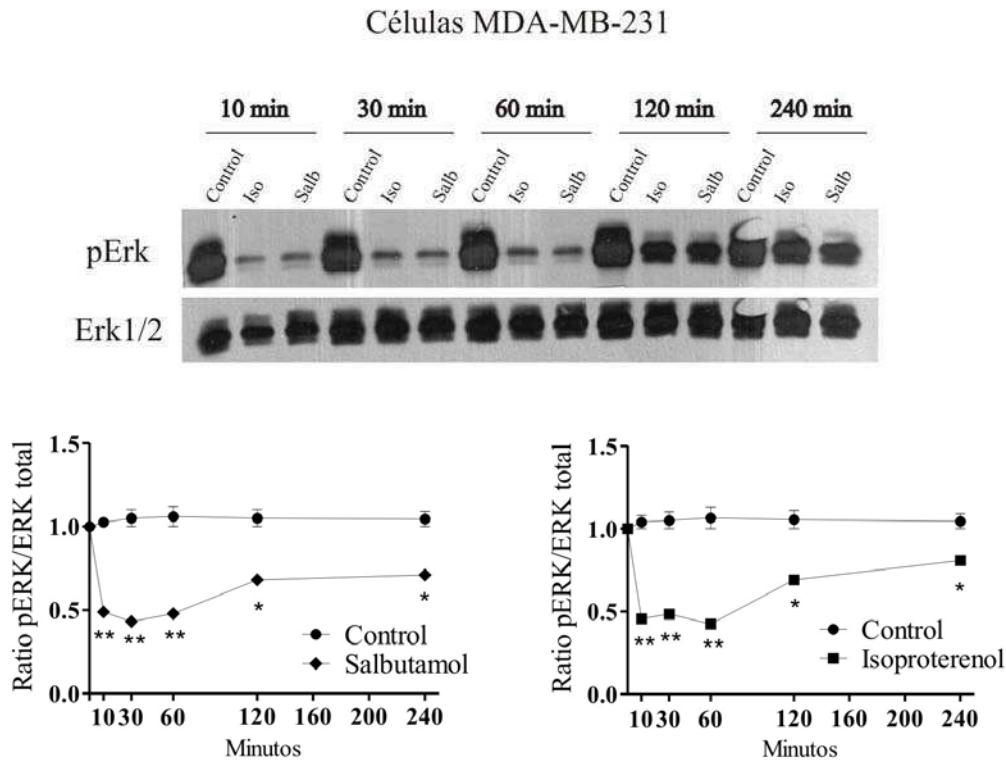


Figura 1.11. Efecto de agonistas β -adrenérgicos sobre la activación de Erk1/2 en extractos proteicos de las células MDA-MB-231. Las células se sembraron en placas de petri de 60mm y una vez adheridas se arretaron con medio sin suero. Posteriormente fueron incubadas con isoproterenol (10nM), salbutamol (10nM) o medio sin suero (control) durante distintos tiempos (10, 30, 60, 120 y 240 min).

Se realizaron extractos de proteínas totales utilizando el *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Se sembraron 50-100 μ g de proteínas para cada ensayo de WB, en geles de 10% acrilamida. Se reveló con los anticuerpos específicos para pErk y Erk total y se analizaron los resultados con el programa ImageJ.

Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

El siguiente paso fue evaluar si los agonistas β -adrenérgicos inhibían la fosforilación de Erk1/2 mediante una activación clásica del receptor. Clásicamente, los receptores β_2 -adrenérgicos median su respuesta a través del acoplamiento a la proteína Gs y estimulando la producción de AMPc (Evans y *col.*, 2010). En la figura 1.12 (Panel A) se muestran los resultados correspondientes a los ensayos de *Western blot* luego de tratar a las células con los agonistas β (Iso y Salb), EGF, dexmedetomidina y forskolina (FSK, compuesto derivado de la planta *Coleus forskohlii*, ampliamente utilizado para aumentar los niveles intracelulares de AMPc). La FSK provocó el mismo efecto que ambos agonistas β -adrenérgicos sobre la fosforilación de las proteínas Erk1/2, este resultado estaría indicando que la activación del RA- β_2 esta asociada a un aumento en los niveles de AMPc.

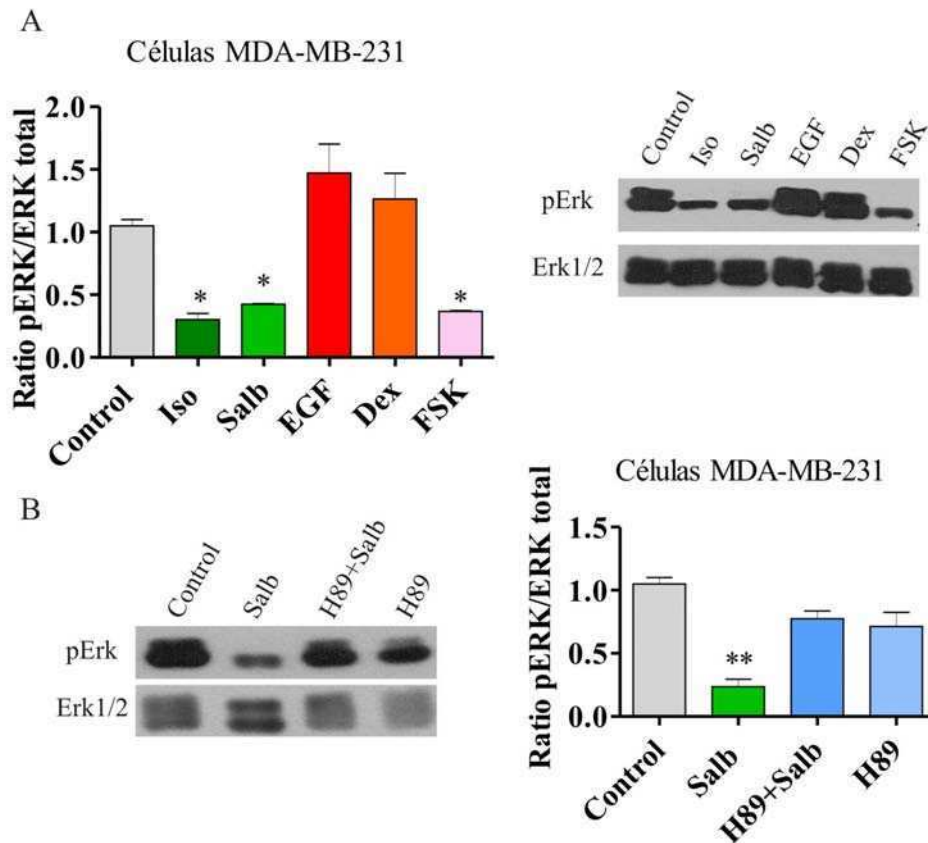


Figura 1.12. Efecto de agonistas β -adrenérgicos sobre la activación de Erk1/2 en extractos proteicos de las células MDA-MB-231. Las células se sembraron en placas de petri de 60mm y una vez adheridas se arrestarton con medio sin suero. **Panel A.** Posteriormente fueron incubadas con isoproterenol (ISO, 1 μ M), salbutamol (SALB, 1 μ M), EGF (20ng/ml), el agonista α_2 dexmedetomidina (Dex, 1 μ M), forskolina (FSK, 10 μ M) o medio sin suero (Control) durante 15 minutos. **Panel B.** Las células fueron incubadas con el agonista salbutamol (SALB, 1 μ M) en presencia y ausencia del inhibidor de PKA H89 (H89, 25 μ M) o medio sin suero (Control) durante 15 minutos. Se realizaron extractos de proteínas totales utilizando el *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Se sembraron 50-100 μ g de proteínas para cada ensayo de WB, en geles de 10% acrilamida. Se reveló con los anticuerpos específicos para pErk y Erk total y se analizaron los resultados con el programa ImageJ. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En el panel B (figura 1.12) se muestran los resultados de *Western blot* luego de incubar a las células MDA-MB-231 con un inhibidor específico de la PKA, el H89. Este inhibidor revirtió el efecto del agonista β salbutamol sobre la fosforilación de Erk1/2 (Salb: $0,23 \pm 0,08$ vs Control $1,05 \pm 0,05$, $p < 0,01$, H89+Salb: $0,77 \pm 0,06$ vs Control, no significativo) y no tuvo ningún efecto *per se*.

El factor de crecimiento epidermal (EGF) y la dexmedetomidina (Dex, agonista de los RA- α_2) se utilizaron como controles, se observó un aumento en la razón pErk/Erk en ambos casos. Está descrito que el EGF provoca un aumento en la fosforilación de

Erk1/2 (Li y *col.*, 2008). Por otro lado, en trabajos previos del laboratorio, nuestro grupo observó que la dexmedetomidina provoca un aumento en los niveles de fosforilación de esta proteína (Bruzzone, 2008).

Luego se realizaron los experimentos utilizando las células IBH-4 e IBH-6 (Figura 1.13) con el mismo objetivo planteado anteriormente. Además, en los experimentos con la línea IBH-4 se utilizaron análogos de AMPc de forma de averiguar si el aumento de AMPc estaba activando a la PKA (análogo activador de PKA, 6-Bnz-AMPc), a la proteína intercambiadora activada directamente por AMPc (EPAC) (análogo activador de EPAC, 8-CPT-2'-O-Me-AMPc) o a ambas proteínas (8Br- AMPc).

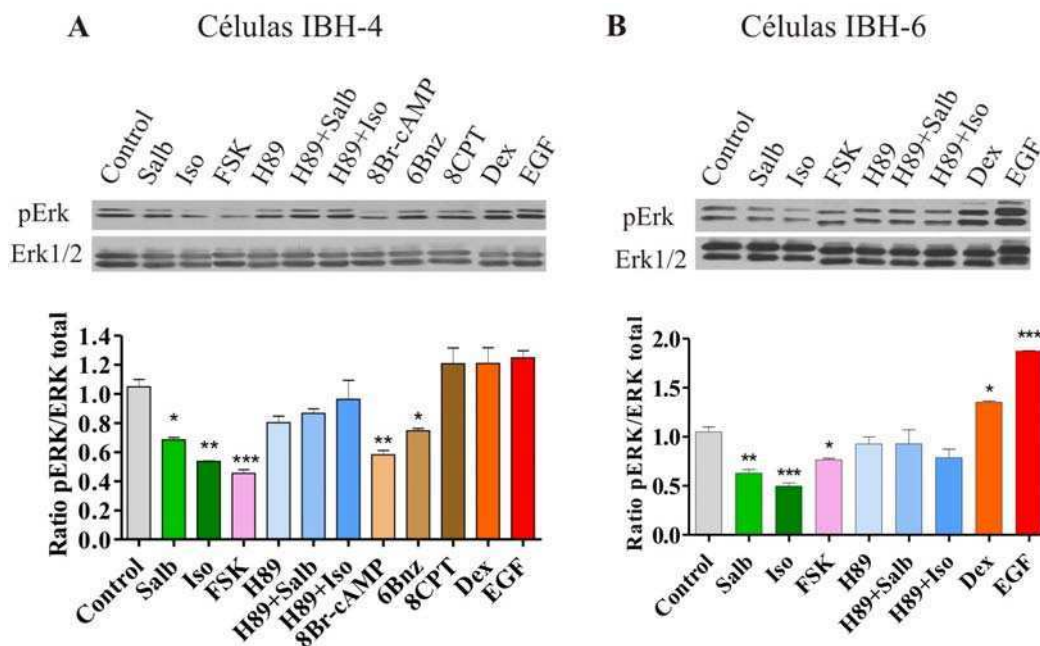


Figura 1.13. Efecto de agonistas β -adrenérgicos, análogos de AMPc e inhibidor específico de PKA sobre la activación de Erk1/2 en extractos proteicos de las células IBH-4 (Panel A) e IBH-6 (Panel B). Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y una vez adheridas se arrestaron con medio sin suero. Posteriormente fueron incubadas con isoproterenol (ISO, 1 μ M), salbutamol (SALB, 1 μ M), forskolina (FSK, 10 μ M), el inhibidor de PKA H89 (H89, 25 μ M) en presencia y ausencia de los agonistas salbutamol (H89+SALB, 1 μ M) e isoproterenol (H89+ISO, 1 μ M), 8Br-AMPc activador de la proteína quinasa tipo I y II (8Br-AMPc, 100 μ M), 6-Bnz-AMPc activador selectivo de PKA (6Bnz, 100 μ M), 8-CPT-2'-O-Me-AMPc activador específico de la proteína EPAC dependiente de AMPc (8CPT, 100 μ M), EGF (20ng/ml), el agonista α_2 dexmedetomidina (Dex, 1 μ M) y medio sin suero (Control) durante 15 minutos.

Se realizaron extractos de proteínas totales utilizando el *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Se sembraron 50- 100 μ g de proteínas para cada ensayo de WB, en geles de 10% acrilamida. Se reveló con los anticuerpos específicos para pErk y Erk total y se analizaron los resultados con el programa ImageJ. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ambas líneas celulares mostraron una gran disminución de la fosforilación de Erk1/2 luego de la incubación con los agonistas β -adrenérgicos (Figura 1.13; IBH-4: Salb $0,68 \pm 0,02$ vs Control $1,05 \pm 0,05$, $p < 0,05$, Iso $0,53 \pm 0,001$ vs Control, $p < 0,01$; IBH-6: Salb $0,62 \pm 0,03$ vs Control $1,04 \pm 0,05$, $p < 0,01$, Iso $0,49 \pm 0,03$ vs Control, $p < 0,01$). La forskolina provocó el mismo efecto, indicando que la disminución en la razón pErk/Erk estaría causada por el aumento de AMPc. Además, el inhibidor de PKA (H89) revirtió el efecto de los agonistas β -adrenérgicos (IBH-4: H89+Salb $0,86 \pm 0,02$, H89+Iso $0,96 \pm 0,13$; ambas comparaciones no significativas con el control. IBH-6: H89+Salb $0,92 \pm 0,14$, H89+Iso $0,78 \pm 0,08$; ambas comparaciones no significativas con el control) y no tuvo ningún efecto *per se* sobre el parámetro estudiado.

Los resultados correspondientes a las incubaciones con análogos de AMPc confirmaron lo previamente propuesto. El análogo 8-Br-AMPc provocó una disminución de la fosforilación de Erk1/2 en las células IBH-4 luego de 15 minutos de incubación (8-Br-AMPc $0,58 \pm 0,03$ vs Control, $p < 0,01$). Asimismo, el análogo específico activador de PKA (6Bnz) logró disminuir la razón pErk/Erk de la misma forma que el 8-Br-AMPc (6Bnz $0,75 \pm 0,01$ vs Control, $p < 0,05$), implicando únicamente la activación de PKA en el efecto de los agonistas β -adrenérgicos sobre la fosforilación de Erk1/2. Por el contrario, el análogo activador de EPAC (8CPT) no provocó ningún efecto cuando se compararon los resultados con respecto al control.

En ambas líneas celulares se realizaron incubaciones con dexmedetomidina y EGF como controles positivos. La línea IBH-6 aumentó significativamente los niveles de pErk con respecto al control, siendo el efecto del EGF muy estimulador mientras que la dexmedetomidina generó una respuesta más moderada (EGF: $1,873 \pm 0,004$ vs Control $p < 0,001$; Dex: $1,35 \pm 0,01$ vs Control $p < 0,05$). En la línea IBH-4 se detectó un leve aumento en los niveles de fosforilación luego de estos tratamientos pero no resultaron significativos. Esto podría deberse a que el tiempo de estimulación no fue el suficiente para que el efecto sobre la fosforilación de Erk1/2 sea significativamente mayor que en el control.

CAPITULO II

Expresión de receptores β_2 -adrenérgicos en modelos *in vivo* de cáncer de mama humano

Luego de estudiar el efecto de los compuestos β -adrenérgicos en modelos *in vitro* de cáncer de mama humano, se quiso evaluar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento tumoral y así tener una aproximación más real de lo que podría ocurrir con un tumor mamario humano. Si bien las líneas celulares son de gran utilidad para la investigación en cáncer, presentan grandes limitaciones. Los cultivos celulares carecen de estructura tridimensional, así como de la diversidad celular que presenta un tumor (células estromales, células del sistema inmunitario y del sistema circulatorio, entre otras).

Se utilizó como modelo *in vivo* a las líneas tumorales mamarias humanas desarrolladas en nuestro laboratorio (IBH-4 e IBH-6) creciendo en ratones desnudos inmunosuprimidos o ratones NUDE. En un trabajo previo del laboratorio se describieron y se caracterizaron estas líneas creciendo *in vivo* (Bruzzone y col., 2009).

En todos los casos, los tumores se desarrollan a partir de la inyección subcutánea de las distintas células en el flanco derecho del animal y luego se realizan pasajes singeneicos (Bruzzone y col., 2009).

La inyección de células IBH-4 en ratones desnudos provoca el desarrollo de carcinomas poco diferenciados, con un patrón histológico fusocelular y sarcomatoide. Estos tumores presentan grandes áreas de necrosis así como focos hemorrágicos. También poseen receptores hormonales pero pueden crecer en ausencia de la administración exógena de estrógenos. Expresan las isoformas A y B del receptor de progesterona y la isoforma α del receptor de estrógenos (Bruzzone y col., 2009). La isoforma β del RE no fue analizada, pero sí la expresan las células en cultivo. Es muy probable que la expresen también los tumores generados por estas células en los ratones desnudos.

Los tumores originados a partir de las células IBH-6 presentan un patrón histológico similar a los tumores IBH-4 (poco diferenciado, fusocelular y sarcomatoide) (Bruzzone y col., 2009). Aunque, a diferencia del tumor IBH-4, presentan dos poblaciones celulares morfológicamente diferentes: células fusiformes y células anaplásicas, estas últimas muy grandes y poliédricas. Estos tumores presentan focos necróticos pero no focos hemorrágicos, se observan los tabiques fibrosos donde se ubican los vasos sanguíneos. También expresan receptores hormonales, al igual que los tumores IBH-4

(isoformas A y B del receptor de progesterona y la isoforma α del receptor de estrógenos).

En ambos tumores las células del parénquima tumoral mostraron un fenotipo agresivo: alto pleomorfismo, núcleos desiguales, alto índice mitótico, alta relación núcleo-citoplasma y una distribución desigual de la cromatina.

En un principio, se confirmó la expresión del RA- β_2 en los tumores IBH-4 e IBH-6 mediante RT-PCR. También se estudió la expresión en tumores provenientes de células MDA-MB-231 y MCF-7 a modo de control. En la figura 2.1 se muestran los resultados correspondientes.

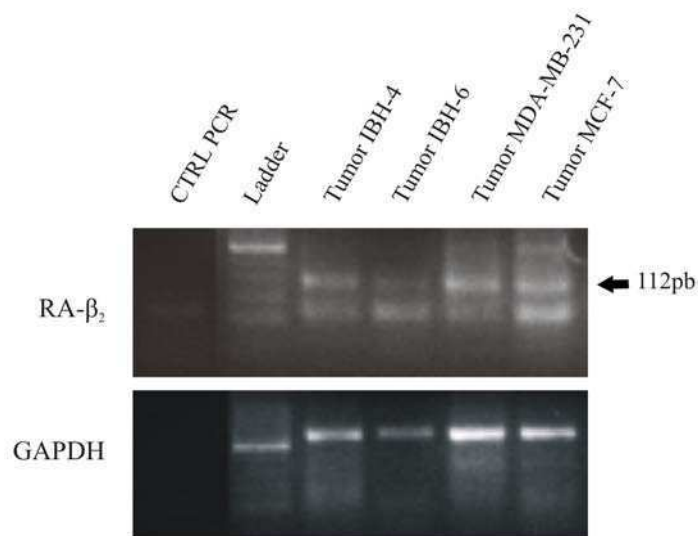


Figura 2.1. RT-PCR para el receptor β_2 -adrenérgico en los tumores IBH-4, IBH-6, MDA-MB-231 y MCF-7. En todos los casos, GAPDH fue utilizado como control de expresión. El control negativo fue realizado en ausencia de ADNc.

En todos los tumores analizados se detectó la banda de expresión del RA- β_2 (amplicon de 112pb) y la banda correspondiente a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (amplicon de 300pb), la cual se utilizó como control de expresión.

Al realizarse los ensayos de inmunohistoquímica a partir de cortes parafinados de los tumores IBH-4 e IBH-6, se observó una tinción positiva para RA- β_2 , siendo su localización principalmente citoplasmática (Figura 2.2).

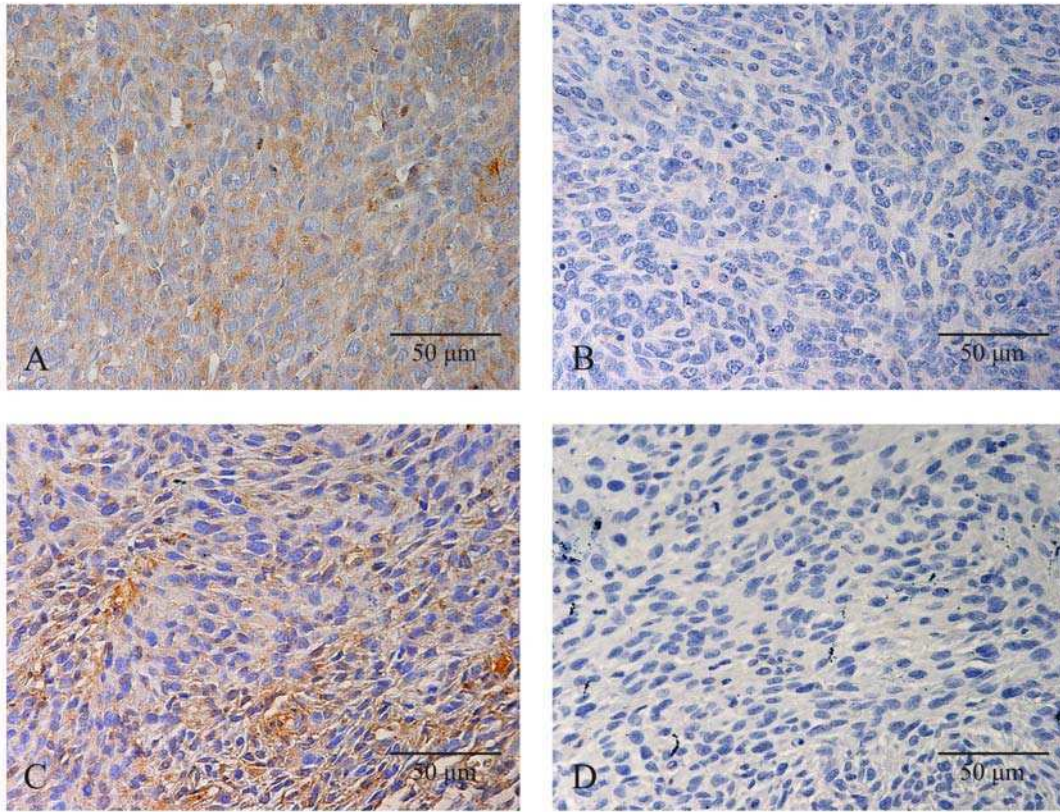


Figura 2.2. Ensayo de inmunohistoquímica para el RA- β_2 en los tumores IBH-4 (Panel A y B) e IBH-6 (Panel C y D). Panel A y C: RA- β_2 ; Panel B y D: Control (omisión del anticuerpo primario). Aumento 40x.

Efecto de compuestos β -adrenérgicos en modelos *in vivo* de cáncer de mama humano

Los experimentos *in vivo* se realizaron con el objetivo de estudiar el efecto de los agonistas β -adrenérgicos (salbutamol e isoproterenol), teniendo como antecedente las respuestas observadas en los experimentos *in vitro*.

Inicialmente se realizó una comparación del efecto de los dos agonistas β -adrenérgicos de forma tal de corroborar si ambos provocaban el mismo efecto sobre el crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en la figura 2.3.

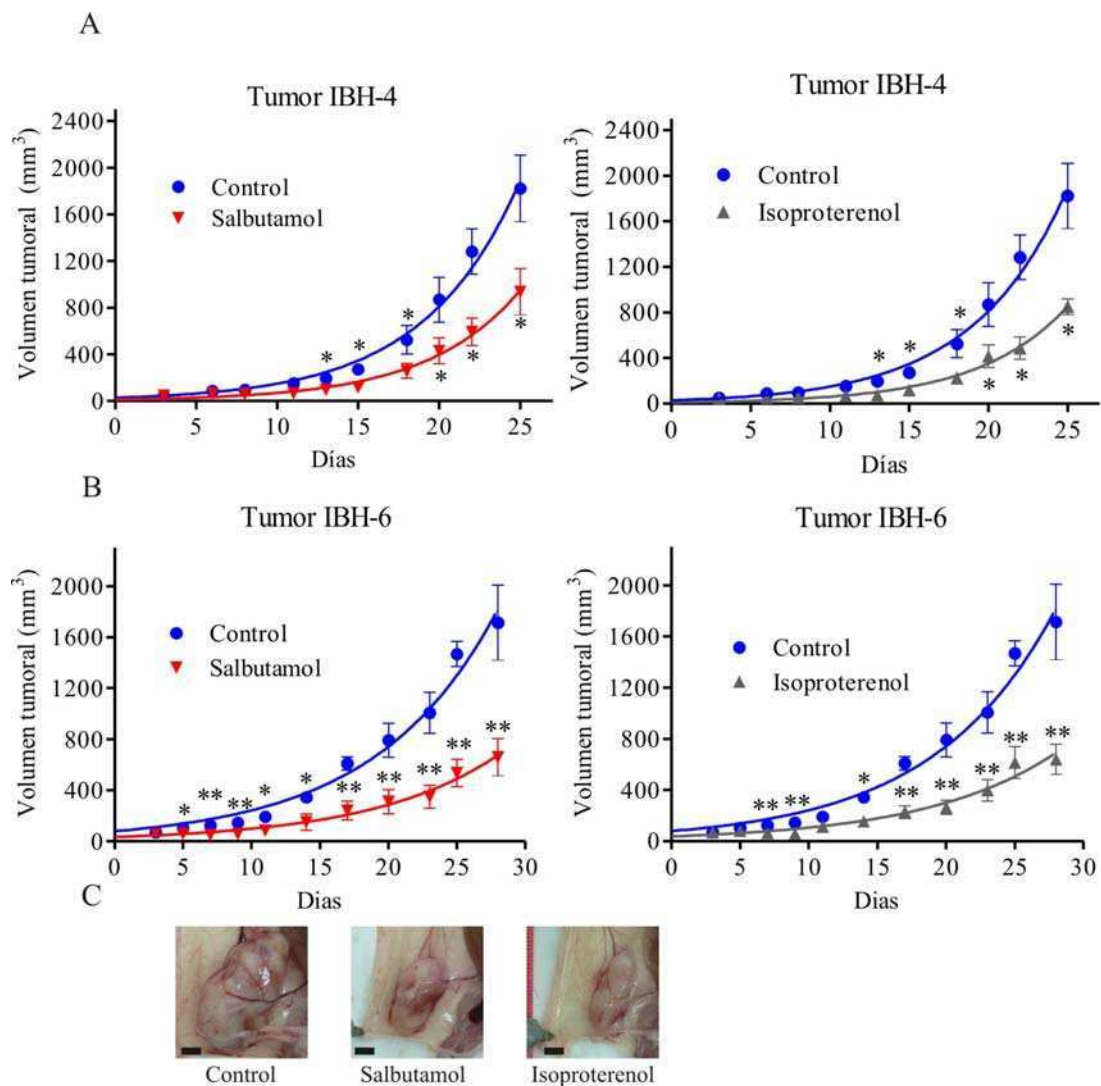


Figura 2.3. Comparación del efecto del isoproterenol (agonista RA- β no selectivo) y salbutamol (agonista RA- β_2) en las líneas tumorales mamarias humanas creciendo en ratones inmunosuprimidos. Tumor IBH-4 (Panel A), Tumor IBH-6 (Panel B). Dosis de salbutamol: 1,2 mg/kg/día; isoproterenol: 1mg/kg/día; control: solución fisiológica. Panel C: Fotografías representativas del tumor IBH-6 al finalizar el experimento (escala: 1cm) . Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * p<0,05, ** p<0,01.

Para realizar este experimento se dividió a los animales en tres grupos: control, salbutamol e isoproterenol. Los animales fueron inyectados diariamente con los agonistas β -adrenérgicos. En ambos tumores los dos agonistas provocaron una disminución significativa del crecimiento tumoral.

Para corroborar que el efecto es debido a la acción del RA- β_2 , se revirtió la acción del agonista *in vivo* con el antagonista propanolol (también llamado propranolol). En la figura 2.4 se muestran los resultados del experimento *in vivo* con los tumores IBH-4 e IBH-6 luego de la administración diaria de los compuestos β -adrenérgicos. Como se describió anteriormente, los tumores IBH-4 e IBH-6 presentan una cinética de crecimiento exponencial (Bruzzone y *col.*, 2009).

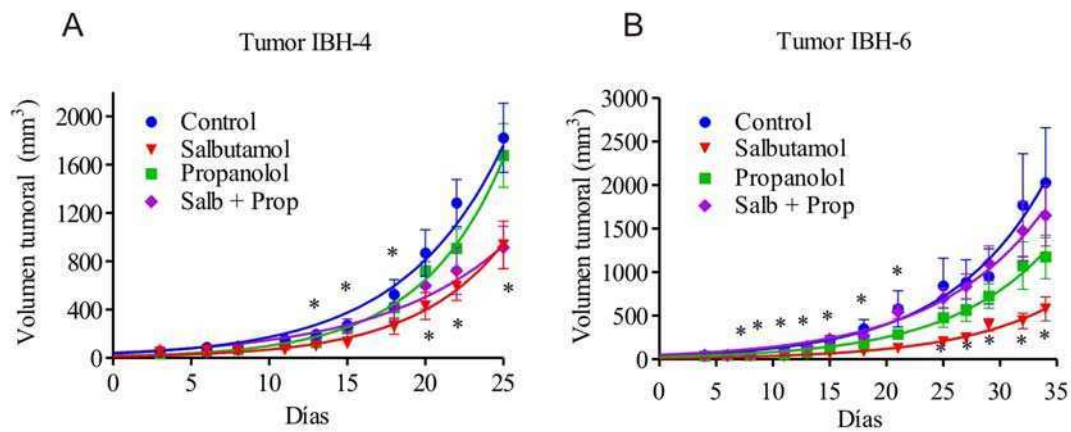


Figura 2.4. Efecto de compuestos β -adrenérgicos en las líneas tumorales mamarias humanas creciendo en ratones inmunosuprimidos. Tumor IBH-4 (Panel A), Tumor IBH-6 (Panel B). Dosis de salbutamol: 1,2mg/kg/día; propanolol: 1mg/kg/día; control: solución fisiológica. En el tratamiento combinado se utilizaron las mismas dosis de cada compuesto. Análisis estadístico: Anova seguido de test Dunnett * $p < 0,05$.

En el tumor IBH-4 (Panel A), el salbutamol provocó una disminución significativa del crecimiento tumoral con respecto al control a partir del día 11 de tratamiento (Salb: $67,01 \pm 7,18 \text{ mm}^3$ vs Control $153,08 \pm 32,56 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$). No se observaron diferencias en la respuesta cuando se compararon los tratamientos con los diferentes agonistas utilizados (Salbutamol e Isoproterenol). En los experimentos subsecuentes se eligió al agonista salbutamol, ya que es una droga actualmente utilizada en el tratamiento del asma.

Al finalizar el experimento (día 25), el volumen tumoral promedio de los animales control resultó aproximadamente el doble que en los animales tratados con salbutamol e isoproterenol (Control: $1822,01 \pm 285,82 \text{ mm}^3$ vs Salb: $935,06 \pm 197,80 \text{ mm}^3$ $p < 0,05$; Control vs Iso: $848,8875 \pm 67,69499 \text{ mm}^3$ $p < 0,05$).

El tratamiento con el antagonista β propanolol no provocó ningún efecto *per se*. Cuando se lo administró de forma conjunta con el agonista (Tratamiento Salb + Prop) se observó una reversión del efecto agonista. Entonces, se puede afirmar que el efecto sobre el crecimiento tumoral luego del tratamiento con salbutamol es mediado por los RA- β_2 .

Al analizar los resultados obtenidos en el tumor IBH-6 (Panel B), se observó el mismo comportamiento que en el tumor IBH-4. El efecto del salbutamol sobre la inhibición del crecimiento tumoral ocurrió a partir del día 4 de tratamiento (Salb $23,90 \pm 2,94 \text{ mm}^3$ vs Control $38,81 \pm 4,27 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$). Al final del experimento, el volumen tumoral promedio de los animales tratados con salbutamol resultó ser aproximadamente cuatro veces menor que en los animales control (Día 34: Salb $578,57 \pm 138,48 \text{ mm}^3$ vs Control $2027,72 \pm 630,86 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$).

El propanolol logró revertir completamente el efecto del salbutamol en el tratamiento conjunto (Día 27: Salb + Prop $837,35 \pm 142,35 \text{ mm}^3$; Control $883,65 \pm 259,59 \text{ mm}^3$) y cuando se lo administró individualmente no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral, aunque la curva de crecimiento resultó estar por debajo de la curva del control. Si bien este compuesto es un antagonista β , al administrarse individualmente podría actuar como agonista parcial del RA- β .

El paso siguiente fue estudiar si el efecto inhibitorio de los agonistas β -adrenérgicos era igualmente efectivo que el previamente descrito en nuestro laboratorio por parte del antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina (Bruzzone *y col.*, 2008, Luthy *y col.*, 2009). Además, se quiso estudiar el efecto de ambos compuestos cuando se los administró en forma conjunta.

El antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina se comporta como un agonista inverso cuando se lo administra en animales portadores de tumores mamarios humanos y murinos (Bruzzone *y col.*, 2008, Vazquez *y col.*, 2006, Bruzzone *y col.*, 2010). Además, en presencia de un agonista α_2 (clonidina o dexmedetomidina) es capaz de revertir su efecto (Bruzzone *y col.*, 2008, Luthy *y col.*, 2009, Bruzzone *y col.*, 2010).

Entonces, se realizaron los experimentos *in vivo* con los tumores IBH-4 e IBH-6 a fin de comparar el efecto de estos dos compuestos. En la figura 2.5 se muestran los resultados correspondientes.

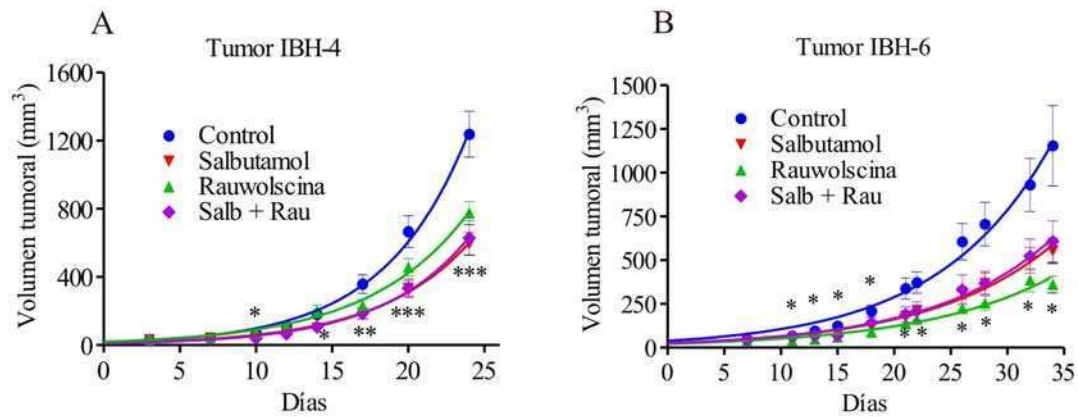


Figura 2.5. Efecto de compuestos α_2 - y β -adrenérgicos en las líneas tumorales mamarias humanas creciendo en ratones inmunosuprimidos. Tumor IBH-4 (Panel A), Tumor IBH-6 (Panel B). Dosis de salbutamol: 1,2 mg/kg/día; rauwolscina: 0,5 mg/kg/día; control: solución fisiológica. En el tratamiento combinado se utilizaron las mismas dosis de cada compuesto. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. En este caso, los asteriscos son válidos para los tres tratamientos.

En ambos tumores (Panel A y B) se observó una disminución significativa del volumen tumoral luego de la administración diaria de salbutamol y rauwolscina, tanto en los tratamientos individuales como en el tratamiento conjunto.

En el tumor IBH-4 (Panel A) las diferencias entre los tumores tratados con salbutamol, rauwolscina y el tratamiento conjunto (Salb + Rau) versus el control comenzaron a partir del día 17 (Ejemplo: Salb $187,46 \pm 32,21 \text{ mm}^3$ vs Control $358,34 \pm 54,95 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$; Rau $185,89 \pm 31,35 \text{ mm}^3$ vs Control $358,34 \pm 54,95 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$; Salb + Rau $229,60 \pm 38,22 \text{ mm}^3$ vs Control $358,34 \pm 54,95 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$).

Al finalizar el experimento (día 24), el volumen tumoral promedio de los animales control duplicó el volumen de los tumores de los animales tratados (Salb $594,24 \pm 134,97 \text{ mm}^3$ vs Control $1237,84 \pm 134,97 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$; Rau $628,20 \pm 100,07 \text{ mm}^3$ vs Control, $p < 0,001$; Salb + Rau $775,04 \pm 68,11 \text{ mm}^3$ vs Control, $p < 0,05$).

De igual forma en el caso del tumor IBH-6 (Panel B), ambos tratamientos (salbutamol y rauwolscina) disminuyeron el volumen tumoral de la misma manera. El tratamiento conjunto con ambos compuestos adrenérgicos no provocó una disminución adicional del crecimiento tumoral con las dosis utilizadas. Al día 15 del experimento, todos los tratamientos comenzaron a diferir significativamente con respecto al control (Salb $75,20 \pm 10,59 \text{ mm}^3$ vs Control $124,198 \pm 18,65 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$; Rau $59,95 \pm 7,96 \text{ mm}^3$ vs Control, $p < 0,01$; Salb + Rau $68,18 \pm 11,85 \text{ mm}^3$ vs Control, $p < 0,05$).

Al finalizar el ensayo en el día 34, el grupo control duplicó el volumen tumoral promedio (Control: $1154 \pm 229,67 \text{ mm}^3$) comparado con los tres tratamientos (Salb:

$553,73 \pm 73,46 \text{ mm}^3$, $p < 0,01$; Rau: $360,77 \pm 47,46 \text{ mm}^3$, $p < 0,01$; Salb + Rau: $606,75 \pm 118,06 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$).

Luego de realizar los experimentos *in vivo* con los compuestos α_2 y β -adrenérgicos, se evaluó el parámetro tiempo de duplicación (*doubling time*, DT) de cada curva de crecimiento tumoral, las cuales fueron ajustadas a una función exponencial. El parámetro DT representa el tiempo necesario expresado en días para que el tumor duplique su volumen (Mehrra, 2010). En la figura 2.6 se muestran los valores correspondientes para cada experimento, evaluado a la mitad del experimento y el día de finalización del mismo. Como puede apreciarse en la tabla, los valores de DT al día 15 para los agonistas β -adrenérgicos (salbutamol e isoproterenol) corresponden a aproximadamente el doble del valor del control (IBH-4: Salbutamol 9,3 días, Isoproterenol 7,9 días, Control 5 días; IBH-6 Salbutamol 7 días, Isoproterenol 7,5 días, Control 4,1 días). Este mismo resultado se observó en el tumor IBH-6 en los animales tratados con rauwolscina. Por el contrario, al finalizar el experimento el valor de DT fue similar para todos los tratamientos, indicando que los compuestos adrenérgicos utilizados en el presente trabajo provocan un retardo en la tasa de crecimiento tumoral durante los primeros días de administración de los mismos. Luego, al finalizar el experimento, la tasa de crecimiento es igual en todos los animales, la diferencia entre los tratamientos reside entonces en el tiempo que los compuestos adrenérgicos retardan el crecimiento tumoral. Cabe destacar que las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo muestran un comportamiento bastante agresivo cuando se realizan experimentos *in vivo* y los compuestos adrenérgicos parecerían modular el crecimiento de los tumores, no provocar una regresión tumoral. Además, se puede suponer que este retardo en el crecimiento tumoral observado al principio de los experimentos por acción de los agonistas β -adrenérgicos podría terminarse debido a la regulación negativa de los RA- β en presencia de los agonistas. Estos receptores se desensibilizan (*downregulación*) luego de la exposición prologada a agonistas. La ausencia de los RA- β en la membrana celular (debido a la presencia constante del agonista) podría estar causando la disminución del valor de DT (en el tumor IBH-4) ya que el sistema podría no estar respondiendo a la administración de los agonistas (por ausencia del RA- β en la superficie celular). En el caso del tumor IBH-6, el valor de DT en los controles es mayor que al comienzo del experimento. Esto podría deberse a un aumento de la necrosis a medida que el volumen tumoral es mayor.

Tiempo de Duplicación (DT)					
In vivo β-adrenérgicos					
Tumor IBH-4			Tumor IBH-6		
	DT			DT	
	Día 15	Día 25		Día 15	Día 34
Control	5	4,5	Control	4,1	6,0
Salbutamol	9,3	4,0	Salbutamol	7,0	6,1
Propanolol	3,9	3,7	Propanolol	5,8	6,1
Prop+Salb	4,1	5,7	Prop+Salb	3,7	6,7
Isoproterenol	7,9	4,3	Isoproterenol	7,5	6,7

In vivo α_2 y β-adrenérgicos					
Tumor IBH-4			Tumor IBH-6		
	DT			DT	
	Día 14	Día 24		Día 15	Día 34
Control	3,2	3,8	Control	5,3	6,9
Salbutamol	5,4	4,2	Salbutamol	7,5	7,5
Rau+Salb	4,3	4,0	Rau+Salb	10,4	8,1
Rau	4,1	4,5	Rau	14,0	7,4

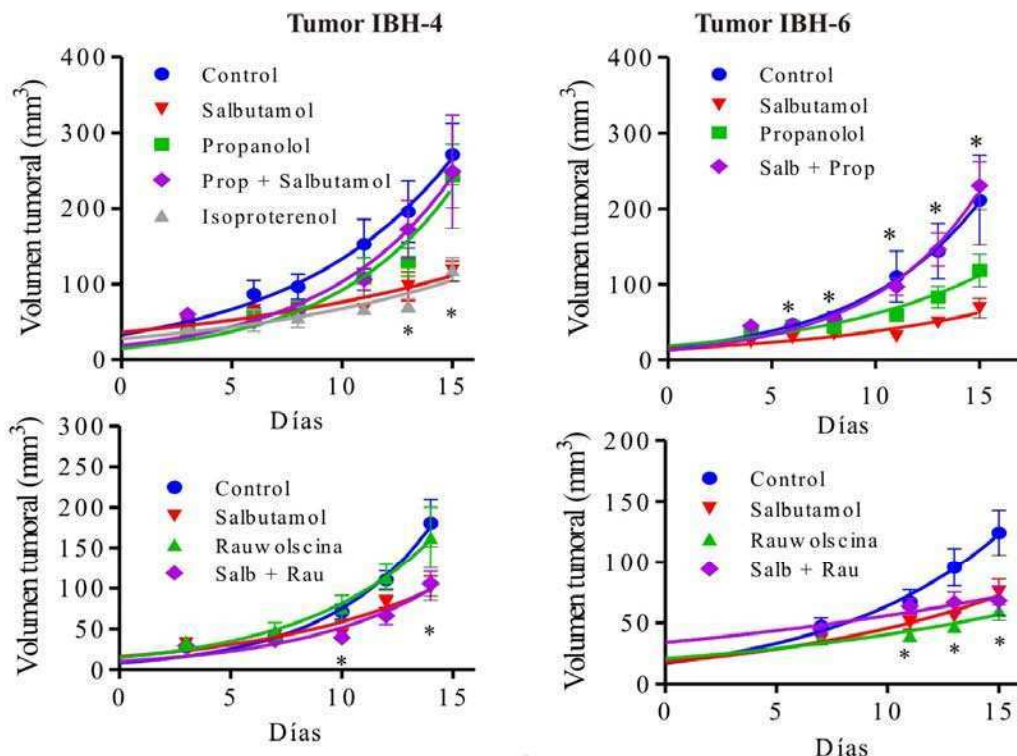


Figura 2.6. Tabla de tiempo de duplicación (*doubling time*, DT) para los experimentos *in vivo* en los tumores IBH-4 e IBH-6. Los valores de DT se expresan en días. Las curvas de crecimiento tumoral muestran los resultados hasta el día 15 de cada experimento *in vivo*. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett *p<0,05.

El siguiente objetivo fue estudiar el mecanismo de muerte celular responsable de la disminución del volumen tumoral luego de los tratamientos con salbutamol, rauwolscina y ambos compuestos (Salb + Rau) en los modelos *in vivo* utilizados anteriormente (Tumores IBH-4 e IBH-6).

Datos previos del laboratorio mostraron un efecto significativo de la rauwolscina en el índice apoptótico del tumor mamario murino hormono-independiente CC4-3-HI (Bruzzone *y col.*, 2008). En este modelo tumoral, el antagonista rauwolscina provocó un aumento significativo de la apoptosis comparado con el control.

Entonces, se examinaron cortes en parafina de tumores IBH-4 e IBH-6 provenientes de los distintos tratamientos mediante la técnica de TUNEL con la finalidad de determinar el porcentaje de células apoptóticas en cada caso.

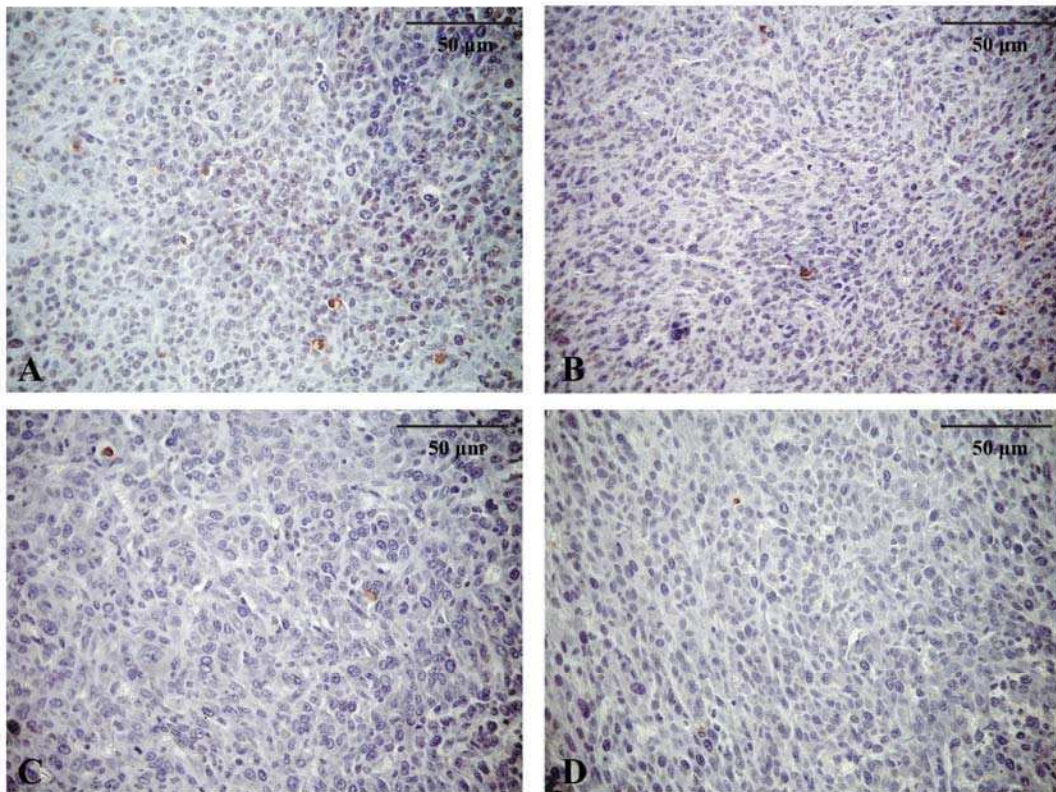


Figura 2.7. Ensayo de inmunohistoquímica para la marcación *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*) en cortes provenientes del tumor IBH-4 luego del tratamiento con compuestos β -adrenérgicos. Panel A: Control; Panel B: Salbutamol; Panel C: Propranolol; Panel D: Salb + Prop. Aumento 40x.

En la figura 2.7 se muestran las fotografías correspondientes a los ensayos de marcación de células apoptóticas en el tumor IBH-4 luego del tratamiento con compuestos β -adrenérgicos.

Luego de cuantificar el número de células apoptóticas en cada tratamiento (contando células marcadas y células totales), se calculó el porcentaje de apoptosis (Figura 2.11).

Lo mismo se hizo para el tumor IBH-6 luego del tratamiento con los compuestos β -adrenérgicos. Las fotografías se muestran en la figura 2.8 y el análisis de los resultados en la figura 2.11.

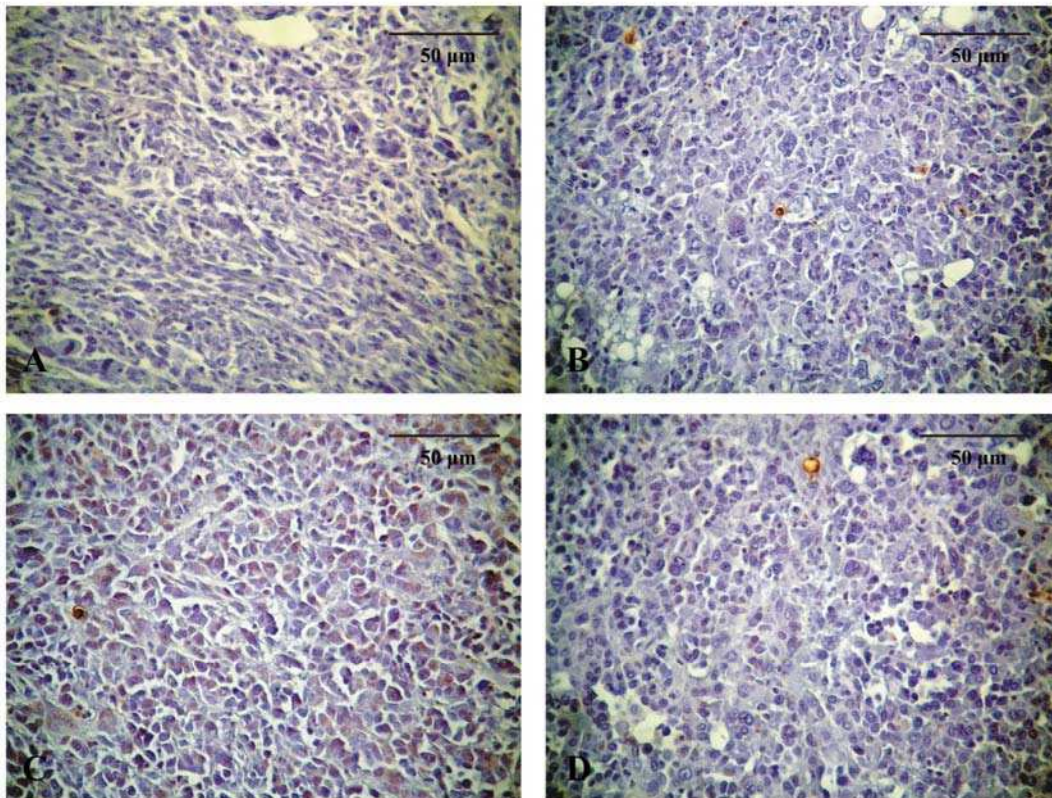


Figura 2.8. Ensayo de inmunohistoquímica para la marcación *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*) en cortes provenientes del tumor IBH-6 luego del tratamiento con compuestos β -adrenérgicos. Panel A: Control; Panel B: Salbutamol; Panel C: Propranolol; Panel D: Salb + Prop. Aumento 40x.

En el tumor IBH-4, luego del tratamiento con los compuestos β -adrenérgicos, se observó que tanto el salbutamol como el propranolol provocaron una disminución significativa del índice apoptótico (Salbutamol $0,53 \pm 0,12\%$ vs Control $1,02 \pm 0,12\%$, $p < 0,05$; Propranolol $0,55 \pm 0,12\%$ vs Control, $p < 0,05$). Por el contrario, en los tumores tratados con Salb + Prop el propranolol revirtió el efecto del salbutamol, resultando igual que en el control (Salb + Prop: $0,66 \pm 0,08\%$).

En el caso del tratamiento conjunto en el tumor IBH-4 con compuestos α_2 y β adrenérgicos, todos provocaron una disminución significativa del índice apoptótico comparados con el control (Figura 2.9).

En el caso del tumor IBH-6, el tratamiento con el agonista β -adrenérgico salbutamol provocó un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas (Salbutamol $1,35 \pm 0,14\%$ vs Control $0,65 \pm 0,1\%$, $p < 0,001$, Figuras 2.8 y 2.11). Este resultado concuerda con lo observado en las curvas de crecimiento tumoral, en donde el agonista salbutamol provoca una disminución significativa del crecimiento tumoral. Los tratamientos con propanolol y Salb + Prop no generaron cambios en el porcentaje de apoptosis con respecto al control.

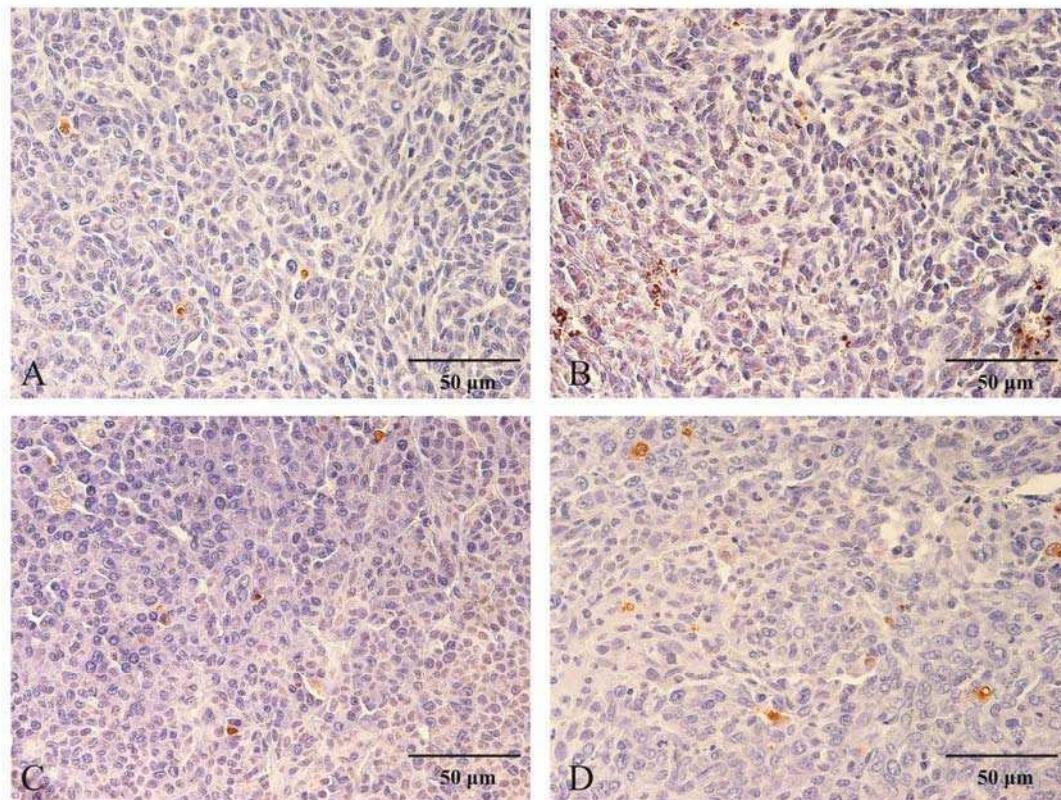


Figura 2.9. Ensayo de inmunohistoquímica para la marcación *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) en cortes provenientes del tumor IBH-4 luego del tratamiento con compuestos α_2 y β -adrenérgicos. Panel A: Control; Panel B: Salbutamol; Panel C: Rauwolscina; Panel D: Salb + Rau. Aumento 40x.

En los cortes provenientes del tratamiento conjunto (α_2 y β -adrenérgico) del tumor IBH-6, tanto la rauwolscina, el salbutamol como ambos compuestos administrados en simultáneo provocaron un aumento significativo del porcentaje de apoptosis (Figuras 2.10 y 2.11).

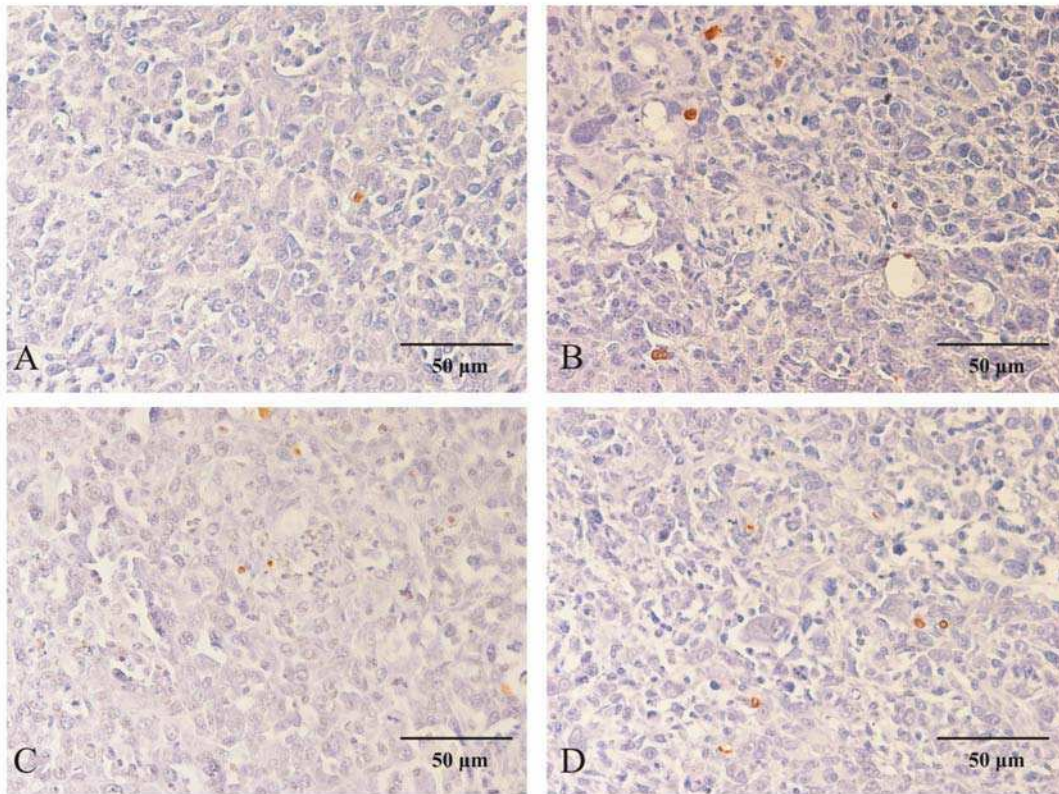


Figura 2.10. Ensayo de inmunohistoquímica para la marcación *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (TdT- mediated dUTP nick end labelling) en cortes provenientes del tumor IBH-6 luego del tratamiento con compuestos α_2 y β -adrenérgicos. Panel A: Control; Panel B: Salbutamol; Panel C: Rauwolscina; Panel D: Salb + Rau. Aumento 40x.

De todas formas, el porcentaje de apoptosis en ambos tumores (IBH-4 e IBH-6) resultó bajo en comparación con los resultados previamente obtenidos en el tumor mamario murino CC4-3-HI en donde los valores de apoptosis en los tumores provenientes de animales control eran de aproximadamente el $8 \pm 1\%$ (Bruzzone y *col.*, 2008).

Particularmente en los tumores IBH-4, el porcentaje de apoptosis resultó ser muy bajo en los controles y más aun en los tratados. Considerando que los tumores presentan un crecimiento que se ajusta a una curva exponencial es probable que el principal mecanismo de muerte celular sea diferente de la apoptosis, como por ejemplo necrosis. Una posible opción alternativa sería la evaluación de las áreas necróticas en los cortes histológicos luego de los tratamientos o una estimación del porcentaje de apoptosis luego de 15 días de tratamiento y no en el momento de la finalización de los experimentos *in vivo*.

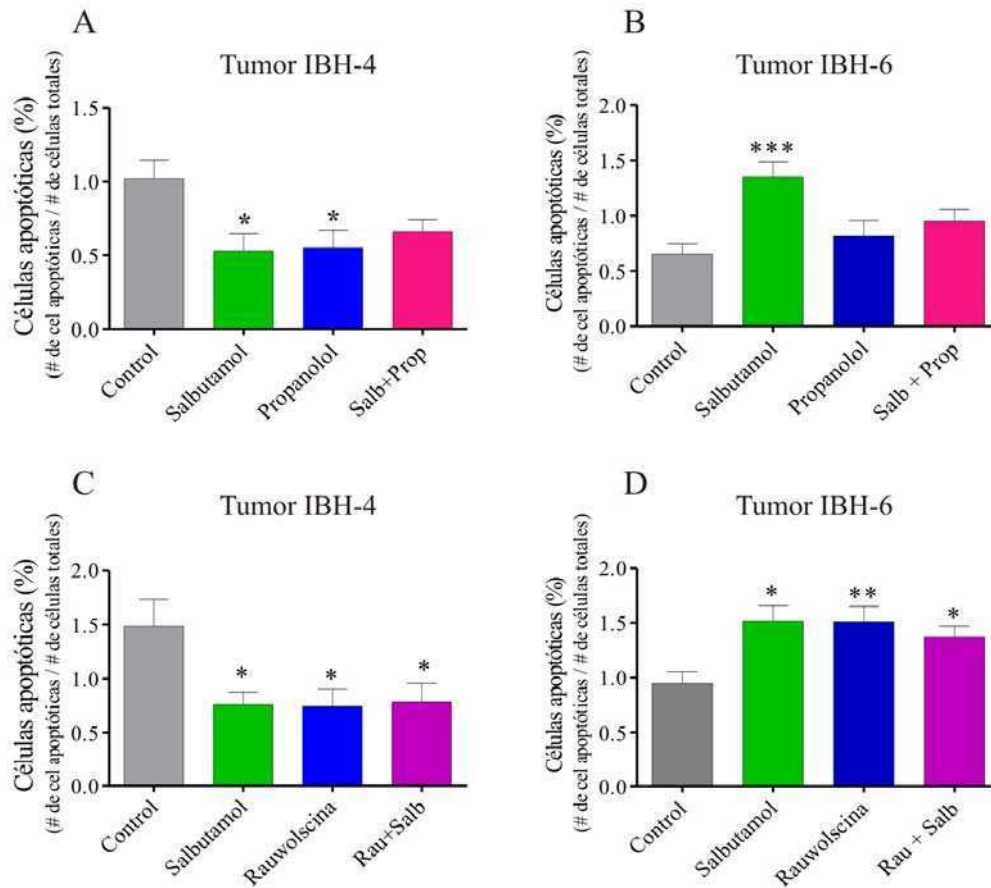


Figura 2.11. Índice apoptótico en los tumores IBH-4 e IBH-6 luego del tratamiento con los compuestos β -adrenérgicos (Panel A y B) y del tratamiento conjunto con compuestos α_2 y β -adrenérgicos (Panel C y D). Los datos se expresan como porcentaje de células apoptóticas con respecto al total de células \pm SEM. Análisis estadístico: ANOVA seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Además, en ambos tumores el resultado luego del tratamiento con los agonistas β -adrenérgicos y el antagonista α_2 rauwolscina fue una disminución del volumen tumoral. Este hecho podría deberse a que el índice mitótico sea mayor en los tumores controles con respecto a los tratados, particularmente en el tumor IBH-4, en el cual el porcentaje de apoptosis en los tumores tratados es menor que en el control.

Mecanismos de señalización en los tumores mamarios humanos

Las proteínas G están involucradas en la regulación de diferentes vías de señalización mediadas por proteínas activadas por mitógenos (MAPK). A su vez, los receptores adrenérgicos están acoplados a proteínas G. Las clases predominantes de proteínas G (Gs, Gi, Gq y G12) regulan las vías de Erk1/2, Jnk, p38 MAPK, Erk5 y Erk6 por diferentes mecanismos (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).

Entonces, se nos planteó el interrogante sobre cuál vía de señalización estaría involucrada en el efecto generado por los compuestos adrenérgicos sobre el crecimiento tumoral. Se comenzó estudiando la vía de las quinasas reguladas por señales extracelulares (Erk1/2). Se sabe por datos bibliográficos que esta vía juega un rol central en el control de la proliferación celular (Meloche y Pouyssegur, 2007, Mebratu y Tesfaigzi, 2009).

Por otro lado, la señalización asociada a los RA- β_2 es muy compleja. Recientemente se ha descrito en un modelo tumoral de mama humana (la línea tumoral MDA-MB-231 creciendo en ratones desnudos) que el tratamiento con un agonista β_2 -adrenérgico (Pirbuterol) provoca una inhibición de la vía de Raf/Mek/Erk1/2 (Carie y Sebti, 2007).

En nuestro laboratorio se habían realizado ensayos *in vitro* con compuestos adrenérgicos utilizando líneas tumorales y no tumorales de mama humana (Bruzzone, 2008), pero siempre utilizando tiempos cortos de estimulación y compuestos α_2 -adrenérgicos. El estudio de las vías de señalización luego de la incubación con compuestos β -adrenérgicos no había sido estudiado en las células tumorales mamarias humanas desarrolladas en el laboratorio hasta el momento del presente trabajo de tesis, mostrándose los resultados obtenidos en el capítulo anterior (experimentos *in vitro*). Tampoco se habían realizado este tipo de estudios a partir de muestras de tumores.

En un principio, se realizaron ensayos de *Western Blot* a partir de extractos tumorales para determinar la fosforilación de las proteínas Erk1/2. En la figura 2.12 se muestran los resultados correspondientes. Como puede observarse, el agonista β_2 salbutamol provocó una inhibición de la fosforilación de Erk al ser comparado con el control. Este resultado correlaciona con los obtenidos en las curvas de crecimiento tumoral, en donde el salbutamol provocó una inhibición del crecimiento tumoral.

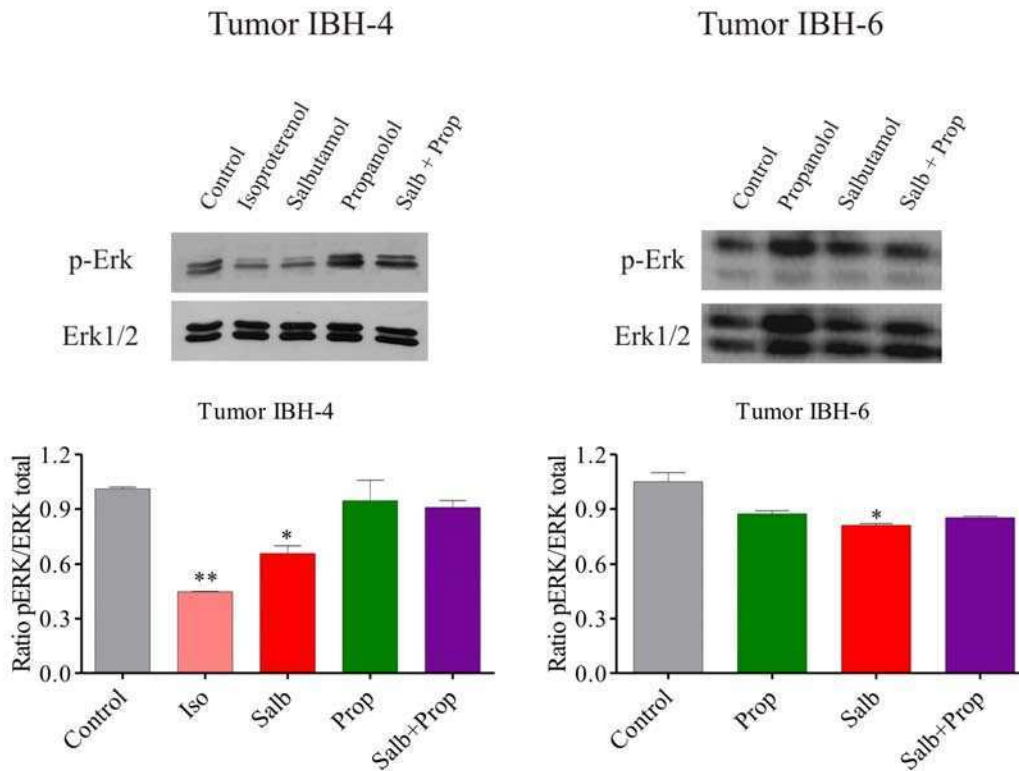


Figura 2.12. Efecto de compuestos β -adrenérgicos sobre la activación de Erk1/2 en extractos proteicos de los tumores IBH-4 e IBH-6 luego de finalizar el experimento *in vivo*. Se realizaron extractos de proteínas totales utilizando el *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Se sembraron 50-100 μ g de proteínas para cada ensayo de WB, en geles de 10% acrilamida. Se reveló con los anticuerpos específicos para pErk y Erk total y se analizaron los resultados con el programa ImageJ. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Se realizaron los ensayos de *Western blot* para estudiar la razón pErk/Erk total utilizando extractos tumorales correspondientes a los experimentos *in vivo* donde se utilizó el agonista β_2 (salbutamol) y/o el antagonista α_2 (rauwolscina) (Figura 2.13). En este caso se confirmó que el salbutamol provoca una disminución de la fosforilación de Erk con respecto al control. Lo mismo ocurrió para los tumores tratados con rauwolscina y salbutamol + rauwolscina. Todos los resultados concuerdan con lo observado en las curvas de crecimiento tumoral, ya que todos estos tratamientos provocaron una disminución de dicho crecimiento en comparación con los animales control. Cabe destacar que estos ensayos se realizaron al finalizar los experimentos, cuando el tiempo de duplicación de estos tumores ya era similar en los diferentes tratamientos. Por lo tanto la fosforilación de Erk continúa disminuida aun cuando el crecimiento se está igualando.

Entonces se puede decir que la vía de Erk estaría involucrada en la regulación del tamaño tumoral en los modelos estudiados, siendo la misma importante para la proliferación celular.

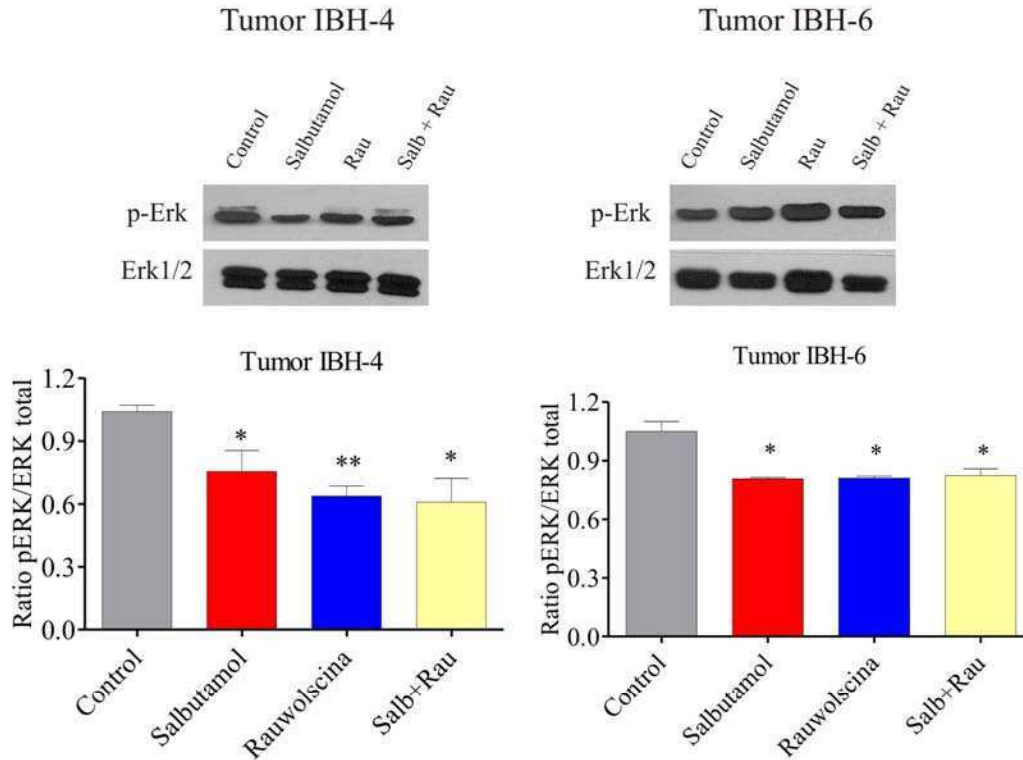


Figura 2.13. Efecto de compuestos α_2 y β -adrenérgicos sobre la activación de Erk1/2 en extractos proteicos de los tumores IBH-4 e IBH-6 luego de finalizar el experimento *in vivo*. Se realizaron extractos de proteínas totales utilizando el *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Se sembraron 50-100 μ g de proteínas para cada ensayo de WB, en geles de 10% acrilamida. Se reveló con los anticuerpos específicos para pErk y Erk total y se analizaron los resultados con el programa ImageJ. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Luego, se realizaron ensayos *in vitro* utilizando las células IBH-4 de forma tal de verificar si la acción de los agonistas β -adrenérgicos y del antagonista α_2 sobre la fosforilación de Erk era directa. En la figura 2.14 se muestran los resultados correspondientes.

Como se mostró previamente en el capítulo I, ambos agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y salbutamol) provocan una disminución significativa de la fosforilación de Erk1/2 luego de 15 minutos de incubación. Este efecto fue revertido por la presencia del antagonista propanolol y el antagonista β no causó un efecto *per se* sobre la razón pErk/Erk. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos *in vivo* a partir de extractos proteicos provenientes de los tumores tratados (figura 2.11 y 2.13).

Por el contrario, el antagonista α_2 rauwoscina no ejerció un efecto inhibitorio en la fosforilación de Erk luego de los 15 minutos de incubación. Entonces, el efecto inhibitorio detectado *in vivo* no ocurre por acción directa del antagonista. Una posible explicación es que en el modelo *in vivo*, la rauwoscina esté actuando como antagonista de la epinefrina y norepinefrina, los cuales son los agonistas endógenos de los RA- α_2 . En los ensayos *in vitro*, los agonistas endógenos no están presentes y podría ser que por este motivo el antagonista α_2 no se comporte como un agonista inverso.

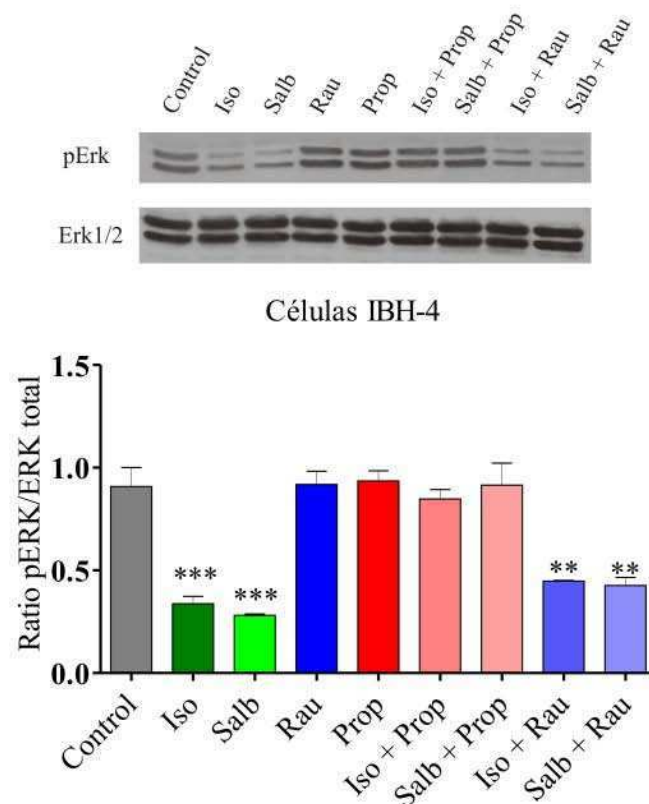


Figura 2.14. Efecto de los agonistas β -adrenérgicos, los antagonistas α_2 y β -adrenérgicos (Rauwoscina y Propranolol) y la combinación de agonistas y antagonistas sobre la activación de Erk1/2 en extractos proteicos de las células IBH-4. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y una vez adheridas se arrestaron con medio sin suero. Posteriormente fueron incubadas con los agonistas β -adrenérgicos isoproterenol (Iso, 1 μ M) y salbutamol (Salb, 1 μ M); el antagonista α_2 rauwoscina (Raw, 1 μ M) en presencia y ausencia de los agonistas isoproterenol (Iso + Raw, 1 μ M) y salbutamol (Salb + Raw, 1 μ M); el antagonista β propranolol (Prop, 1 μ M) en presencia y ausencia de los agonistas isoproterenol (Iso 10 nM + Prop 1 μ M) y salbutamol (Salb 10 nM + Prop 1 μ M); medio sin suero (Control) durante 15 minutos.

Se realizaron extractos de proteínas totales utilizando el *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Se sembraron entre 50-100 μ g de proteínas para cada ensayo de WB, en geles de 10% acrilamida. Se reveló con los anticuerpos detallados en la figura y se analizaron los resultados con el programa ImageJ. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En la figura 2.15 se muestran los resultados del Western Blot para pAkt, Akt y su posterior análisis. Se observó que tanto con salbutamol, rauwolscina como con ambos compuestos (Salb + Rau) la fosforilación de Akt disminuyó en comparación con el control. Con respecto al tratamiento con propanolol, se explicó anteriormente que este compuesto podría actuar como agonista parcial cuando se lo administra solo y por este

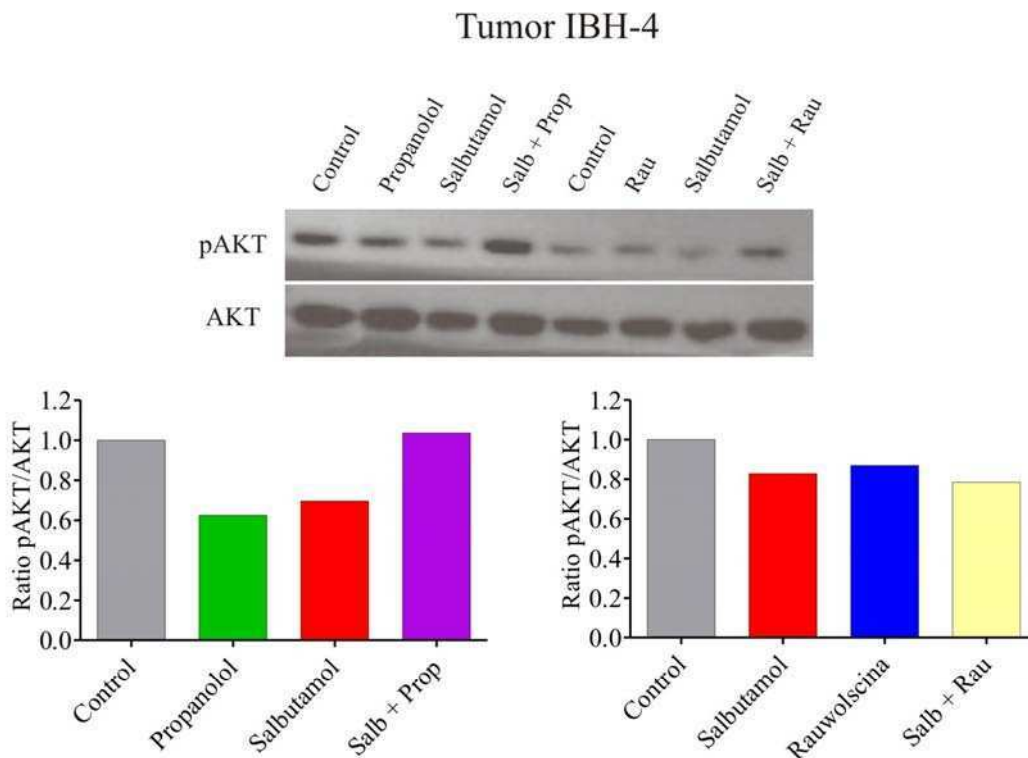


Figura 2.15. Efecto de compuestos α_2 y β -adrenérgicos sobre la activación de Akt en extractos proteicos de los tumores IBH-4 luego de finalizar los experimentos *in vivo*. Se realizaron extractos de proteínas totales utilizando el *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Se sembraron 50-100 μ g de proteínas para cada ensayo de WB, en geles de 10% acrilamida. Se reveló con los anticuerpos específicos para pAkt y Akt total y se analizaron los resultados con el programa ImageJ. Este resultado no posee análisis estadístico ya que es preliminar.

motivo podría observarse una menor relación pAkt/Akt total comparado con el control. Este efecto no se detectó en las muestras provenientes de animales tratados con salbutamol + propanolol, en donde el propanolol fue capaz de revertir el efecto del agonista β . De todas formas, hay que aclarar que este es un resultado preliminar único, por ese motivo no se realizó la estadística correspondiente.

CAPITULO III

Rol de compuestos adrenérgicos en la migración de células tumorales mamarias humanas

La migración celular y la invasión son parámetros críticos para la diseminación metastásica, siendo las metástasis la mayor causa de muerte en los pacientes con cáncer (Yilmaz y Christofori, 2010). Las células tumorales poseen un amplio espectro de mecanismos de migración e invasión (colectivos e individuales) (Friedl y Wolf, 2003). La migración es una habilidad indispensable de las células tumorales para formar metástasis (Entschladen y *col.*, 2004). La matriz extracelular provee el marco estructural y molecular para el cuerpo celular en movimiento y, en consecuencia, afecta el modo y la eficiencia de la migración (Friedl y Wolf, 2010). Cuando las células se mueven a través de tejido intersticial en tres dimensiones, el cual consiste en una red de fibras de colágeno que generan limitaciones espaciales en la célula, la morfología celular atraviesa cambios característicos (forma ahusada, pseudopodios, remodelación de la matriz extracelular por proteólisis pericelular) (Friedl y Wolf, 2010).

El siguiente paso fue evaluar el efecto de los compuestos adrenérgicos en la migración de las células tumorales mamarias humanas MDA-MB-231 e IBH-6. Se realizó la técnica de video-microscopía en tres dimensiones (3D) utilizando como soporte geles de colágeno (Entschladen y *col.*, 2005b). Los experimentos mostrados en este capítulo se realizaron en el laboratorio a cargo del Prof. Dr. Frank Entschladen (situado en el Instituto de Inmunología de la Universidad Witten/Herdecke, Alemania), el cual se especializa en migración celular y transducción de señales en modelos tumorales *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente, se estudió el efecto de las hormonas endógenas epinefrina y norepinefrina en la migración celular (Figura 3.1). También se estudiaron los demás compuestos adrenérgicos utilizados en el laboratorio (Propranolol, Clonidina, Rauwolscina y Salbutamol).

La epinefrina provocó un aumento significativo de la migración celular en la línea IBH-6 (Figura 3.1, Panel A), siendo el porcentaje de células en movimiento del $72,65 \pm 0,82\%$ en comparación con el control (Control: $68,42 \pm 1,16\%$, $p < 0,01$). Esto no ocurrió cuando el ensayo se realizó en presencia de norepinefrina, aunque se observó un porcentaje de migración ligeramente mayor que en el control, pero esta diferencia no fue significativa. Por último, el propranolol provocó una disminución de la migración

con respecto al control (Propanolol: $63,13 \pm 1,2\%$, $p < 0,01$). Este efecto fue observado previamente en líneas tumorales de ovario humanas (Bastian y col., 2009).

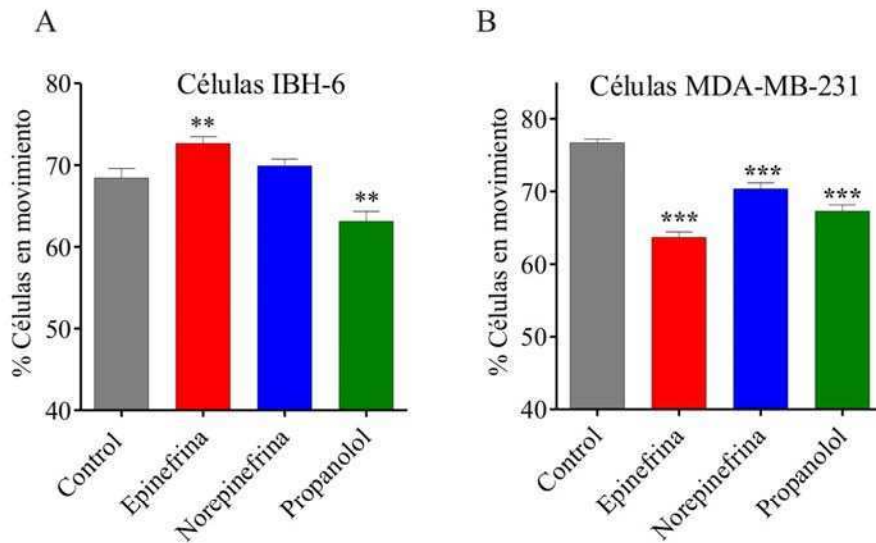


Figura 3.1. Efecto de compuestos adrenérgicos en la migración de las células IBH-6 (Panel A) y MDA-MB-231 (Panel B). Epinefrina 10 μ M, Norepinefrina 10 μ M, Propanolol 10 μ M. Los resultados fueron expresados como el promedio de células en movimiento (%) luego de 15hs de filmación. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Por el contrario, en la línea celular MDA-MB-231, la epinefrina, la norepinefrina y el propanolol provocaron una disminución significativa de la tasa migratoria (Control: $76,71 \pm 0,49\%$; Epinefrina: $63,67 \pm 0,76\%$ vs Control, $p < 0,001$; Norepinefrina: $70,63 \pm 0,82\%$ vs Control, $p < 0,001$; Propanolol: $67 \pm 0,86\%$ vs Control, $p < 0,001$).

En el siguiente experimento se estudió el efecto del salbutamol, la clonidina y la rauwolscina en la línea IBH-6. Se observó en todos los casos una disminución significativa de la migración celular en comparación con las células control (Figura 3.2, Panel A, Control: $74,26 \pm 0,87\%$; Salbutamol: $68,86 \pm 1,03\%$, $p < 0,001$; Clonidina: $62,85 \pm 0,96\%$, $p < 0,001$; Rauwolscina: $71,04 \pm 0,96\%$, $p < 0,05$). Estos compuestos provocaron el mismo efecto en la línea MDA-MB-231 (Figura 3.2, Panel B, Control: $81,56 \pm 0,73\%$; Salbutamol: $76,76 \pm 0,55\%$, $p < 0,001$; Clonidina: $73,31 \pm 0,79\%$, $p < 0,001$; Rauwolscina: $76,08 \pm 1,03\%$, $p < 0,001$).

Sabiendo que la vía de señalización de los receptores adrenérgicos involucra al AMPc, ya que los niveles de este segundo mensajero aumentan y/o disminuyen según la proteína G a la cual esté acoplado el receptor (Gs, Gi), se estudió el efecto de los análogos sintéticos de AMPc en la migración de las células IBH-6 y MDA-MB-231. Se

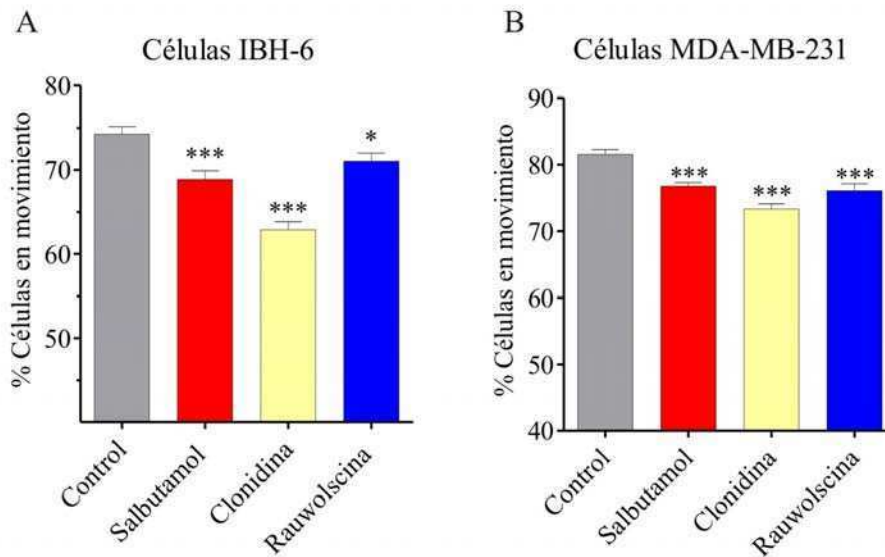


Figura 3.2. Efecto de compuestos adrenérgicos en la migración de las células IBH-6 (Panel A) y MDA-MB-231 (Panel B). Salbutamol 1 μ M, Clonidina 1 μ M, Rauwolscina 1 μ M. Los resultados fueron expresados como el promedio de células en movimiento (%) luego de 15 hs de filmación. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

utilizó el análogo del AMPc (8-Br-AMPc, 100 μ M), un análogo activador específico de la proteína intercambiadora activada directamente por AMPc, más conocida como EPAC (8-CPT-2'-O-Me-AMPc, 100 μ M) y por último, un análogo activador de la proteína quinasa A (activador selectivo de PKA) (6-Bnz-AMPc, 100 μ M).

En la figura 3.3 se muestran los resultados correspondientes a los ensayos de migración utilizando los análogos de AMPc.

Las células IBH-6 (Figura 3.3, Panel A) luego del tratamiento con el análogo 8-Br-AMPc presentaron una menor tasa migratoria en comparación con el control ($58,06 \pm 1,12\%$ vs $63,06 \pm 1,07\%$, $p < 0,01$), mientras que con el análogo activador específico de EPAC (8-CPT-AMPc) la migración fue significativamente mayor ($70,89 \pm 1,07\%$, $p < 0,001$). El análogo activador de PKA (6-Bnz-AMPc) también provocó una disminución en la migración con respecto al control ($60,33 \pm 0,82\%$, $p < 0,05$).

Por otro lado, las células MDA-MB-231 (Figura 3.3, Panel B) presentaron diferencias significativas con respecto al control en los tres tratamientos. El análogo activador de EPAC (8-CPT-AMPc) provocó la menor tasa migratoria ($63,57 \pm 0,68\%$ vs Control $81,31 \pm 0,61\%$, $p < 0,001$), el análogo del AMPc (8-Br-AMPc) disminuyó la migración en un 8% ($74,06 \pm 0,65\%$ vs Control, $p < 0,001$) y el análogo activador específico de

PKA provocó una discreta disminución de la migración celular ($77,46 \pm 0,51\%$ vs Control, $p < 0,001$).

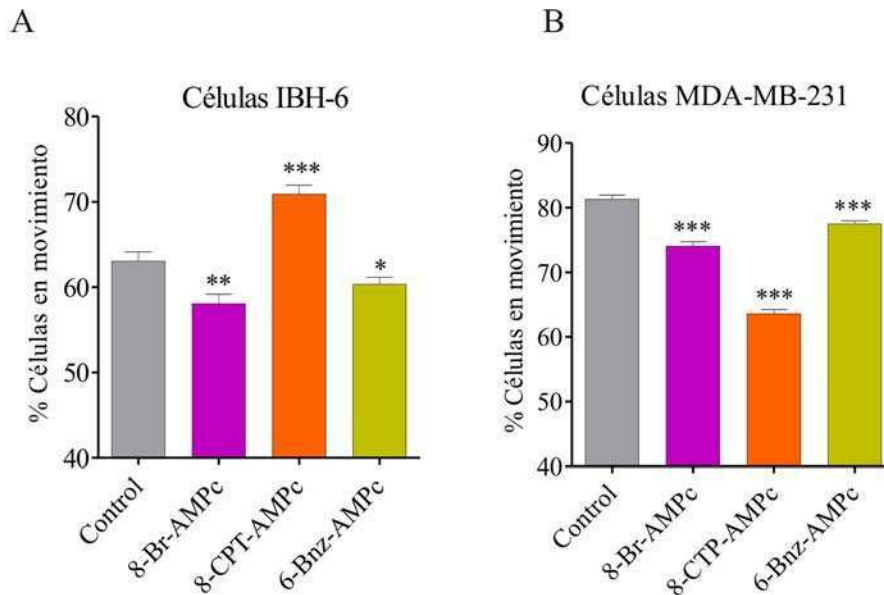


Figura 3.3. Efecto de los análogos de AMP cíclico en la migración de las células IBH-6 (Panel A) y MDA-MB-231 (Panel B). 8-Br-AMPC (100 μ M): Activador de la proteína quinasa A y proteína EPAC; 8-CPT-2'-O-Me-AMPC (100 μ M): Activador específico de la proteína EPAC dependiente de AMPc; 6-Bnz-AMPC (100 μ M): Activador selectivo de PKA. Los resultados fueron expresados como el promedio de células en movimiento (%) luego de 15hs de filmación. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En las células MDA-MB-231, todos los análogos de AMPc provocaron una disminución de la migración celular, pero el mayor efecto fue observado con el análogo activador de EPAC. El mismo efecto se observó cuando las células fueron incubadas en presencia de epinefrina (la disminución de la tasa migratoria fue de más del 10%). Por el contrario, en las células IBH-6 la epinefrina incrementó la migración celular en un 5% aproximadamente, este mismo valor fue observado cuando se realizó el ensayo con el análogo activador de EPAC. En la línea IBH-6, el análogo activador específico de PKA provocó una disminución en la tasa migratoria, efecto similar al observado con el agonista β salbutamol.

En todos los experimentos de migración realizados hasta el momento, se observó una altísima tasa de migración espontánea. El porcentaje de células en movimiento espontáneo para la línea IBH-6 fue de entre el 65 y 80%, mientras que en la línea MDA-MB-231 este valor fue de entre el 70 y 85%. Al ver estos valores, se quiso estudiar

cuales vías de señalización estarían activas constitutivamente de manera tal de generar una migración espontánea tan elevada.

Con este nuevo objetivo planteado, se comenzó por estudiar si las células tumorales estaban secretando IL-8 y si esta citoquina estaba actuando de manera autocrina-parácrina, estimulando la migración celular (Lang y *col.*, 2002).

La IL-8 fue descrita originalmente como un factor quimioattractante de leucocitos, luego se descubrió que posee propiedades mitogénicas y angiogénicas (Snoussi y *col.*, 2010). Altos niveles de IL-8 están asociados con la progresión y recurrencia de varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama (Ginestier y *col.*, 2010, Snoussi y *col.*, 2010, Snoussi y *col.*, 2006). Entonces, el objetivo fue bloquear al receptor de esta proteína (CXCR1), utilizando un anticuerpo específico incluido en los geles de colágeno.

En la figura 3.4 se muestran los resultados correspondientes. En las células IBH-6 (Panel A) el bloqueo del receptor CXCR1 provocó una disminución significativa de la tasa migratoria (Bloqueo CXCR1 $63,36 \pm 1,11\%$ vs Control $76,33 \pm 0,79\%$, $p < 0,001$). Este efecto no se observó en la línea MDA-MB-231 (Panel B), en donde la migración permaneció igual que en las células control.

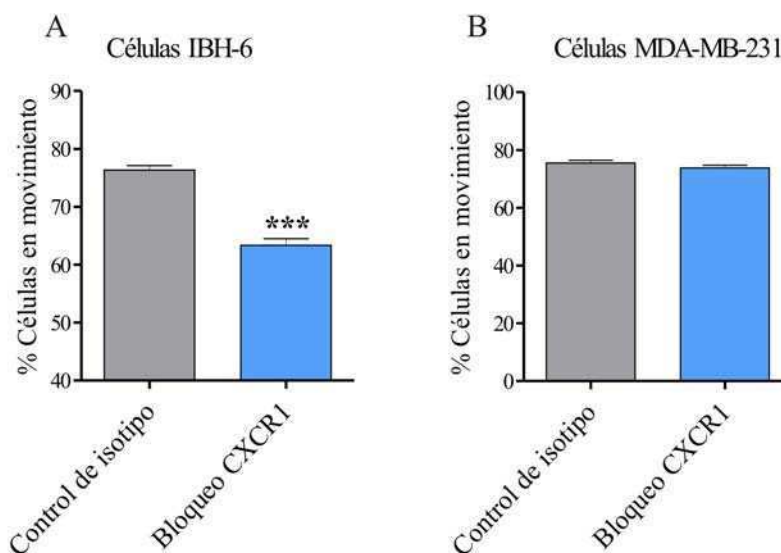


Figura 3.4. Efecto del anticuerpo bloqueante del receptor CXCR1 en la migración de las células IBH-6 (Panel A) y MDA-MB-231 (Panel B). El anticuerpo específico para CXCR1 fue utilizado en una concentración $50\mu\text{g/ml}$ en el gel de colágeno. Las células control se incubaron con el correspondiente control de isotipo. Los resultados fueron expresados como el promedio de células en movimiento (%) luego de 15hs de filmación. Análisis estadístico: Test de Student *** $p < 0,001$.

Entonces, se puede decir que parte de la migración espontánea observada en las células IBH-6 podría deberse a la acción autocrina / paracrina mediada por IL-8.

A continuación, se prosiguió con la búsqueda de las vías de transducción de señales involucradas en la migración espontánea de ambas líneas celulares. Con esta finalidad, se inhibieron moléculas reguladoras claves utilizando compuestos específicos (Masur y *col.*, 2001). La actividad de las tirosinas quinasas de la familia de Src fue inhibida utilizando un inhibidor específico (PP2), mientras que para inhibir a la tirosina quinasa del receptor de EGF se utilizó el inhibidor AG18. PP3 se utilizó debido a que es un control negativo del inhibidor PP2.

En la figura 3.5 se muestran los resultados correspondientes a los ensayos de migración utilizando inhibidores de las tirosinas quinasas. Los inhibidores utilizados son: AG18, inhibidor de tirosinas quinasas del receptor de EGF; PP2, inhibidor de tirosinas quinasas de la familia de Src. El panel A corresponde a las células IBH-6, en las cuales PP2 logró disminuir significativamente la tasa migratoria (aproximadamente un 6% con respecto al control, $p < 0,001$).

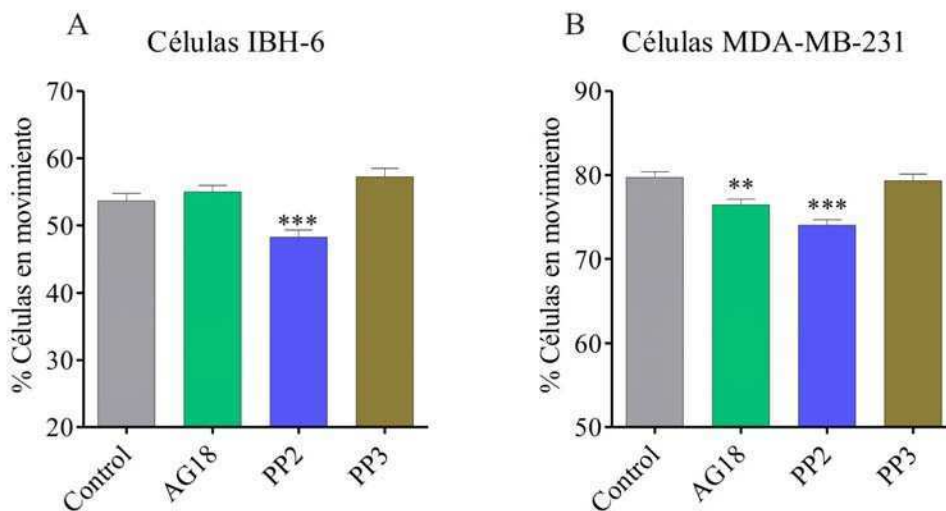


Figura 3.5. Efecto de los inhibidores de tirosinas quinasas en la migración de las células IBH-6 (Panel A) y MDA-MB-231 (Panel B). AG18 (500 nM): Inhibidor de la tirosina quinasa del receptor de EGF; PP2 (50 nM): Inhibidor de tirosinas quinasas de la familia Src; PP3 (50 nM): Control negativo de PP2. Los resultados fueron expresados como el promedio de células en movimiento (%) luego de 15hs de filmación. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En el panel B se puede observar que tanto el inhibidor AG18 como el inhibidor PP2 provocaron una disminución significativa de la tasa migratoria en las células MDA-MB-

231, pero las diferencias observadas no fueron muy grandes (del orden del 5% con respecto al control).

Por último, se estudió la vía de la fosfolipasa C (PLC) y su relación con la migración de las células utilizadas en el presente trabajo. Se sabe que la PLC es blanco de las tirosinas quinasas. Una vez activa, la PLC cataliza la ruptura del fosfatidil inositol bifosfato en los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El DAG es un activador de la proteína quinasa C (PKC) y el IP3 es un regulador de la apertura de depósitos de calcio intracelulares. Estos dos procesos son muy importantes en la migración de células tumorales (Entschladen y *col.*, 2005a).

Entonces, se utilizó un compuesto activador de la PLC (3m3FBS, 50 μ M) y un inhibidor específico de esta proteína (U73122, 500 ng/ml) en los geles de colágeno donde se realizaron los ensayos de migración. El U73342 (500ng/ml) fue utilizado como control negativo del inhibidor de la PLC.

En la figura 3.6 se muestran los resultados obtenidos. Ninguna de las líneas celulares aumentó la tasa migratoria luego de la incubación con el activador de la PLC 3m3FBS. Por el contrario, cuando el ensayo de migración se realizó en presencia del inhibidor de la PLC (U73122), ambas líneas celulares disminuyeron la tasa migratoria significativamente. Células IBH-6 (Panel A): U73122 $48,67 \pm 0,87$ % vs Control $61,46 \pm 0,84$ %, $p < 0,001$; Células MDA-MB-231 (Panel B): U73122 $63,65 \pm 0,69$ % vs Control $76,67 \pm 0,72$ %, $p < 0,001$.

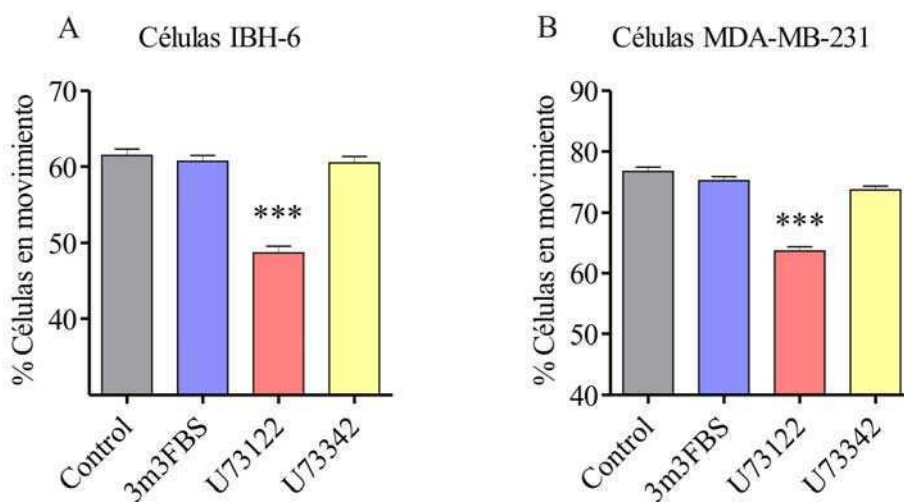


Figura 3.6. Regulación de la migración de las células IBH-6 (Panel A) y MDA-MB-231 (Panel B) por la fosfolipasa C (PLC). 3m3FBS (50 μ M): Activador de la PLC; U73122 (500 ng/ml): Inhibidor de la PLC; U73342 (500 ng/ml): Control negativo de U73122. Los resultados fueron expresados como el promedio de células en movimiento (%) luego de 15hs de filmación. Análisis estadístico: Anova seguido de test de Dunnett *** $p < 0,001$.

Cuando se realizaron los ensayos de migración para analizar la influencia de la PLC, el cambio observado en la morfología celular fue muy marcado luego del tratamiento con el inhibidor U73122. Las células se redondearon, no mostraban las prolongaciones observadas típicamente en los demás ensayos (independientemente del tratamiento realizado).

A partir de estos resultados, se puede concluir que en las células estudiadas, la vía de transducción de señales de la PLC se encuentra activada constitutivamente ya que no se observó un aumento de la migración celular cuando se las incubó con el activador específico 3m3FBS. Por el contrario, al tratar a ambas líneas celulares con el inhibidor U73122, se observó una caída de la tasa migratoria de entre el 10-15%.

Este hecho podría explicar en parte la alta tasa migratoria observada en ambas líneas celulares. En la figura 3.7 se muestran los cambios morfológicos en las células luego de la incubación con el inhibidor de PLC (U73122). Las células pasaron de poseer su típica morfología ahusada a no tener prolongaciones. Estas fotografías fueron tomadas luego de 8 hs. de incubación con el inhibidor de PLC. Hacia el final del experimento, fueron recuperando su morfología típica y comenzaron a moverse lentamente, hecho que permitió descartar que el compuesto U73122 estuviera provocando la muerte celular.

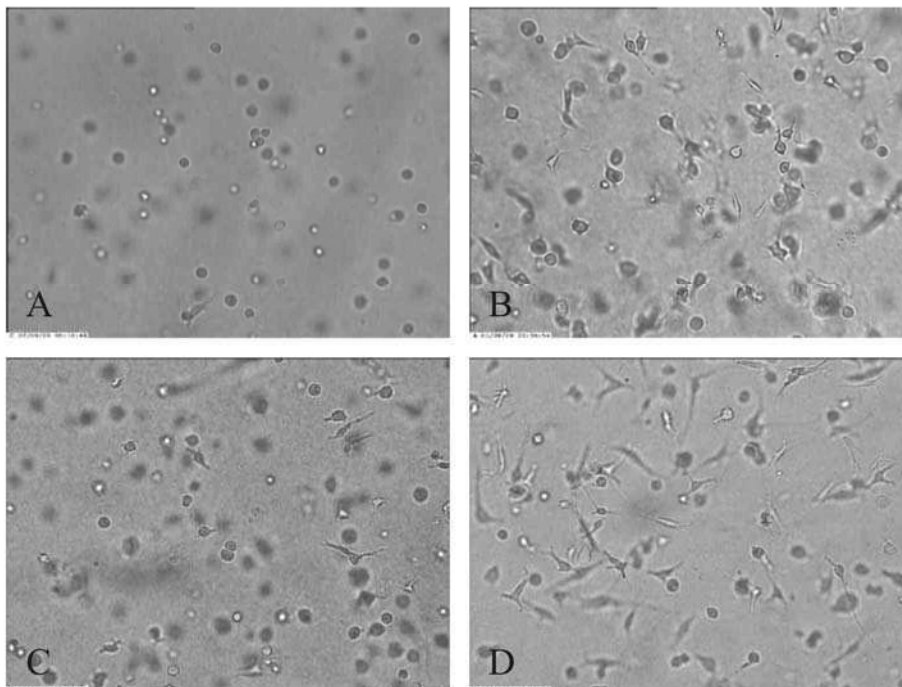


Figura 3.7. Regulación de la migración de las células IBH-6 (Panel A y B) y MDA-MB-231 (Panel C y D) por la fosfolipasa C (PLC). Paneles A y C: Inhibidor de la PLC (U73122, 500 ng/ml). Paneles B y D: Control. Fotografías tomadas a partir de los videos de migración con el programa *QuickTime Player* versión 7.6.6.

Una vez obtenido el resultado mostrado anteriormente se quiso estudiar la presencia de la proteína quinasa C (PKC), la cual es típicamente activada por la PLC. Se sabe que la PKC está muy relacionada con la migración celular y el establecimiento de metástasis. Para llevar a cabo este nuevo objetivo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para detectar varios subtipos de PKC (α , β , γ , y δ). En la figura 3.8 se muestran los resultados para ambas líneas celulares.

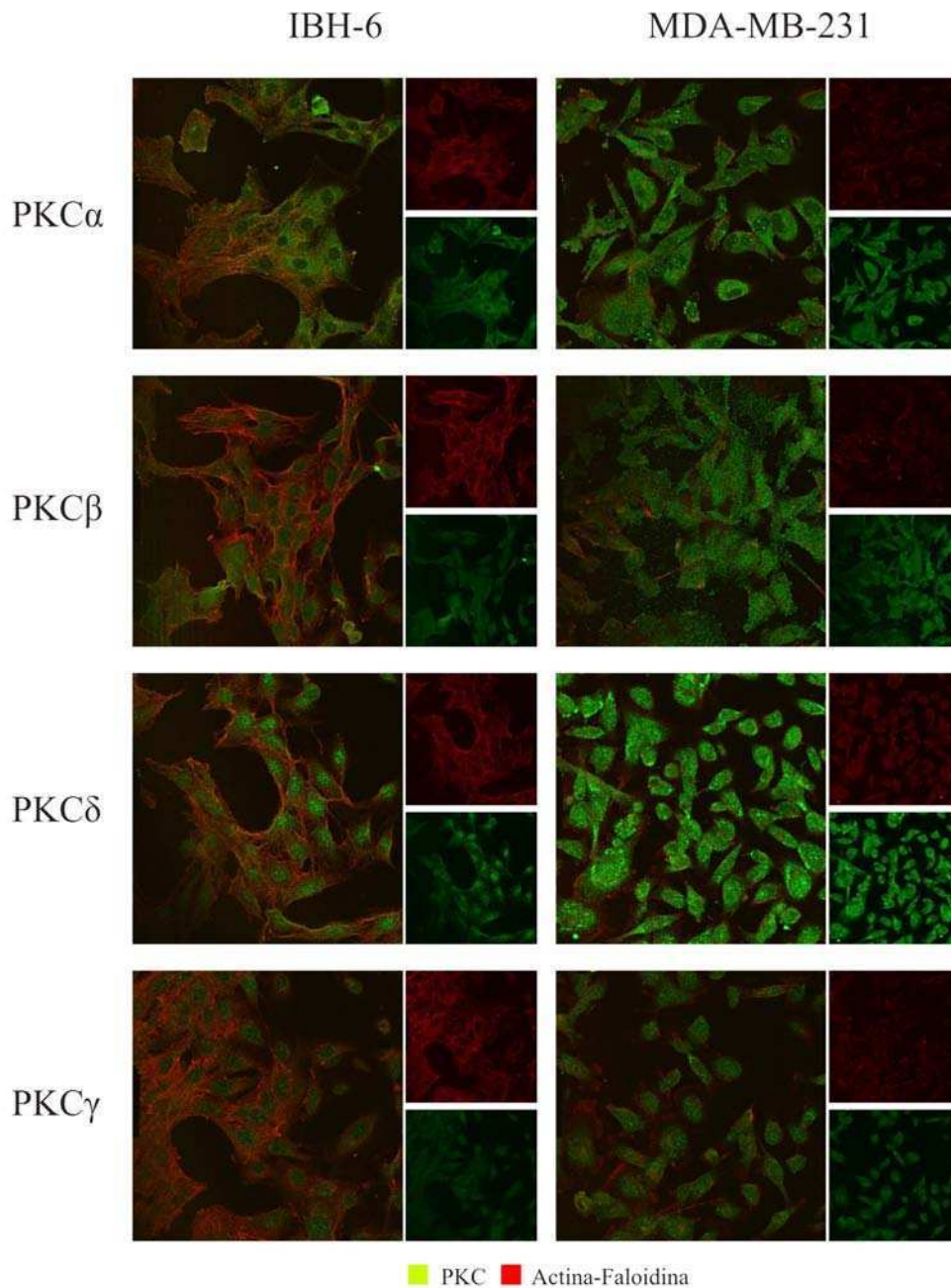


Figura 3.8. Detección de PKC mediante ensayos de inmunofluorescencia en las células IBH-6 y MDA-MB-231. Se hicieron crecer las células en *labtek chamber slides* y se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos para ensayos de inmunofluorescencia. Se utilizaron anticuerpos específicos para varios subtipos de PKC (α , β , δ y γ) y se realizó una contratinción con faloidina (actina-faloidina).

Las isoformas de PKC se dividen en tres subgrupos, dependiendo en la estructura del dominio regulatorio: PKC clásicas (α , β y γ), PKC nóveles (δ , ϵ y θ) y PKC atípicas (ζ , ι y λ) (Lonne y *col.*, 2010).

Como puede observarse en la figura 3.8, las células presentaron marcación positiva para los subtipos de PKC estudiadas. La línea IBH-6 mostró una marcación más tenue en comparación a las células MDA-MB-231. Esta última presentó marcación más intensa, sobre todo para los subtipos α y δ .

A modo de síntesis del capítulo, en la Tabla 3.1 se muestra un resumen de los resultados correspondientes a todos los ensayos de migración, ordenados por tipo de compuesto y presentando los porcentajes de células migrando para la línea IBH-6 y MDA-MB-231. A partir de todos estos datos se puede concluir que si bien los compuestos adrenérgicos poseen la capacidad de modular la migración celular, las líneas celulares utilizadas poseen un grado de malignidad elevado y al parecer poseen vías de señalización activas constitutivamente, las cuales les otorgan la capacidad de migrar en condiciones basales, hecho que les confiere una altísima tasa de migración espontánea.

Ensayos de video-microscopía en geles de colágeno

<i>Células</i>	IBH-6	MDA-MB-231
<i>Compuestos Adrenérgicos</i>		
	Células en movimiento (%)	Células en movimiento (%)
Control	68,42 ± 1,16	76,71 ± 0,49
Epinefrina	72,65 ± 0,82 **	63,67 ± 0,76 ***
Norepinefrina	69,91 ± 0,83	70,36 ± 0,82 ***
Propranolol	63,13 ± 1,2 **	67,30 ± 0,86 ***
Control	74,26 ± 0,87	81,56 ± 0,73
Salbutamol	68,86 ± 1,03 **	76,76 ± 0,55 ***
Clonidina	62,85 ± 0,96 ***	76,08 ± 1,03 ***
Rauwolfscina	71,04 ± 0,96 ***	73,31 ± 0,79 ***
<i>Análogos de AMPc</i>		
	Células en movimiento (%)	Células en movimiento (%)
Control	63,06 ± 1,07	81,31 ± 0,61
8-Br-AMPc	58,06 ± 1,12 **	74,06 ± 0,65 ***
8-CPT-2'-O-Me-AMPc	70,89 ± 1,07 ***	63,57 ± 0,68 ***
6-Bnz-AMPc	60,33 ± 0,82 *	77,46 ± 0,51 ***
<i>Anti-CXCR1</i>		
	Células en movimiento (%)	Células en movimiento (%)
Control Isotipo	76,33 ± 0,79	75,44 ± 0,95
Bloqueo CXCR1	63,36 ± 1,12 ***	73,83 ± 0,9
<i>Inhibidores de Tirosinas Quinasas</i>		
	Células en movimiento (%)	Células en movimiento (%)
Control	53,65 ± 1,12	79,69 ± 0,69
AG18	54,98 ± 0,97	76,43 ± 0,68 **
PP2	48,22 ± 1,06 ***	74,02 ± 0,65 ***
PP3	57,22 ± 1,27	79,31 ± 0,81
<i>Vía de la fosfolipasa C (PLC)</i>		
	Células en movimiento (%)	Células en movimiento (%)
Control	61,46 ± 0,84	76,67 ± 0,72
3m3FBS	60,69 ± 0,77	75,17 ± 0,68
U73122	48,67 ± 0,87 ***	63,65 ± 0,69 ***
U73342	60,46 ± 0,86	73,63 ± 0,63

Tabla 3.1. Ensayos de video-microscopía en geles de colágeno. Los datos de la tabla corresponden al valor de la media del porcentaje de células en movimiento (%) ± SEM, calculado a partir de los resultados de tres ensayos independientes. Análisis estadístico: Se realizaron las comparaciones con los controles correspondientes a cada ensayo. Anova seguido de test de Dunnett *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Anti-CXCR1: Test de Student ***p<0,001.

DISCUSIÓN

Expresión de receptores β -adrenérgicos en líneas celulares mamarias humanas

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar si los agonistas β -adrenérgicos podrían ser utilizados como terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

La primera aproximación fue estudiar la expresión de los RA- β_2 en las líneas tumorales de mama humanas utilizadas en el laboratorio.

Todas las líneas celulares expresaron el RA- β_2 cuando se realizaron ensayos de RT-PCR. También presentaron marcación positiva cuando se realizaron ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, siendo la localización del receptor citoplasmática y en la membrana celular. En algunos casos se observó marcación nuclear, pero no se observó co-localización con el ADN celular.

Varios grupos de investigación describieron la presencia de receptores β -adrenérgicos en la glándula mamaria normal de ganado ovino y bovino (Gow y col., 2003, Roets y col., 1984, Roets y col., 1986, Inderwies y col., 2003b, Inderwies y col., 2003a, Inderwies y col., 2003c, Wellnitz y col., 2001, Roets y Peeters, 1986). Inicialmente los RA se describieron en la glándula mamaria bovina debido a su importancia en la producción de leche. Los receptores β -adrenérgicos fueron identificados en el músculo liso de las paredes del pezón y alrededor de los conductos principales por técnicas de *binding* o unión al ligando (Hammon y col., 1994) y RT-PCR (Inderwies y col., 2003b, Inderwies y col., 2003a) y se los relacionó con la extracción de leche. Cuando se realizaron estudios de expresión mediante la técnica de RT-PCR se observó que el subtipo más expresado era el RA- β_2 , seguido por el RA- β_1 y RA- β_3 (Inderwies y col., 2003b).

Los RA- β también fueron descritos en la glándula mamaria normal de modelos experimentales. Se describió la presencia de los mismos en ratas, específicamente en las células epiteliales, alvéolos, ductos y también en adipocitos de la glándula mamaria de ratas en período de lactancia (Marchetti y col., 1990). Asimismo, se describió una regulación hormonal de la expresión de los RA- β , siendo ésta 2 a 3 veces más elevada en ratas preñadas, observándose una correlación con el receptor de progesterona (RP) y con los niveles plasmáticos de las hormonas 17- β -estradiol y progesterona (Marchetti y col., 1990, Marchetti y Labrie, 1990). También se observaron variaciones en la expresión de estos receptores en las diferentes etapas del ciclo estral, siendo la mayor expresión durante las fases pro-estro y estro (Marchetti y Labrie, 1990).

Este mismo grupo de investigación analizó la presencia de los RA- β en tumores mamarios inducidos por la administración de DMBA en ratas (Marchetti y *col.*, 1989).

Observaron que los tumores expresaban grandes cantidades de RA- β , y este número disminuía luego de ovariectomizar a los animales. Los RA- β también estaban presentes en grandes niveles en los animales que desarrollaban tumores mamarios espontáneos (Marchetti y *col.*, 1989).

Con respecto a la expresión de los RA- β en líneas tumorales mamarias humanas, éstos fueron descritos en varias líneas celulares por la técnica de *binding* o unión al ligando (MDA-MB-231, MCF-7, VHB-1, T47-D, BT.-20, CG-5) (Vandewalle y *col.*, 1990, Badino y *col.*, 1996, Draoui y *col.*, 1991).

En referencia a la localización de los receptores adrenérgicos, en los ensayos de inmunofluorescencia se observó marcación nuclear (color verde, FITC) mientras que no se observó co-localización con el ADN celular (teñido de rojo con yoduro de propidio), la cual se evidenciaría mediante la aparición de marcación amarilla (mezcla del rojo y verde). La presencia de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) es típicamente asociada a la membrana celular. Los GPCR son sintetizados en el retículo endoplasmático, transportados al aparato de Golgi en donde sufren modificaciones post-traduccionales y luego se movilizan hasta la membrana celular. Se describió que la expresión de otros GPCRs, como el receptor CysLT1 de leucotrienos D4 está incrementado en adenocarcinomas colorectales y que la localización nuclear de este receptor correlaciona positivamente con el marcador de proliferación Ki-67 (Nielsen y *col.*, 2005). También se ha remarcado que existe una población funcional de GPCRs que no está asociada a la membrana plasmática (Zhu y *col.*, 2006). Mientras las respuestas inmediatas pueden estar asociadas a los receptores clásicos de membrana, efectos más duraderos serían causados por los receptores intracelulares. Se describieron receptores nucleares para otros GPCR como el factor activador de plaquetas, prostaglandinas y ácido lisofosfatídico en diferentes tejidos (Zhu y *col.*, 2006). Es interesante destacar que si bien se ha analizado un solo cultivo primario de fibroblastos asociados a tumor, en los mismos no aparece marca nuclear. Esto podría explicarse por el hecho que son fibroblastos activados y no tumorales.

Entonces, mediante las técnicas descritas anteriormente se comprobó la expresión de RA- β_2 en todas las líneas celulares utilizadas y en los cortes histológicos provenientes de tumores mamarios humanos.

Efecto in vitro de compuestos β -adrenérgicos

Con respecto a la acción biológica mediada por los RA- β , inicialmente se realizaron ensayos *in vitro* de proliferación celular, utilizando el agonista natural epinefrina y los agonistas β -adrenérgicos, isoproterenol y salbutamol.

La epinefrina, en todos los casos provocó un aumento de la proliferación celular. Nuestro grupo describió que este efecto mitogénico está mediado por los receptores α_2 -adrenérgicos, ya que al tratar a las células con epinefrina y con un antagonista β -adrenérgico (propranolol) no se observa reversión del efecto, mientras que la reversión sí ocurre cuando las células son preincubadas con un antagonista α_2 como la rauwolscina (Vazquez y col., 2006, Bruzzone y col., 2008, Vazquez y col., 1999, Vazquez, 2001, Bruzzone, 2008).

La epinefrina es capaz de unirse con alta afinidad a todos los tipos de receptores adrenérgicos y muchas veces las vías de señalización de los diferentes subtipos de RA son contrapuestas. Este hecho demuestra que un único ligando, la epinefrina en este caso, puede activar simultáneamente múltiples proteínas G acopladas a diversos efectores en un determinado tipo celular/tejido. El complejo procesamiento de la señal es característico de las catecolaminas y de las drogas que mimetizan o bloquean la acción de las mismas. Los receptores α_2 - están acoplados a proteínas Gi y Go, las cuales inhiben la adenilil ciclasa (Malbon y col., 2001). Por el contrario, los receptores β_1 - son capaces de unirse a proteína Gs, mientras que los RA- β_2 pueden unirse tanto a proteínas Gi como Gs (formando heterodímeros) (Philipp y Hein, 2004). Los receptores α_1 - están acoplados a proteínas Gq/11, las cuales se relacionan con los niveles de calcio intracelular (Philipp y Hein, 2004, Malbon y col., 2001).

Como se comentó anteriormente, la epinefrina es el ligando natural de los receptores adrenérgicos, junto con la norepinefrina. Estos compuestos ejercen su acción mediante la unión a todos los tipos de receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 , y β). En los ensayos *in vitro*, la respuesta final observada dependerá del modelo particular que se está estudiando. En las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo, la epinefrina actuaría a bajas concentraciones a través de los RA- α_2 provocando un aumento de la incorporación de timidina tritiada al núcleo celular. Este efecto mediado por los receptores α_2 -adrenérgicos también fue observado por otro grupo de investigación en células de cultivo primario de túbulo proximal de riñón (Cussac y col., 2002).

En otros modelos, como las líneas celulares de próstata LNCaP y C4-2, la epinefrina protege a las células de la apoptosis a través de un mecanismo dependiente de la fosforilación de BAD (Sastry y *col.*, 2007). En células de cáncer de ovario humano se observó que el tratamiento con epinefrina y norepinefrina generaba una disminución de los niveles de *anoikis*, proceso por el cual las células entran en apoptosis. Es decir, la epinefrina y norepinefrina estarían protegiendo a las células de la muerte celular programada (Sood y *col.*, 2010).

En los experimentos realizados en la presente tesis, la línea celular MCF-7 exhibió una curva bifásica, consistente con acciones opuestas mediadas por el efecto mitogénico α_2 -adrenérgico y el efecto inhibitorio β -adrenérgico a altas concentraciones del agonista. La EC_{50} para la acción mitogénica de la epinefrina está entre 2pM y 5nM para todas las líneas celulares estudiadas. A concentraciones más elevadas, la incorporación de timidina tritiada comienza a disminuir, haciéndose visible el efecto inhibitorio β -adrenérgico.

Con respecto a la acción biológica de los agonistas β -adrenérgicos, se han descrito resultados contradictorios. En los resultados aquí presentados, en todas las líneas celulares utilizadas se observó que los agonistas β -adrenérgicos salbutamol e isoproterenol provocaron una disminución de la proliferación celular.

Este hecho también fue descrito en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano, las cuales al ser estimuladas con isoproterenol mostraron una disminución de la síntesis de ADN (Slotkin y *col.*, 2000). En otro trabajo, utilizando células MCF-7 transfectadas con un mutante activo de la proteína Gs se observó el mismo efecto, una disminución de la proliferación celular (Chen y *col.*, 1998). También fue descrita una disminución de la proliferación en células MCF-7 luego del tratamiento con AMPc (Cho-Chung y *col.*, 1981, Boe y *col.*, 1995). Los receptores β -adrenérgicos están acoplados a proteínas Gs, y parte de su acción biológica se debe al aumento de los niveles intracelulares de AMPc.

Por el contrario, en otros modelos se ha descrito a los receptores β -adrenérgicos asociados a un aumento de la proliferación celular. En ensayos *in vitro* con células endoteliales de rata, el tratamiento con agonistas β_2 -adrenérgicos provoca un aumento en la incorporación de timidina tritiada, cumpliendo un rol en la neoangiogénesis en respuesta a la isquemia de miocardio (Iaccarino y *col.*, 2005).

Asimismo, se ha reportado un efecto promotor de la proliferación celular por parte del agonista β isoproterenol en fibroblastos dérmicos humanos. Estos receptores estarían involucrados en el proceso de cicatrización cutánea, mediando la proliferación de fibroblastos y también la migración de los mismos (Pullar y Isseroff, 2006, Pullar y *col.*, 2008).

Por último, en la línea celular de cáncer de esófago humano HKESC-1, la epinefrina provocó un incremento de la proliferación celular. Este efecto fue mediado por los receptores β -adrenérgicos, ya que al realizar el tratamiento conjunto con β -bloqueantes se observó una completa reversión del mismo (Liu y *col.*, 2008).

En resumen, la acción biológica mediada por receptores β -adrenérgicos es sumamente compleja y las acciones de los agonistas incluyen una variedad de efectos diferentes. Los aportes de la bibliografía muestran resultados contrapuestos y el efecto de los agonistas β -adrenérgicos depende, en gran parte, del modelo particular que se está estudiando.

Vías de señalización asociadas a la activación de los receptores β -adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas

La primera aproximación realizada para estudiar las vías de señalización involucradas en el uso de agonistas β -adrenérgicos fue el estudio de la fosforilación de las proteínas Erk1/2 mediante la técnica de *Western blot*. En trabajos previos del laboratorio, utilizando la línea tumoral mamaria humana MCF-7, se demostró que esta vía es activada mediante el uso de agonistas α_2 -adrenérgicos como el UK 14304 y la dexmedetomidina (Bruzzzone, 2008). Del mismo modo, hay trabajos en los cuales se describió la activación de esta vía de señalización luego de la incubación de células madre embrionarias de ratón con epinefrina (Kim y *col.*, 2008) y con agonistas α_2 -adrenérgicos en células PC12 transfectadas individualmente con los diferentes subtipos de RA- α_2 (Karkoulias y *col.*, 2006, Karkoulias y *col.*, 2007). Por otro lado, en la línea no tumoral de mama humana MCF-10A, los agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y clenbuterol) provocaron una disminución de la fosforilación de Erk1/2 (Bruzzzone, 2008).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que los agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y salbutamol) provocan una disminución en los niveles de fosforilación de Erk1/2 en las células MDA-MB-231, IBH-4 e IBH-6 y están en concordancia con lo obtenido en los ensayos de proliferación *in vitro*.

La cascada de señalización de Erk es una de las vías de MAPK más estudiadas en mamíferos. Además, esta vía se encuentra desregulada en aproximadamente un tercio de los cánceres humanos (Dhillon *y col.*, 2007, Kim y Choi, 2010, Mirzoeva *y col.*, 2009, Whyte *y col.*, 2009). Erk1/2 es activada por numerosas señales extracelulares, siendo de particular relevancia para la investigación del cáncer la activación de estas proteínas por parte de factores de crecimiento (Dhillon *y col.*, 2007).

Estas dos isoformas (Erk 1 y Erk2) se expresan en células de mamíferos con un 83% de homología en su secuencia (Turjanski *y col.*, 2007). La proteína Erk2 es activada principalmente por factores de crecimiento. Por ejemplo, la unión del factor de crecimiento epidermal (EGF) a su receptor (EGFR) provoca la dimerización del receptor y la consecuente fosforilación de varios blancos, entre ellos se encuentra la proteína Ras, la cual iniciará una cascada secuencial de fosforilación hasta llegar a Raf, Mek1/2 y finalmente Erk1/2 (Turjanski *y col.*, 2007). Las proteínas Erk1/2 una vez fosforiladas traslocan al núcleo celular y activan una variedad de factores de transcripción (c-Myc, c-Fos, AP-1, CREB, etc), generando cambios en la expresión génica (Turjanski *y col.*, 2007, Meloche y Pouyssegur, 2007, Smith *y col.*, 2010a)

Por otro lado, la señalización asociada a los receptores adrenérgicos es sumamente compleja y depende del modelo que se está estudiando. Los receptores β_2 -adrenérgicos, al igual que todos los receptores de siete pasos transmembrana, están asociados a proteínas G. La señalización clásica de los RA- β_2 ocurre mediante su acoplamiento a proteínas Gs. Las proteínas G están formadas por tres subunidades: α , β y γ . Cuando los receptores son activados por sus ligandos sufren un cambio conformacional activando a la proteína G asociada (Mcgarrigle y Huang, 2007, Robert, 2010). En particular, las proteínas Gs están definidas por su subunidad α s, la cual activa a la adenilil ciclasa provocando un aumento en los niveles de AMPc y la consecuente activación de la PKA (Hepler y Gilman, 1992, Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). Por otro lado, las subunidades $\beta\gamma$ estimulan diversos efectores río abajo incluyendo enzimas, canales iónicos y pequeñas GTPasas. Estas proteínas regulan múltiples vías de señalización,

incluyendo a la vía de las MAPK (Krishna y Narang, 2008, Hepler y Gilman, 1992, Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).

Se comenzó a explorar entonces qué vías de señalización estaban involucradas en la reducción de la fosforilación de Erk. Fundamentalmente, se quiso investigar si se trataba de la vía clásica de los receptores β_2 -adrenérgicos o de otra vía.

En las líneas celulares utilizadas (MDA-MB-231, IBH-4 e IBH-6) se confirmó que la disminución de la fosforilación de Erk es causada por el aumento de AMPc mediante el uso de diversas estrategias. En particular en la línea IBH-4, utilizando un análogo activador selectivo de PKA (6Bnz) se observó el mismo efecto sobre la fosforilación de Erk que con los agonistas β -adrenérgicos salbutamol e isoproterenol. Asimismo, el análogo de AMPc 8-Br-cAMP (el cual es capaz de activar a PKA y EPAC) y la forskolina (la cual aumenta los niveles de AMPc intracelulares) también provocaron una disminución en la razón pErk/Erk, indicando que el responsable de esta acción sería la señalización del RA- β_2 actuando a través de la vía clásica descrita. Este hecho fue confirmado mediante el uso del inhibidor de PKA (H89), el cual revirtió el efecto de los agonistas sobre la fosforilación de las proteínas Erk. Es ampliamente conocido que el AMPc es el segundo mensajero de un gran número de receptores acoplados a proteínas G. Esta molécula interviene en la regulación de numerosas enzimas, en particular la PKA (Robert, 2010).

El principal mecanismo mediante el cual la proteína Gas inhibe la vía de Erk1/2 a través de AMPc-PKA ocurre por medio de la fosforilación de Raf (también conocida como C-Raf o Raf-1) (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007, Cook y McCormick, 1993). La proteína Raf-1 es un blanco de fosforilación de PKA, más específicamente la fosforilación en la Ser-259 provoca una disminución en la activación de la misma, generando una inhibición en cascada de señales Raf-1-Mek1/2-Erk1/2 (Stork, 2002, Goldsmith y Dhanasekaran, 2007, Mccubrey y *col.*, 2007, Robert, 2010, Smith y *col.*, 2010b). Por otro lado, se ha descrito que la inhibición de Raf-1 también está mediada por Rap-1 (Rap-1 provoca el secuestro de Raf-1) (Stork, 2002, Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).

En la línea MDA-MB-231 fue previamente descrita la inhibición de la vía de Raf-1-Mek1-Erk1/2 luego de la utilización de un agonista β_2 -adrenérgico (pirbuterol) en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Carie y Sebti, 2007). En ese trabajo se demuestra que el agonista pirbuterol actúa a través de la vía clásica de señalización de los receptores β_2 -adrenérgicos, siendo el aumento en los niveles intracelulares de AMPc el principal

responsable de la caída en la razón pErk/Erk (Carie y Sebti, 2007). Los resultados correspondientes a la línea MDA-MB-231 presentados en este trabajo de tesis concuerdan con los previamente descritos por el grupo de Carie y Sebti, sugiriendo que la inhibición de la fosforilación de Erk1/2 estaría mediada por la activación de los receptores β_2 -adrenérgicos, el aumento de AMPc y la posterior activación de la PKA.

Por otro lado, el grupo de Soltoff y colaboradores obtuvo resultados similares al estudiar la vía de señalización de los receptores β -adrenérgicos en la glándula parótida de ratas (Soltoff y Hedden, 2010). Esta glándula está naturalmente inervada por neuronas simpáticas y parasimpáticas, siendo blanco de los compuestos adrenérgicos endógenos (epinefrina y norepinefrina). En las células acinares provenientes de la misma el grupo anteriormente mencionado observó que el isoproterenol provocaba la disminución de la fosforilación de Erk y obtuvo resultados similares utilizando forskolina así como análogos específicos de AMPc, incluyendo un análogo activador de PKA, siendo la PKA (y no EPAC) la única involucrada en la disminución de la razón pErk/Erk (Soltoff y Hedden, 2010).

Por el contrario, un trabajo recientemente publicado demostró que los receptores β -adrenérgicos estarían implicados en el desarrollo de cáncer de páncreas. En este trabajo, los autores proponen que los agonistas β -adrenérgicos (tanto β_1 como β_2) activan a la vía de las MAPK mediante la activación de la PKA, finalmente provocando un aumento en la proliferación celular (células de cáncer de páncreas humanas PaCa-2 y BxPC-3). Asimismo, el aumento de los niveles de AMPc seguido de la activación de la PKA provocaría la activación de la vía de Raf-1-Mek1/2-Erk1/2 y de la vía de PI3K/Akt (Zhang y *col.*, 2010).

Además, la estimulación β_2 -adrenérgica con un agonista resulta en un pulso transiente de AMPc y la subsecuente fosforilación del receptor por la quinasa de GPCR (GRK6). Esta fosforilación lleva a la inactivación del receptor mediada por β -arrestinas y la inducción del metabolismo de AMPc por fosfodiesterasas (Violin y *col.*, 2008). Se ha reportado que la fosfodiesterasa PDE4 puede interactuar con β -arrestinas y ser reclutada por el RA- β_2 de forma agonista dependiente (Houslay y Baillie, 2003). La PDE4 es la encargada de que el RA- β_2 active a la proteína G α_i y subsecuentemente a Erk1/2. En las líneas de cáncer hepático HepG2 y MHCC97H, el isoproterenol promovió la proliferación celular y la fosforilación de Erk mediante mecanismos independientes del receptor de EGF (Yuan y *col.*, 2010). Por otro lado, el carcinógeno del tabaco 4-

(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona, el cual posee alta afinidad por los RA- β estimula la activación de Erk en la línea tumoral de mama MDA-MB-453 (Plummer y *col.*, 2004).

La importancia de estudiar las vías de señalización activas en células tumorales reside principalmente en la posibilidad de utilizar nuevas terapias que inhiban la activación de las mismas, modificando así el comportamiento de las células tumorales. Por este motivo, el estudio de la vía de las MAPK ha sido de gran interés durante los últimos años. Se han desarrollado inhibidores farmacológicos de estas cascadas de señalización para el tratamiento del cáncer (Roberts y Der, 2007). En particular en cáncer de mama, el desarrollo de resistencia a la quimioterapia es un gran problema durante el curso del tratamiento de las pacientes (Haagenson y Wu, 2010). Las MAPK han sido involucradas en la resistencia al tamoxifeno (Riggins y *col.*, 2007), así como las fosfatasa de MAPK han sido relacionadas a la resistencia de los tratamientos con doxorubicina, paclitaxel, inhibidores de proteosoma, entre otros (Haagenson y Wu, 2010, Kurebayashi, 2005).

Asimismo, el uso de otros compuestos (como los agonistas β -adrenérgicos) que modifiquen estas vías de señalización tan importantes en la progresión de la enfermedad, resulta alentador para el desarrollo de nuevas terapias adyuvantes para el tratamiento del cáncer.

Inhibición β -adrenérgica del crecimiento tumoral

El siguiente enfoque fue estudiar el efecto de los compuestos β -adrenérgicos mediante una aproximación *in vivo*. El modelo utilizado fueron las líneas celulares IBH-4 e IBH-6 creciendo en ratones desnudos.

Es importante destacar que las líneas celulares han sido de gran utilidad para el estudio del cáncer de mama gracias a su fácil propagación, la posibilidad de manipularlas genéticamente y la capacidad de generar resultados reproducibles bajo condiciones experimentales bien definidas (Vargo-Gogola y Rosen, 2007). Por otro lado, el crecimiento de líneas celulares como xenotransplantes permite la investigación en el ambiente *in vivo*, teniendo en consideración la compleja interacción entre células del tumor y las estromales lo cual facilita la formación y progresión tumoral (Vargo-Gogola y Rosen, 2007, Heppner y *col.*, 2000). Sin embargo, los xenotransplantes deben ser

establecidos en ratones inmunosuprimidos, en nuestro caso en ratones desnudos (no poseen linfocitos T). Este hecho podría afectar el desarrollo y la progresión tumoral (Balkwill y *col.*, 2005, Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

De todas formas, la utilización de xenotransplantes ha demostrado ser de gran utilidad en la investigación en cáncer de mama. El grupo de Massague y colaboradores detectó genes involucrados en la metástasis pulmonar a partir experimentos *in vivo* con la línea tumoral MDA-MB-231. Un grupo de estos genes correlacionó con los genes expresados en pacientes que desarrollaron metástasis en pulmón, dando indicio de la importancia del uso de xenotransplantes como modelos *in vivo* de cáncer de mama (Vargo-Gogola y Rosen, 2007, Nguyen y Massague, 2007).

En particular, cuando se realizaron los ensayos *in vivo* en el presente trabajo, se observó que ambos tumores fueron sensibles al efecto inhibitorio de los agonistas β -adrenérgicos. El isoproterenol inhibió el crecimiento tumoral de la misma forma que el salbutamol. En los experimentos posteriores se trabajó con salbutamol (agonista β_2), por ser una droga actualmente utilizada en la clínica en el tratamiento del asma (Gordon y Panos, 2010).

Las dosis elegidas en la presente tesis para los tratamientos *in vivo* fueron mucho menores que las utilizadas habitualmente por otros grupos de investigación. Por ejemplo, el isoproterenol en algunos casos es utilizado en dosis de 10 mg/kg/día (Landen y *col.*, 2007) y 200 mg/kg/día (Carie y Sebti, 2007). El propranolol inicialmente era utilizado en dosis de 0,5 mg/kg/día y luego se aumentó la dosis oral a 2 mg/kg/día para el tratamiento de hemangiomas en niños (Jadhav y Tolat, 2010). Una dosis similar fue utilizada en ratones (Wang y *col.*, 2008). Cuando se realizaron experimentos preliminares para testear los efectos de los compuestos adrenérgicos en el crecimiento tumoral, las dosis elegidas demostraron ser suficientes para causar un resultado evitando efectos colaterales.

El salbutamol provocó la disminución del crecimiento tumoral de la misma manera que el isoproterenol, sugiriendo que los receptores β_2 -adrenérgicos serían los responsables de mediar esta inhibición. El mismo efecto fue observado en modelos mamarios murinos con diferente sensibilidad al MPA (Lanari y *col.*, 2009, Perez Piñero y *col.*, 2010). El tumor progestágeno-independiente CC4-3-HI respondió al tratamiento con agonistas β -adrenérgicos tan bien como el tumor sensible a progestágenos C4-HD (Bruzzzone, 2008, Perez Piñero y *col.*, 2010).

La línea MDA-MB-231 inoculada en ratones desnudos había demostrado regresión e inhibición del crecimiento tumoral al ser tratada con el agonista β -adrenérgico ARA-211 o pirbuterol actuando a través del RA- β_2 (Carie y Sebti, 2007). En datos no mostrados, este grupo indica que el agonista β -adrenérgico isoproterenol logró inhibir el crecimiento tumoral sin causar regresión tumoral (Carie y Sebti, 2007). Nuestro grupo efectuó este experimento a modo de control, realizándolo con isoproterenol para utilizar las mismas condiciones experimentales que el trabajo descrito. Este compuesto logró inhibir significativamente el crecimiento tumoral (Perez Piñero y *col.*, 2010).

También se han publicado resultados contrapuestos provenientes de experimentos *in vivo* utilizando compuestos β -adrenérgicos en diferentes modelos experimentales. Se demostró que en carcinomas mamarios de rata inducidos por DMBA los RA- β estaban asociados al crecimiento tumoral (Marchetti y *col.*, 1989). Además, el mismo grupo observó una correlación positiva entre la concentración de receptores β -adrenérgicos y la progresión tumoral. En animales ovariectomizados la concentración de receptores en el tumor descendía abruptamente, sugiriendo una regulación hormonal de la expresión génica de los RA- β (Marchetti y Labrie, 1990, Marchetti y *col.*, 1991). El grupo de Sood y colaboradores obtuvo resultados similares, utilizando un modelo de cáncer de ovario humano (células SKOV3 inoculadas en la cavidad peritoneal) estudiando el efecto del estrés por inmovilización y de compuestos β -adrenérgicos sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Thaker y *col.*, 2006). En este trabajo observaron que el agonista β adrenérgico isoproterenol y el agonista β_2 terbutalina, provocaban un aumento del crecimiento tumoral (cuantificado como un aumento del peso tumoral), al igual que el estrés por inmovilización, siempre comparando con los resultados obtenidos en animales control. Este efecto era revertido en todos los casos por la administración de propanolol o la utilización de *siRNA* (ARN pequeños de interferencia) para los RA- β_2 (Thaker y *col.*, 2006).

En los modelos *in vivo* utilizados en la presente tesis, el propanolol revirtió completamente el efecto del agonista β -adrenérgico. Cuando los animales fueron inyectados con propanolol, este compuesto no causó un efecto *per se* sobre el crecimiento tumoral. En la bibliografía hay una variedad de efectos del propanolol actuando como antagonista de las catecolaminas endógenas. En un modelo de adenocarcinoma pancreático ductal desarrollado en hámsters con pancreatitis inducida por etanol, el propanolol fue capaz de prevenir el desarrollo tumoral (Al-Wadei y *col.*, 2009). Por otro lado, en ratones desnudos con tumores de próstata desarrollados a partir

de la línea celular PC-3, este compuesto fue capaz que prevenir el desarrollo de metástasis en el ganglio linfático axilar (inducidas por la administración de norepinefrina mediante bombas microosmóticas) mientras que el tumor primario no se vio afectado por el tratamiento con el antagonista β (Palm y *col.*, 2006). Asimismo, un trabajo recientemente publicado en el cual se utiliza un modelo *in vivo* de cáncer de mama murino (tumores desarrollados a partir de la línea celular 66cl4), se demuestra que el propranolol es capaz de revertir el establecimiento de metástasis en sitios distantes del tumor primario en animales estresados por inmovilización en comparación con los animales sin tratar con propranolol (Sloan y *col.*, 2010). En este modelo experimental, los autores administran el antagonista suponiendo que los niveles de los agonistas endógenos (epinefrina y norepinefrina) están elevados debido al estrés provocado por la inmovilización (Sloan y *col.*, 2010).

Es importante destacar que el propranolol ha sido descrito como un agonista parcial fundamentalmente a nivel transcripcional (Baker y *col.*, 2003). Entonces, el resultado observado podría deberse al efecto de agonista parcial descrito anteriormente. Muchos de estos estudios no utilizan agonistas β -adrenérgicos en sus ensayos, descartando la posibilidad que el resultado final sea el mismo ya que se estaría utilizando un agonista propiamente dicho.

De todas formas, teniendo en cuenta los datos aportados por la bibliografía, los resultados obtenidos dependen en gran medida del modelo que se está estudiando. Una forma más adecuada de estudiar los efectos de los compuestos adrenérgicos sería mediante la utilización tanto de los agonistas como de los antagonistas. En muchos casos ambos compuestos generan el mismo efecto.

Comparación de acciones α_2 y β -adrenérgicas sobre el crecimiento tumoral

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que el antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina provoca una disminución del crecimiento tumoral, actuando como un agonista inverso (Luthy y *col.*, 2009, Bruzzone y *col.*, 2008, Bruzzone y *col.*, 2010). Este efecto fue descubierto ya que al tratar a los animales con el agonista α_2 clonidina se observaba un aumento del crecimiento tumoral, siendo revertido por la yohimbina y la rauwolscina (antagonistas de los RA- α_2). En los animales tratados únicamente con el antagonista rauwolscina se observaba una disminución significativa

del crecimiento tumoral, lo cual dio indicio de su acción como agonista inverso. Este efecto no se observó cuando se les administraba a los animales otro antagonista α_2 , la yohimbina, siendo entonces un efecto único de la rauwolscina (Bruzzone, 2008). Los agonistas inversos están descritos como compuestos capaces de inhibir la actividad basal de los receptores, mientras que los antagonistas no poseen efectos sobre la actividad basal pero si bloquean el acceso de otros ligandos al sitio de unión (Rosenbaum y *col.*, 2009, Audet y Bouvier, 2008).

Entonces, se quiso estudiar el efecto de la rauwolscina y del salbutamol, actuando en simultáneo sobre el crecimiento *in vivo* de las líneas IBH-4 e IBH-6. Ambos compuestos fueron igualmente efectivos con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral. Este resultado estaría indicando que, tanto el salbutamol como la rauwolscina, provocan la disminución del crecimiento tumoral utilizando la misma vía de señalización, y siendo la vía de Erk1/2 una de las vías involucradas. Si las vías divergieran se debería haber observado una respuesta diferencial con cada droga por separado y un efecto aditivo y/o sinérgico con el tratamiento conjunto. Asimismo, podría estar ocurriendo que el sistema se encuentre saturado y el crecimiento tumoral se encuentre inhibido en su máxima capacidad, eliminándose la posibilidad de diferenciar el efecto de cada uno de los compuestos adrenérgicos utilizados. Una forma de averiguarlo sería utilizar los compuestos alrededor de la dosis efectiva 50.

Mecanismos de señalización involucrados en el crecimiento tumoral

Luego de realizar los experimentos *in vivo* resultó de gran interés estudiar las vías de señalización involucradas en las respuestas observadas.

Como se indicó previamente en la discusión de los resultados de señalización a partir de los experimentos *in vitro*, la señalización de los receptores β -adrenérgicos es compleja. Los receptores β -adrenérgicos han sido principalmente estudiados en el sistema cardiovascular y en el sistema respiratorio debido a su influencia en las patologías asociadas a los mismos. La mayoría de las acciones de los RA- β_2 están mediadas por la proteína Gs y el aumento de los niveles intracelulares de AMPc luego de la activación de la PKA (Johnson, 2006). Por otro lado, los RA- β_2 también pueden acoplarse a proteínas Gi, provocando una estimulación de las vías de Erk y p38. La activación de estas vías de señalización está mediada por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G y a través de varias proteínas adaptadoras se culmina en la estimulación de las MAPK (Daaka y col., 1997, Johnson, 2006, Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).

Al estudiar la vía de Erk1/2 se observó una disminución en los niveles de fosforilación de estas proteínas en los tumores IBH-4 e IBH-6 provenientes de animales tratados con el agonista β_2 salbutamol, el antagonista α_2 rauwolscina y ambos compuestos administrados simultáneamente, siempre relativizando los resultados con respecto a los controles (razón pErk/Erk).

Hay descritas siete cascadas de señalización relacionadas con proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), cuatro de ellas implicadas en enfermedades de la glándula mamaria y el funcionamiento de las células epiteliales mamarias (Whyte y col., 2009). Estas cascadas incluyen a las vías de Erk1/2, Erk5, p38 y por último la vía de JNK (Whyte y col., 2009, Dhillon y col., 2007).

Particularmente, en algunos tipos de cáncer de mama humano y en muchos modelos experimentales, la señalización a través de Erk1/2 se describió como de suma importancia en la progresión de la enfermedad (Santen y col., 2002). La fosforilación de Erk1/2 ocurre por acción de factores de crecimiento y citoquinas actuando a través de receptores tipo tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G y receptores de esteroides no nucleares en su estado activo (May y Hill, 2008, Santen y col., 2002, Whyte y col., 2009, Schlessinger, 2000, Dhillon y col., 2007).

Esta vía de señalización juega un papel importante en una amplia gama de actividades celulares, tales como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la invasión, la angiogénesis y la migración celular (Kim y Choi, 2010, Whyte y *col.*, 2009).

La cascada de señalización que controla la proliferación celular e involucra a las proteínas Ras-Raf-Mek-Erk ha sido intensamente estudiada (Mebratu y Tesfaigzi, 2009, Meloche y Pouyssegur, 2007). Recientemente se demostró que la estimulación con un agonista β_2 -adrenérgico (ARA-211 o pirbuterol) suprimía la vía Raf-1/Mek-1/Erk1/2 mediada por la activación de PKA y no por la proteína intercambiadora activada por AMPc (EPAC) (Carie y Sebtí, 2007). La vía de EPAC es otra vía de señalización activada por AMPc, pero independiente de PKA. Estos resultados fueron obtenidos en un modelo tumoral mamario humano, utilizando a las células MDA-MB-231 creciendo en ratones desnudos (Carie y Sebtí, 2007). En nuestro modelo, los niveles de fosforilación de Erk1/2 estaban disminuidos, muy posiblemente toda la vía de señalización se encuentre suprimida por la acción del agonista salbutamol.

Hace unos años el grupo de Shenoy y colaboradores demostró un nuevo mecanismo de señalización, en donde los RA- β_2 mediante proteínas β -arrestinas activan la vía de Erk. En este mecanismo estaba involucrada la proteína G α_i en lugar de la vía clásicamente decrita involucrando únicamente a la proteína Gas (Shenoy y *col.*, 2006).

En los tumores IBH-4 e IBH-6 tratados con salbutamol, rauwolscina y ambos compuestos en simultáneo, se observó una disminución significativa de la razón pErk/Erk. En el caso particular del tumor IBH-4, también se obtuvo este resultado utilizando el agonista β isoproterenol. Estos resultados correlacionaron con la tasa de crecimiento tumoral y se puede afirmar que la vía de señalización de Erk1/2 estaría involucrada en la regulación del crecimiento tumoral. Sin embargo, la supresión del crecimiento tumoral no es completa. Los compuestos adrenérgicos disminuyen la tasa de crecimiento tumoral pero no provocan la regresión del mismo, lo cual estaría indicando que estas drogas pueden modular el crecimiento tumoral, pero no suprimir la progresión con 100% de efectividad. Este efecto inhibitorio de los compuestos adrenérgicos fue notorio al inicio de los experimentos *in vivo*, siendo los primeros 15 días de tratamiento el período de tiempo en el cual los tumores crecen con menor velocidad. Luego, el tiempo de duplicación de todos los tratamientos se equipara, lo cual parecería indicar que los agonistas β -adrenérgicos podrían dejar de actuar por una

desensibilización (*downregulation*) del receptor en presencia del agonista (Charlton, 2009).

Por el contrario, también fue descrita la inhibición de esta vía (Ras/Raf/Mek/Erk) asociada a progresión tumoral en modelos de cáncer de próstata en los cuales una mutación en PTEN contribuye a la supresión de esta cascada de señalización debido a la alta actividad de Akt, el cual fosforila e inactiva diferentes tipos de proteínas Raf (McCubrey y col., 2007). Es sabido que la vía de Ras/Raf/Mek/Erk y la de Ras/PI3K/PTEN/Akt interactúan activamente para regular el crecimiento tumoral y en algunos casos la tumorigenicidad (McCubrey y col., 2007). Particularmente, en células de cáncer de próstata la activación de Raf/Mek/Erk promueve el arresto del ciclo celular, a diferencia de lo observado en otros modelos de estudio del cáncer (McCubrey y col., 2007). Por este motivo, estos autores proponen que la activación de la vía Ras/Raf/Mek/Erk sería favorable para el buen progreso de la enfermedad (McCubrey y col., 2007).

Por otro lado, se comenzó a estudiar la vía de PI3K/Akt en los tumores IBH-4 luego de los tratamientos con los compuestos adrenérgicos. Esta vía de señalización está desregulada en varios tipos de cáncer humano y por este motivo se ha convertido en un importante blanco terapéutico (Dillon y Muller, 2010, Dillon y col., 2009, Dillon y col., 2007).

La vía de PI3K/Akt está involucrada en procesos celulares tales como crecimiento, proliferación, supervivencia, migración (Dillon y col., 2009, Franke, 2008, Dillon y col., 2007). Por este motivo se evaluó pAkt/Akt en el sitio de fosforilación de la serina 473 (este es el sitio de mTOR) en muestras provenientes del tumor IBH-4 luego de los respectivos tratamientos con los compuestos adrenérgicos. En este tumor, se observó que el agonista β_2 salbutamol, el antagonista α_2 rauwolscina y el antagonista β propanolol provocaron una disminución de la fosforilación con respecto al control. De todas formas en este modelo en particular, esta vía no parecería ser tan importante en la regulación del crecimiento celular como la vía de Erk1/2.

La regulación de Akt por receptores acoplados a proteína G sería a través las subunidades $\beta\gamma$, la posterior activación de PI3K y la fosforilación de Akt por PDK1 en uno de los sitios específicos de fosforilación (Berna y col., 2009, Murga y col., 2000, Murga y col., 1998).

Resumiendo, en el presente trabajo se determinó por ensayos de *Western blot* que las vías de Erk1/2 y PI3K/Akt estarían siendo moduladas por los compuestos adrenérgicos, afectando negativamente el crecimiento tumoral.

Rol de compuestos adrenérgicos en la migración de células tumorales mamarias humanas

El desarrollo de metástasis es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer. En el caso de tumores sólidos, el 90% de las muertes se deben al desarrollo de metástasis en sitios lejanos al tumor primario (Nguyen y Massague, 2007, Nguyen y *col.*, 2009).

La progresión tumoral hacia la metástasis siempre ha sido descrita como un proceso de múltiples etapas, en las cuales las células tumorales se propagan desde el tumor primario colonizando órganos distantes (Nguyen y *col.*, 2009). La capacidad de invasión y metástasis permite a las células tumorales escapar de la masa tumoral primaria e instalarse en nuevos terrenos en donde el espacio y los nutrientes no son limitantes (Hanahan y Weinberg, 2000, Hanahan y Weinberg, 2011). El desarrollo de metástasis es un proceso excesivamente complejo, el cual ocurre en etapas secuenciales que incluyen la invasión de tejidos adyacentes, la intravasación, el transporte a través del sistema circulatorio, la extravasación luego de la llegada al órgano blanco y el crecimiento en el sitio de metástasis (Mehlen y Puisieux, 2006). Cada uno de los pasos en esta cascada estaría mediado por una variedad de genes metastáticos. Los prerequisites de las células potencialmente metastáticas son varios: capacidad proliferativa ilimitada, evasión de las limitaciones del ambiente, atracción de vasos sanguíneos y adquisición de la capacidad migratoria (Nguyen y Massague, 2007). La inestabilidad genética de los tumores y los cambios epigenéticos permiten que las células adquieran estas funciones mientras que el tumor está desarrollándose. A medida que el tumor crece, deberá superar los cambios ambientales, incluyendo la citotoxicidad inmunitaria, la baja presión de oxígeno y un microambiente con alta acidez. Todas estas funciones adquiridas durante el desarrollo local del tumor deben permanecer activas para favorecer la emergencia de células metastáticas (Nguyen y Massague, 2007).

Específicamente, los experimentos del presente trabajo de tesis se realizaron con el objetivo de estudiar la migración celular, siendo de particular interés el estudio de factores que regulan este proceso (Entschladen y *col.*, 2005a).

Las células tumorales poseen un amplio espectro de mecanismos de migración e invasión, los cuales incluyen estrategias colectivas e individuales y utilizan los mismos mecanismos que las células normales en procesos fisiológicos para moverse dentro de los tejidos (morfogénesis embrionaria, cicatrización, tráfico de células inmunes) (Friedl

y Wolf, 2003). Para migrar, el cuerpo celular debe modificar su forma y rigidez de manera de interactuar con las estructuras tisulares que lo rodean. La matriz extracelular provee el sustrato y a su vez actúa como barrera para el avance de la célula migratoria. La migración a través de un tejido es un ciclo continuo de pasos interdependientes: polarización celular y elongación, contracción del cuerpo celular y generación de la fuerza de tracción (Friedl y Wolf, 2003).

Por otro lado, existe un amplio espectro de métodos disponibles para el estudio del proceso migratorio *in vitro*, desde los simples ensayos de migración en 2 dimensiones hasta los estudios altamente especializados en 3 dimensiones (Entschladen y col., 2005b). La forma más sencilla de estudiar este proceso es sembrando las células en placas de cultivo (ya sea en presencia o ausencia de un recubrimiento de colágeno, fibronectina, laminina, ácido hialurónico o algún otro componente de la matriz extracelular) y realizando una herida en la monocapa (ensayo de herida en monocapa) (Palm y col., 2005). Luego se analiza el cierre de la herida comparando varias condiciones experimentales. El tiempo de estos ensayos es de 3 a 24 horas, dependiendo del tipo celular utilizado. También existen los ensayos de migración con insertos, en los cuales las células deben migrar a través de una membrana con poros de diámetro definido (3-8 μ m). Además, estas membranas pueden ser recubiertas con componentes de matriz extracelular y/o monocapas de células endoteliales o epiteliales pulmonares, y sólo logran atravesarla las células capaces de digerir dicho recubrimiento o de atravesar las barreras celulares (Entschladen y col., 2005b, Palm y col., 2005). Por último, los ensayos en 3 dimensiones son los más adecuados para estudiar el proceso de migración *per se* debido a que las células se encuentran inmersas en una matriz, generalmente formada por componentes de la matriz extracelular siendo el más utilizado el colágeno tipo I (Entschladen y col., 2005b, Wolf y col., 2009). El método se basa en el seguimiento de la migración celular a través de video-microscopía en tiempo real, teniendo la ventaja de poder monitorear el proceso por tiempos largos (hasta 15hs). A partir de los videos obtenidos se obtienen parámetros como velocidad de migración, frecuencia y duración de pausas antes del movimiento celular y también se puede estudiar el camino delineado por las células (Entschladen y col., 2005b, Palm y col., 2005, Niggemann y col., 2004). Esta última técnica fue la utilizada para la realización de los ensayos de migración en gels de colágeno de la presente tesis.

Con respecto a los factores que intervienen en la migración celular, existe una gran variedad de antecedentes sobre la influencia de las catecolaminas endógenas en la

migración de células tumorales. Por ejemplo, fue descrito por Entschladen y colaboradores un efecto promotor de la migración celular generado por la norepinefrina en las líneas tumorales de próstata humana PC3 y de mama humana MDA-MB-468 (Lang y col., 2004). Además, el mismo grupo observó un aumento en la migración de las células de carcinoma de colon humano SW-480 cuando eran incubadas con norepinefrina (Masur y col., 2001). En todos estos trabajos, el grupo de Entschladen propone a los receptores β_2 -adrenérgicos como mediadores del aumento en la migración, debido a la reversión del efecto en presencia de antagonistas específicos de este receptor (ICI 118,551 y propanolol). Esta reversión no se observaba cuando se utilizaba un antagonista del RA- β_1 (atenolol) (Masur y col., 2001, Lang y col., 2004).

Estos mismos hallazgos fueron descritos por Sood y colaboradores utilizando un modelo de cáncer de ovario para estudiar el potencial de invasión *in vitro* de tres líneas tumorales de ovario humano (SKOV3, EG y 222) luego de la incubación con norepinefrina y epinefrina (Sood y col., 2006). También notaron que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos provocaba una reversión del efecto generado en la migración por las catecolaminas. Asimismo, el tratamiento con epinefrina y norepinefrina provocaba un aumento en la liberación de las metaloproteasas MMP2 y MMP9, confirmando su acción sobre el aumento del potencial invasivo de las células ováricas (Sood y col., 2006).

En un modelo *in vitro* de cáncer pancreático, los receptores β -adrenérgicos también fueron propuestos como los mediadores de la acción pro-migratoria de la norepinefrina (Guo y col., 2009). En este trabajo, la respuesta observada fue dosis dependiente y la norepinefrina, al igual que en las células tumorales de ovario nombradas anteriormente, provocó un aumento en la expresión de MMP2, MMP9 y VEGF. Todos estos efectos fueron revertidos por la presencia de un antagonista β (propanolol) (Guo y col., 2009).

En nuestro modelo, las catecolaminas epinefrina y norepinefrina provocaron efectos opuestos en las líneas celulares estudiadas. En las células IBH-6 se observó un aumento de la migración celular luego del tratamiento con epinefrina, mientras que con la norepinefrina solo se detectó una mayor tendencia migratoria pero los resultados no fueron significativos. Por el contrario, en las células MDA-MB-231 ambos agonistas endógenos provocaron una disminución muy significativa de la migración. Un efecto similar fue descrito en las células humanas de carcinoma de ovario ES-2, en donde la

norepinefrina provocaba una disminución de la tasa migratoria a través de la activación de la proteína EPAC (Bastian y *col.*, 2009).

Además, al realizar los experimentos con el agonista β_2 salbutamol se observó en ambas líneas celulares una menor tasa migratoria, lo cual indicaría que los RA- β_2 serían los responsables de mediar este efecto a diferencia de lo descrito por otros grupos de investigación en trabajos citados anteriormente. Se sospecha que la discrepancia obtenida entre las dos líneas celulares utilizadas en la tasa migratoria en presencia de los agonistas endógenos, se debe a la expresión diferencial de los subtipos de receptores adrenérgicos. Las células MDA-MB-231 expresan alta cantidad de receptores β_2 (Draoui y *col.*, 1991). Por el contrario en las células IBH-6, el efecto provocado por la epinefrina, podría estar mediado por los RA- α_1 , no pudiéndose descartar esta posibilidad ya que no se utilizaron compuestos específicos para este subtipo de receptor. También podría tratarse de alguna regulación indirecta.

Por otro lado, la disminución de la migración mediada por los RA- β_2 también fue descrita en células de la piel (queratinocitos) en el proceso de cicatrización. En este modelo experimental la activación de los RA- β por el agonista isoproterenol provocó una disminución de la migración celular, siendo una respuesta dosis dependiente (Chen y *col.*, 2002, Pullar y *col.*, 2003, Pullar y *col.*, 2006). En un trabajo recientemente publicado, se demostró que la epinefrina juega un papel importante en el proceso de cicatrización actuando en queratinocitos a través de RA- β_2 , influyendo negativamente en la migración (Sivamani y *col.*, 2009). En este trabajo se utiliza un modelo de quemaduras *ex vivo* con piel humana y luego corroboran los resultados utilizando un modelo murino de quemaduras *in vivo*. Los autores proponen que el estrés podría influenciar el proceso global de cicatrización (Sivamani y *col.*, 2009).

De todas formas, se han publicado resultados contrapuestos con respecto al efecto de los agonistas β -adrenérgicos. En fibroblastos dérmicos humanos, los RA- β_2 estarían asociados a un incremento de la migración y de la proliferación celular (Pullar y Isseroff, 2006). Entonces, es relevante a la hora de sacar conclusiones conocer el modelo particular que se está estudiando.

Los resultados obtenidos al utilizar el antagonista β -adrenérgico propanolol en ausencia del agonista mostraron el mismo efecto que el salbutamol. Previamente se discutió el efecto agonista que puede poseer el propanolol *per se*. Este efecto agonista podría ocurrir principalmente a nivel transcripcional o debido al descubrimiento de múltiples

sitios de afinidad para estos RA (Baker y *col.*, 2003, Taira y *col.*, 2008). Entonces, no se puede descartar un efecto agonista provocado por un compuesto clásicamente llamado antagonista, cuando ambos fueron analizados de manera independiente y provocan exactamente el mismo efecto sobre la migración celular.

Los resultados obtenidos en las líneas IBH-6 y MDA-MB-231 con el antagonista α_2 rauwolscina concuerdan con los resultados previos del laboratorio. Este antagonista α_2 se comporta como un agonista inverso en modelos humanos y murinos de cáncer de mama, provocando una disminución del crecimiento tumoral mientras que los agonistas α_2 ejercen el efecto opuesto (Bruzzone y *col.*, 2008). Además, existen trabajos afirmando que el bloqueo de los RA- α_2 provoca una disminución de la migración celular en células inmunitarias (Romana-Souza y *col.*, 2009). En la línea tumoral Caco2 (proveniente de un carcinoma de colon humano) la activación de los RA- α_{2A} estaría involucrada en la regeneración intestinal, ya que el bloqueo de los mismos con antagonistas α_2 provoca una disminución de la migración celular (Buffin-Meyer y *col.*, 2007). Por otro lado, el agonista α_2 clonidina provocó en ambas líneas celulares disminución de la tasa migratoria. Este compuesto en modelos *in vivo* de cáncer de mama provoca un aumento del crecimiento tumoral, mientras que *in vitro* genera un aumento en la proliferación. Por estos datos previos, se cree que la disminución en la migración se debe a que las células están en división mientras que la migración supone una activación especial de proteínas, cambios en el citoesqueleto, aumento de la capacidad invasiva, expresión diferencial de genes, siendo poco probable que ambos procesos ocurran en el mismo momento (Evdokimova y *col.*, 2009).

Cuando se realizaron los ensayos de migración con los análogos de AMPc, el objetivo fue estudiar el efecto de este segundo mensajero sobre el potencial migratorio, sabiendo que los RA al activarse aumentan o disminuyen los niveles de AMPc según la proteína G a la cual están acoplados (G α_i , G α_s). Los RA- α_2 están acoplados a proteínas Gi/G0 y su unión a ligandos provoca una disminución en los niveles intracelulares de AMPc (Malbon y *col.*, 2001). Por el contrario, los RA- β están asociados típicamente a proteicas Gs, provocando un aumento en los niveles de AMPc en presencia de un agonista (Evans y *col.*, 2010, Kobilka, 2007, Marinissen y Gutkind, 2001).

Al utilizar el análogo de AMPc 8-Br-AMPc, el cual es capaz de activar a la PKA y a EPAC, las células IBH-6 disminuyeron la tasa migratoria, al igual que cuando fueron tratadas con el agonista salbutamol. Luego, cuando se utilizaron los análogos

específicos activadores de PKA (6Bnz) y de EPAC (8CPT) se obtuvieron resultados opuestos. El análogo activador de PKA provocó una disminución en la migración celular, lo cual estaría indicando que el agonista salbutamol provoca la disminución de la migración celular mediante un mecanismo dependiente de PKA. Por el contrario, el análogo activador de EPAC, generó un aumento en la migración celular. Este resultado concuerda con los obtenidos por *Western blot* a partir de ensayos *in vitro*, en donde la estimulación con este mismo compuesto (8CPT) provoca un aumento en la fosforilación de Erk (se observó una tendencia aunque los resultados no fueron significativos). Entonces, el resultado global parecería estar mediado por el aumento de AMPc y la activación de la vía de señalización de PKA, disminuyendo la tasa migratoria las células IBH-6. Con esta afirmación, no se está rechazando la posible activación de la vía de señalización de la proteína EPAC, pero en el resultado global parecería primar la acción de PKA.

Por otro lado, en la línea MDA-MB-231 los resultados de los experimentos con los análogos de AMPc concuerdan con los obtenidos tanto con los agonistas naturales (epinefrina y norepinefrina) como con el agonista β salbutamol. En estas células parecería predominar el efecto β -adrenérgico y tanto la vía de señalización de PKA como de EPAC estarían involucradas en la disminución de la migración. Al parecer el AMPc es una molécula clave en la regulación de la migración. De todas formas, la menor tasa migratoria fue observada con el análogo activador de EPAC (8CPT).

En la bibliografía existe mucha información sobre la importancia de las proteínas EPAC y PKA en la migración celular. Particularmente, fue descripto que la proteína EPAC puede activar a Rap1 y aumentar la adhesión a fibras de fibronectina de la matriz extracelular, en un proceso mediado por integrinas (Rangarajan y *col.*, 2003, Bos, 2006, Bos y *col.*, 2003). Estos hallazgos fueron realizados en un modelo de carcinoma de ovario humano, en el cual además de comprobar que la activación de EPAC generaba un aumento en la adhesión celular, se propuso una asociación entre la vía de EPAC y la activación de los RA- β_2 . Este mismo hecho podría estar ocurriendo en las células MDA-MB-231 y por este motivo se observaría una disminución en la migración celular cuando las células son tratadas con un análogo activador de EPAC.

De todas formas, no es el único trabajo publicado que involucra a la proteína EPAC en la disminución de la migración. En el año 2008 se reportó que la activación de Rap1 por acción del AMPc (a través de EPAC) resultaba en una inhibición de la migración

inducida por TGF β y HGF, provocando cambios en la dinámica de las adhesiones focales (Lyle y *col.*, 2008). Asimismo, el grupo de Entschladen describió el mismo efecto en las células tumorales de ovario ES-2, observando la misma respuesta al tratar a las células con norepinefrina, en parte mediada por la vía de señalización de EPAC a partir del aumento de AMPc asociado a la activación de los RA- β_2 (Bastian y *col.*, 2009). Por último, en células humanas de cáncer de próstata (PC-3 y DU145) el análogo activador de EPAC provocaba cambios en el citoesqueleto, alterando su integridad, reduciendo la síntesis de ADN y la migración e inhibiendo las vías de señalización de MAPK y RhoA (Grandoch y *col.*, 2009).

Por el contrario, al igual que en las células IBH-6, en un modelo de melanoma humano la activación específica de EPAC también causó un incremento en la tasa migratoria (Baljinnyam y *col.*, 2010, Baljinnyam y *col.*, 2009). De todas formas en la línea IBH-6, cuando se utiliza un análogo sintético de AMPc capaz de activar tanto a PKA como a EPAC (8-Br-AMPc) se observa una disminución de la migración, lo cual estaría indicando que el efecto neto (mediado por PKA y EPAC) es restringir la tasa migratoria, muy probablemente debido a la modulación producida por la activación de PKA.

Luego, al detectar que la tasa de migración espontánea en ambas líneas celulares era muy alta, se realizaron una serie de experimentos con el motivo de elucidar qué vías de señalización podían estar activas constitutivamente y en relación con la migración celular. Inicialmente se pensó que las células podían ser secretoras de IL-8 y que esta citoquina actuando de forma parácrina/autocrina estaba estimulando la migración celular. Existen varios reportes sobre la secreción de IL-8 por parte de células tumorales y su influencia en el establecimiento de metástasis (Inoue y *col.*, 2000, Singh y *col.*, 2006, Ginestier y *col.*, 2010, Freund y *col.*, 2003, Snoussi y *col.*, 2010). También existen análisis de correlación entre los niveles de IL-6, IL-8 e IL-10 en suero de pacientes con cáncer de mama y la progresión de la enfermedad (Kozlowski y *col.*, 2003). En un trabajo recientemente publicado, se logró la depleción de la población de células progenitoras tumorales (*cancer stem cells*) mediante el uso de un anticuerpo bloqueante del receptor de IL-8, logrando un retardo en el crecimiento tumoral y una reducción en el número de metástasis en modelos *in vivo* de cáncer de mama humano (Ginestier y *col.*, 2010).

La IL-8 derivada del tumor tiene la capacidad de generar cambios profundos en el microambiente tumoral, desde el aumento de la proliferación y supervivencia de las células tumorales a partir de mecanismos autocrinos hasta la activación de células endoteliales en la vasculatura tumoral, promoviendo la neoangiogénesis (Waugh y Wilson, 2008).

En particular en nuestro trabajo, mediante el bloqueo del receptor del receptor de IL-8 con un anticuerpo específico (anti-CXCR1) se logró frenar parcialmente la alta migración espontánea de las células IBH-6, mientras que en la línea MDA-MB-231 el anticuerpo bloqueante no causó ningún efecto. Esto significa que parte de la alta migración espontánea en la línea IBH-6 se debe a la secreción de IL-8, lo cual se va a corroborar en un futuro próximo mediante la técnica de Elisa. Por el contrario, las células MDA-MB-231 no respondieron al bloqueo del receptor CXCR1. Sin embargo, no puede descartarse que estén sintetizando IL-8 ya que no se realizó la medición de esta citoquina en los correspondientes sobrenadantes.

Con respecto a la relación entre las catecolaminas y la IL-8, existe un trabajo del año 2009 en el cual utilizan un modelo de melanoma *in vitro* y la norepinefrina es capaz de promover a través de los RA- β la síntesis de VEGF, IL-8 e IL-6, aumentando la agresividad de las células utilizadas (Yang y col., 2009). También se asoció la activación de los receptores β -adrenérgicos con el aumento de síntesis y liberación de IL-8 en células epiteliales bronquiales transformadas (Linden, 1996).

Por otro lado, los receptores acoplados a proteínas G, además de activar o inhibir la adenilil ciclasa (las subunidad $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha i}$) poseen otras vías de señalización asociadas a las subunidades $\beta\gamma$. Las subunidades $\beta\gamma$ pueden activar a quinasas acopladas a proteínas G (GRK), las cuales activan a tirosinas quinasas (TK). Un blanco río abajo de las TK es la fosfolipasa C, la cual cataliza la ruptura de PIP2 en inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El segundo mensajero DAG es un activador de las proteínas quinasas C (PKC) y el IP3 genera la apertura de canales de calcio intracelulares (Entschladen y col., 2005a, McGarrigle y Huang, 2007). La PKC α es una molécula reguladora central en la migración de células tumorales y ha sido asociada como un marcador de agresividad en cáncer de mama humano (Lonne y col., 2010, Nabha y col., 2005).

Entonces, se quiso estudiar mediante el uso de inhibidores farmacológicos de proteínas quinasas y de la fosfolipasa C si estas vías de señalización estaban involucradas en la alta tasa de migración espontánea observada en las células IBH-6 y MDA-MB-231.

Cuando se utilizaron dos inhibidores de tirosinas quinasas (AG18 y PP2) se obtuvo una disminución en la migración de las células MDA-MB-231, lo cual estaría indicando que tanto la familia de las proteínas quinasas Src como la vía de señalización del receptor de EGF estarían activas constitutivamente. En la línea IBH-6 sólo se detectó un efecto inhibitorio de la migración con el compuesto PP2, implicando solamente a las tirosinas quinasas de la familia de Src en la migración espontánea de estas células.

Está ampliamente documentada la influencia de Src en cáncer de mama, tanto en la migración celular como en el establecimiento de metástasis (Balzer y *col.*, 2010). Actualmente se utiliza como una posible terapia molecular debido a la importancia que tiene en el crecimiento celular, angiogénesis, invasión y metástasis. Además, se ha descubierto que Src es capaz de activar a los osteoclastos aumentando la resorción ósea (Finn, 2008). Con respecto a la señalización a partir del receptor de EGF, también es muy importante su función en la determinación del pronóstico de la enfermedad, el establecimiento de metástasis y se han desarrollado una variedad de terapias para bloquear su funcionamiento (desde inhibidores de tirosinas quinasa hasta anticuerpos monoclonales) (Lurje y Lenz, 2009, Alvarez y *col.*, 2010, Browne y *col.*, 2009, Foley y *col.*, 2010, Earp y *col.*, 2003).

Por último, cuando se estudió la influencia de la fosfolipasa C (PLC) en las células IBH-6 y MDA-MB-231 se observó que esta vía también estaba activa constitutivamente, ya que al tratar a las células con un activador de la misma (3m3FBS) no se observaron cambios, mientras que al utilizar un inhibidor de PLC (U73122) la tasa migratoria disminuyó significativamente, afectando la morfología celular.

Es conocida la influencia de la actividad de la PKC en la regulación del citoesqueleto de F-actina (Larsson, 2006). Muchas de las moléculas blanco de esta quinasa juegan roles importantes en la adhesión celular, la polaridad, los contactos intercelulares y también la migración (Robert, 2010). Por este motivo, se corroboró la presencia de esta proteína mediante ensayos de inmunofluorescencia en ambas líneas celulares (IBH-6 y MDA-MB-231). Se detectaron los subtipos de PKC α , β , γ , y δ .

Ha sido descripto que la expresión aumentada de la PKC α genera el desarrollo de un fenotipo más agresivo de cáncer de mama (Lonne y *col.*, 2010) y este fenotipo se asocia

al desarrollo de resistencia frente a drogas citostáticas en las células MCF-7. Asimismo, en la línea MDA-MB-231 el silenciamiento de la PKC α provocó una disminución en la proliferación celular así como una disminución en la tasa migratoria en ensayos *in vitro* (Lonne y col., 2010). Con respecto a la PKC δ , este subtipo parecería estar implicado en la inducción de resistencia al tamoxifeno en líneas celulares de cáncer de mama *in vitro*. Por otro lado, la PKC δ también está descripta como una isoforma promotora de metástasis y de proliferación celular en modelos murinos de cáncer de mama (Alonso-Escolano y col., 2006, Mccracken y col., 2003, Nabha y col., 2005, Kiley y col., 1999). Las diversas isoformas de esta proteína quinasa son potenciales blancos para la terapia del cáncer de mama, siendo de gran importancia para el tratamiento de la enfermedad el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos (Mackay y Twelves, 2003).

Finalmente, luego de analizar cuidadosamente los resultados obtenidos en todos los ensayos de migración, quedó clara la influencia de los receptores adrenérgicos en la migración celular. Las catecolaminas endógenas mostraron un efecto promotor en la línea IBH-6, mientras que el agonista β salbutamol inhibió este parámetro. Por el contrario, en la línea MDA-MB-231 tanto los agonistas endógenos como el salbutamol provocaron una inhibición de la migración. De todas formas, ambos modelos presentaron una altísima tasa de migración espontánea, en parte por la activación constitutiva de la vía de señalización de PLC/PKC. Además, se supone que la línea IBH-6 estaría potenciando la migración espontánea mediante la liberación de IL-8. Entonces, se puede decir que los compuestos adrenérgicos cumplen un rol en la modulación de la migración en las líneas tumorales de mama humana utilizadas en la presente tesis.

Además de la importancia de estos resultados de migración celular para una posible utilización terapéutica de compuestos adrenérgicos, resaltan otro aspecto fundamental en la biología celular. La obtención de resultados opuestos en dos líneas celulares *in vitro*, destacan la importancia de no basar todos los estudios en un único modelo.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo de tesis demuestran que los agonistas β -adrenérgicos inhiben la proliferación de células de cáncer de mama y también el crecimiento tumoral en modelos experimentales de cáncer de mama humano. Cuando se estudiaron *in vitro* las vías de señalización involucradas, se obtuvieron resultados revelando que este efecto está probablemente mediado por la inhibición de la fosforilación de Erk1/2, y sería dependiente de PKA y no de EPAC. Además, se demostró que el efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral es mediado por los RA- β_2 , ya que el agonista isoproterenol y el agonista específico β_2 salbutamol provocaron el mismo efecto en todos los casos. Siempre se logró una reversión con el antagonista β -adrenérgico propanolol.

Asimismo, se demostró que el agonista β -adrenérgico isoproterenol y el agonista β_2 -adrenérgico salbutamol (utilizado actualmente en la clínica para el tratamiento de patologías del sistema respiratorio) son tan eficaces como el antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina, previamente descrito por nuestro grupo como un agonista inverso de los RA- α_2 .

Los experimentos de migración en geles de colágeno permitieron comprobar el importante rol de los compuestos adrenérgicos en la modulación de este fenómeno, necesario para el establecimiento de metástasis y la progresión del cáncer. Además, hay que resaltar la importancia de estudiar varios modelos experimentales, sabiendo que cada modelo tiene sus limitaciones y capacidad de respuesta diferencial.

Dado que los diferentes tratamientos disponibles para las pacientes con cáncer de mama provocan resistencia, es de gran relevancia clínica encontrar otros compuestos que eventualmente puedan ser utilizados como terapia adyuvante. Los compuestos adrenérgicos tienen como ventaja una muy baja toxicidad y actúan por mecanismos de acción diferentes a los habitualmente utilizados por la terapia hormonal y/o quimioterapéutica. Esta tesis brinda resultados prometedores en cuanto a la inhibición tanto de la proliferación celular como del crecimiento tumoral y comienza a explorar mecanismos de acción como apoptosis, proliferación y migración celular. Si bien aún quedan algunos aspectos importantes por analizar antes de pensar en ensayos clínicos para una posible terapia adyuvante para el cáncer de mama, (como por ejemplo el efecto de estos compuestos en modelos de metástasis y de angiogénesis), los resultados aquí

presentados representan un avance en la posibilidad de establecer nuevos tratamientos para los casos de resistencia a las terapias disponibles en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahlquist, R 1948. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*.
- Al-Wadei, HA, Al-Wadei, MH, Schuller, HM 2009. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. *Anticancer Drugs*, 20, 477-82.
- Albain, KS 2004. Adjuvant chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: a tale of three trials. *J.Natl.Cancer Inst.*, 96, 1801-1804.
- Alonso-Escolano, D, Medina, C, Cieslik, K, Radomski, A, Jurasz, P, Santos-Martinez, MJ, *et al.* 2006. Protein kinase C delta mediates platelet-induced breast cancer cell invasion. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 373-80.
- Alvarez, RH 2010. Present and future evolution of advanced breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*, 12 Suppl 2, S1.
- Alvarez, RH, Valero, V, Hortobagyi, GN 2010. Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 3366-79.
- Antoni, MH, Lechner, S, Diaz, A, Vargas, S, Holley, H, Phillips, K, *et al.* 2009. Cognitive behavioral stress management effects on psychosocial and physiological adaptation in women undergoing treatment for breast cancer. *Brain Behav Immun*, 23, 580-91.
- Antoni, MH, Lutgendorf, SK, Cole, SW, Dhabhar, FS, Sephton, SE, McDonald, PG, *et al.* 2006. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat.Rev.Cancer*, 6, 240-248.
- Audet, M, Bouvier, M 2008. Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure. *Nat Chem Biol*, 4, 397-403.
- Badino, GR, Novelli, A, Girardi, C, Di Carlo, F 1996. Evidence for functional beta-adrenoceptor subtypes in CG-5 breast cancer cell. *Pharmacol.Res.*, 33, 255-260.
- Baker, JG, Hall, IP, Hill, SJ 2003. Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol*, 64, 1357-69.

- Baljinnyam, E, De Lorenzo, MS, Xie, LH, Iwatsubo, M, Chen, S, Goydos, JS, *et al.* 2010. Exchange protein directly activated by cyclic AMP increases melanoma cell migration by a Ca²⁺-dependent mechanism. *Cancer Res*, 70, 5607-17.
- Baljinnyam, E, Iwatsubo, K, Kurotani, R, Wang, X, Ulucan, C, Iwatsubo, M, *et al.* 2009. Epac increases melanoma cell migration by a heparan sulfate-related mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297, C802-13.
- Balkwill, F, Charles, KA, Mantovani, A 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7, 211-7.
- Balzer, EM, Whipple, RA, Thompson, K, Boggs, AE, Slovic, J, Cho, EH, *et al.* 2010. c-Src differentially regulates the functions of microtentacles and invadopodia. *Oncogene*, 29, 6402-6408.
- Barisione, G, Baroffio, M, Crimi, E, Brusasco, V 2010. Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals*, 3, 1016-1044.
- Bastian, P, Balcarek, A, Altanis, C, Strell, C, Niggemann, B, Zaenker, KS, *et al.* 2009. The inhibitory effect of norepinephrine on the migration of ES-2 ovarian carcinoma cells involves a Rap1-dependent pathway. *Cancer Lett*, 274, 218-24.
- Beral, V 2003. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 362, 419-27.
- Berna, M, Tapia, J, Sancho, V, Thill, M, Pace, A, Hoffmann, K, *et al.* 2009. Gastrointestinal growth factors and hormones have divergent effects on Akt activation. *Cellular signalling*, 21, 622-638.
- Biglia, N, Defabiani, E, Ponzzone, R, Mariani, L, Marengo, D, Sismondi, P 2004. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer*, 11, 69-83.
- Bissell, MJ, Radisky, D 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, 1, 46-54.
- Boe, R, Gjertsen, BT, Doskeland, SO, Vintermyr, OK 1995. 8-Chloro-cAMP induces apoptotic cell death in a human mammary carcinoma cell (MCF-7) line. *Br.J Cancer*, 72, 1151-1159.

- Bos, JL 2006. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci*, 31, 680-6.
- Bos, JL, de Bruyn, K, Enserink, J, Kuiperij, B, Rangarajan, S, Rehmann, H, *et al.* 2003. The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem Soc Trans*, 31, 83-6.
- Brede, M, Philipp, M, Knaus, A, Muthig, V, Hein, L 2004. alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biol.Cell*, 96, 343-348.
- Browne, BC, O'Brien, N, Duffy, MJ, Crown, J, O'Donovan, N 2009. HER-2 signaling and inhibition in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 9, 419-38.
- Bruzzone, A. 2008. *Acción de compuestos alfa2-adrenérgicos sobre modelos de cáncer de mama*. Tesis Doctoral UBA.
- Bruzzone, A, Perez Piñero, C, Rojas, P, Romanato, M, Gass, H, Lanari, C, *et al.* 2010. α 2-Adrenoceptors enhance cell proliferation and mammary tumor growth acting through both the stroma and the tumor cells. *Current Cancer Drug Targets*.
- Bruzzone, A, Pinero, CP, Castillo, LF, Sarappa, MG, Rojas, P, Lanari, C, *et al.* 2008. Alpha(2)-Adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice. *Br J Pharmacol*, 155, 494-504.
- Bruzzone, A, Vanzulli, SI, Soldati, R, Giulianelli, S, Lanari, C, Luthy, IA 2009. Novel human breast cancer cell lines IBH-4, IBH-6, and IBH-7 growing in nude mice. *J Cell Physiol*, 219, 477-84.
- Buffin-Meyer, B, Crassous, PA, Delage, C, Denis, C, Schaak, S, Paris, H 2007. EGF receptor transactivation and PI3-kinase mediate stimulation of ERK by alpha(2A)-adrenoreceptor in intestinal epithelial cells: A role in wound healing. *Eur.J.Pharmacol.*, 574, 85-93.
- Campagnoli, C, Ambroggio, S, Lotano, MR, Peris, C 2009. Progestogen use in women approaching the menopause and breast cancer risk. *Maturitas*, 62, 338-42.
- Campbell, LL, Polyak, K 2007. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 6, 2332-2338.

- Carie, AE, Sebti, SM 2007. A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. *Oncogene*, 26, 3777-3788.
- Casey, PM, Cerhan, JR, Pruthi, S 2008. Oral contraceptive use and risk of breast cancer. *Mayo Clin Proc*, 83, 86-90; quiz 90-1.
- Cazzola, M, Matera, MG 2008. Novel long-acting bronchodilators for COPD and asthma. *Br J Pharmacol*, 155, 291-9.
- Clarke, R, Leonessa, F, Welch, JN, Skaar, TC 2001. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev*, 53, 25-71.
- Clevenger, CV, Furth, PA, Hankinson, SE, Schuler, LA 2003. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr.Rev.*, 24, 1-27.
- Cook, SJ, McCormick, F 1993. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, 262, 1069-72.
- Cussac, D, Schaak, S, Gales, C, Flordellis, C, Denis, C, Paris, H 2002. alpha(2B)-Adrenergic receptors activate MAPK and modulate proliferation of primary cultured proximal tubule cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 282, F943-F952.
- Charafe-Jauffret, E, Ginestier, C, Monville, F, Wicinski, J, Bertucci, F, Viens, P, *et al.* 2008. [Stem cells and epithelial cancers: the example of breast cancer]. *Ann Pathol*, 28 Spec No 1, S30-2.
- Charlton, SJ 2009. Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture. *Br J Pharmacol*, 158, 165-8.
- Chen, J, Bander, JA, Santore, TA, Chen, Y, Ram, PT, Smit, MJ, *et al.* 1998. Expression of Q227L-galphas in MCF-7 human breast cancer cells inhibits tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2648-52.
- Chen, J, Hoffman, BB, Isseroff, RR 2002. Beta-adrenergic receptor activation inhibits keratinocyte migration via a cyclic adenosine monophosphate-independent mechanism. *J Invest Dermatol*, 119, 1261-8.

Cherezov, V, Rosenbaum, DM, Hanson, MA, Rasmussen, SG, Thian, FS, Kobilka, TS, *et al.* 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318, 1258-65.

Chlebowski, RT, Hendrix, SL, Langer, RD, Stefanick, ML, Gass, M, Lane, D, *et al.* 2003. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial 34. *JAMA*, 289, 3243-3253.

Cho-Chung, YS, Clair, T, Bodwin, JS, Berghoffer, B 1981. Growth arrest and morphological change of human breast cancer cells by dibutyryl cyclic AMP and L-arginine. *Science*, 214, 77-79.

Daaka, Y, Luttrell, LM, Lefkowitz, RJ 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390, 88-91.

DeGraff, JL, Gurevich, VV, Benovic, JL 2002. The third intracellular loop of alpha 2-adrenergic receptors determines subtype specificity of arrestin interaction. *J Biol Chem*, 277, 43247-52.

den Heijer, M, Seynaeve, C, Vanheusden, K, Duivenvoorden, HJ, Bartels, CC, Menke-Pluymers, MB, *et al.* 2010a. Psychological distress in women at risk for hereditary breast cancer: the role of family communication and perceived social support. *Psychooncology*.

den Heijer, M, Seynaeve, C, Vanheusden, K, Duivenvoorden, HJ, Vos, J, Bartels, CC, *et al.* 2010b. The contribution of self-esteem and self-concept in psychological distress in women at risk of hereditary breast cancer. *Psychooncology*.

den Heijer, M, Vos, J, Seynaeve, C, Vanheusden, K, Duivenvoorden, HJ, Tilanus-Linthorst, M, *et al.* 2010c. The impact of social and personal resources on psychological distress in women at risk for hereditary breast cancer. *Psychooncology*.

Dhillon, AS, Hagan, S, Rath, O, Kolch, W 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26, 3279-90.

- Dillon, RL, Marcotte, R, Hennessy, BT, Woodgett, JR, Mills, GB, Muller, WJ 2009. Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res*, 69, 5057-64.
- Dillon, RL, Muller, WJ 2010. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res*, 70, 4260-4.
- Dillon, RL, White, DE, Muller, WJ 2007. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene*, 26, 1338-45.
- Dontu, G 2008. Breast cancer stem cell markers - the rocky road to clinical applications. *Breast Cancer Res*, 10, 110.
- Dowdy, S, Wearden, S 1983. *Statistics for research*, New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Dowsett, M, Martin, LA, Smith, I, Johnston, S 2005. Mechanisms of resistance to aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 95, 167-72.
- Draoui, A, Vandewalle, B, Hornez, L, Revillion, F, Lefebvre, J 1991. Beta-adrenergic receptors in human breast cancer: identification, characterization and correlation with progesterone and estradiol receptors. *Anticancer Res.*, 11, 677-680.
- Drell, TL, Joseph, J, Lang, K, Niggemann, B, Zaenker, KS, Entschladen, F 2003. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res.Treat.*, 80, 63-70.
- Earp, HS, 3rd, Calvo, BF, Sartor, CI 2003. The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 114, 315-33; discussion 333-4.
- Egeblad, M, Werb, Z 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 161-74.
- Entschladen, F, Drell, TL, Lang, K, Joseph, J, Zaenker, KS 2004. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol*, 5, 254-8.

- Entschladen, F, Drell, TLt, Lang, K, Joseph, J, Zaenker, KS 2005a. Neurotransmitters and chemokines regulate tumor cell migration: potential for a new pharmacological approach to inhibit invasion and metastasis development. *Curr Pharm Des*, 11, 403-11.
- Entschladen, F, Drell, TLt, Lang, K, Masur, K, Palm, D, Bastian, P, *et al.* 2005b. Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res*, 307, 418-26.
- Evans, BA, Sato, M, Sarwar, M, Hutchinson, DS, Summers, RJ 2010. Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*, 159, 1022-38.
- Evdokimova, V, Tognon, C, Ng, T, Sorensen, PH 2009. Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell Cycle*, 8, 2901-6.
- Fabris, VT, Sahores, A, Vanzulli, SI, Colombo, L, Molinolo, AA, Lanari, C, *et al.* 2010. Inoculated mammary carcinoma-associated fibroblasts: contribution to hormone independent tumor growth. *BMC Cancer*, 10, 293.
- Fackenthal, JD, Olopade, OI 2007. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*, 7, 937-48.
- Feigelson, HS, Teras, LR, Diver, WR, Tang, W, Patel, AV, Stevens, VL, *et al.* 2008. Genetic variation in candidate obesity genes ADRB2, ADRB3, GHRL, HSD11B1, IRS1, IRS2, and SHC1 and risk for breast cancer in the Cancer Prevention Study II. *Breast Cancer Res*, 10, R57.
- Ferlay, J, Shin, HR, Bray, F, Forman, D, Mathers, C, Parkin, DM 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-2917.
- Finn, R 2008. Targeting Src in breast cancer. *Ann Oncol*, 19, 1379 - 1386.
- Foley, J, Nickerson, NK, Nam, S, Allen, KT, Gilmore, JL, Nephew, KP, *et al.* 2010. EGFR signaling in breast cancer: bad to the bone. *Semin Cell Dev Biol*, 21, 951-60.
- Folkerd, EJ, Dowsett, M 2010. Influence of sex hormones on cancer progression. *J Clin Oncol*, 28, 4038-44.
- Franke, TF 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*, 27, 6473-88.

- Freund, A, Chauveau, C, Brouillet, J, Lucas, A, Lacroix, M, Licznar, A, *et al.* 2003. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene*, 22, 256 - 65.
- Friedl, P, Wolf, K 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3, 362-74.
- Friedl, P, Wolf, K 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, 188, 11-9.
- Ghanouni, P, Gryczynski, Z, Steenhuis, JJ, Lee, TW, Farrens, DL, Lakowicz, JR, *et al.* 2001. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 276, 24433-6.
- Ginestier, C, Liu, S, Diebel, ME, Korkaya, H, Luo, M, Brown, M, *et al.* 2010. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 485-497.
- Goldsmith, ZG, Dhanasekaran, DN 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26, 3122-42.
- Gordon, J, Panos, RJ 2010. Inhaled albuterol/salbutamol and ipratropium bromide and their combination in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6, 381-392.
- Gow, IF, Mitchell, E, Wait, M 2003. Adrenergic receptors in the bovine mammary artery. *Biochem Pharmacol*, 65, 1747-53.
- Grandoch, M, Rose, A, ter Braak, M, Jendrossek, V, Rubben, H, Fischer, JW, *et al.* 2009. Epac inhibits migration and proliferation of human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer*, 101, 2038-42.
- Granier, S, Kim, S, Shafer, AM, Ratnala, VR, Fung, JJ, Zare, RN, *et al.* 2007. Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J Biol Chem*, 282, 13895-905.
- Guo, K, Ma, Q, Wang, L, Hu, H, Li, J, Zhang, D, *et al.* 2009. Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncol Rep*, 22, 825-30.

- Haagenson, KK, Wu, GS 2010. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 143-9.
- Hammon, HM, Bruckmaier, RM, Honegger, UE, Blum, JW 1994. Distribution and density of alpha- and beta-adrenergic receptor binding sites in the bovine mammary gland. *J Dairy Res.*, 61, 47-57.
- Hanahan, D, Weinberg, R 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D, Weinberg, RA 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Hein, L, Kobilka, BK 1995. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology*, 34, 357-66.
- Hepler, JR, Gilman, AG 1992. G proteins. *Trends Biochem Sci*, 17, 383-7.
- Heppner, GH, Miller, FR, Shekhar, PM 2000. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2, 331-4.
- Ho, AM, Chen, S, Karmakar, MK 2005. Central apnoea after balanced general anaesthesia that included dexmedetomidine 1. *Br.J.Anaesth.*, 95, 773-775.
- Hofmeister, V, Schrama, D, Becker, JC 2008. Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother*, 57, 1-17.
- Houslay, MD, Baillie, GS 2003. The role of ERK2 docking and phosphorylation of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in mediating cross-talk between the cAMP and ERK signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, 31, 1186-90.
- Hulka, BS, Moorman, PG 2008. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*, 61, 203-13; discussion 213.
- Iaccarino, G, Ciccarelli, M, Sorriento, D, Galasso, G, Campanile, A, Santulli, G, *et al.* 2005. Ischemic neoangiogenesis enhanced by beta2-adrenergic receptor overexpression: a novel role for the endothelial adrenergic system. *Circ Res*, 97, 1182-9.

Inderwies, T, Pfaffl, MW, Bruckmaier, RM 2003a. Milking characteristics and their relation to adrenergic receptor mRNA expression and ligand binding in the mammary gland of dairy cows. *Domest. Anim Endocrinol.*, 25, 275-286.

Inderwies, T, Pfaffl, MW, Meyer, HH, Blum, JW, Bruckmaier, RM 2003b. Detection and quantification of mRNA expression of alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes in the mammary gland of dairy cows. *Domest. Anim Endocrinol.*, 24, 123-135.

Inderwies, T, Riedl, J, Kiossis, E, Bruckmaier, RM 2003c. Effects of alpha- and beta-adrenergic receptor stimulation and oxytocin receptor blockade on milking characteristics in dairy cows before and after removal of the teat sphincter. *J Dairy Res.*, 70, 289-292.

Inoue, K, Slaton, J, Kim, S, Perrotte, P, Eve, B, Bar-Eli, M, *et al.* 2000. IL-8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res*, 60, 2290 - 99.

Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life, S, National Research, C 1996. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Washington, D.C. , National Academy Press

Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life, SNR, Council 2010. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*, Washington, D.C. , National Academy Press.

Jadhav, VM, Tolat, SN 2010. Dramatic response of propranolol in hemangioma: report of two cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 76, 691-4.

Jemal, A, Siegel, R, Ward, E, Hao, Y, Xu, J, Thun, MJ 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59, 225-49.

Johnson, M 2006. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 117, 18-24.

Jordan, VC, Lewis-Wambi, JS, Patel, RR, Kim, H, Ariazi, EA 2009. New hypotheses and opportunities in endocrine therapy: amplification of oestrogen-induced apoptosis. *Breast*, 18 Suppl 3, S10-7.

Jordan, VC, O'Malley, BW 2007. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J.Clin.Oncol.*, 25, 5815-5824.

Joyce, JA, Pollard, JW 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9, 239-52.

Karkoulias, G, Mastrogianni, O, Lymperopoulos, A, Paris, H, Flordellis, C 2006. Alpha(2)-Adrenergic receptors activate MAPK and Akt through a pathway involving arachidonic acid metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase, matrix metalloproteinase activation and subtype-specific transactivation of EGFR. *Cell Signal.*, 18 729-739.

Karkoulias, G, Mastrogianni, O, Papathanasopoulos, P, Paris, H, Flordellis, C 2007. Alpha(2)-Adrenergic receptors activate cyclic AMP-response element-binding protein through arachidonic acid metabolism and protein kinase A in a subtype-specific manner. *J.Neurochem.*, 103, 882-895.

Kass, L, Durando, M, Ramos, JG, Varayoud, J, Powell, CE, Luque, EH, *et al.* 2004. Association of increased estrogen receptor beta2 expression with parity-induced alterations in the rat mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 91, 29-39.

Kazani, S, Israel, E 2010. Long-acting beta-agonists and inhaled corticosteroids: is the whole greater than the sum of its parts? *J Allergy Clin Immunol*, 125, 357-8.

Kiley, SC, Clark, KJ, Goodnough, M, Welch, DR, Jaken, S 1999. Protein kinase C delta involvement in mammary tumor cell metastasis. *Cancer Res*, 59, 3230-8.

Kim, EK, Choi, EJ 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 396-405.

Kim, MO, Na, SI, Lee, MY, Heo, JS, Han, HJ 2008. Epinephrine increases DNA synthesis via ERK1/2s through cAMP, Ca²⁺/PKC, and PI3K/Akt signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104, 1407-1420.

Knauer, M, Cardoso, F, Wesseling, J, Bedard, PL, Linn, SC, Rutgers, EJ, *et al.* 2010. Identification of a low-risk subgroup of HER-2-positive breast cancer by the 70-gene prognosis signature. *Br J Cancer*, 103, 1788-93.

- Knobf, MT 2006. The influence of endocrine effects of adjuvant therapy on quality of life outcomes in younger breast cancer survivors. *Oncologist*, 11, 96-110.
- Kobilka, B, Schertler, GF 2008. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 79-83.
- Kobilka, BK 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 794-807.
- Kozlowski, L, Zakrzewska, I, Tokajuk, P, Wojtukiewicz, MZ 2003. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst*, 48, 82-4.
- Krause, S, Maffini, MV, Soto, AM, Sonnenschein, C 2010. The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures. *BMC Cancer*, 10, 263.
- Krishna, M, Narang, H 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3525 - 3544.
- Kurebayashi, J 2005. Resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56 Suppl 1, 39-46.
- Kurian, AW, Fish, K, Shema, SJ, Clarke, CA 2010. Lifetime risks of specific breast cancer subtypes among women in four racial/ethnic groups. *Breast Cancer Res*, 12, R99.
- Lanari, C, Lamb, C, Fabris, V, Helguero, L, Soldati, R, Bottino, M, *et al.* 2009. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*.
- Landen, CN, Lin, YG, Armaiz Pena, GN, Das, PD, Arevalo, JM, Kamat, AA, *et al.* 2007. Neuroendocrine Modulation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 67, 10389-10396.
- Lands, AM 1951. Sympathetic receptor action. *Am J Physiol*, 169(1), 11-21.

- Lang, K, Drell, TLt, Lindecke, A, Niggemann, B, Kaltschmidt, C, Zaenker, KS, *et al.* 2004. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer*, 112, 231-8.
- Lang, K, Niggemann, B, Zanker, KS, Entschladen, F 2002. Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop. *Int J Cancer*, 99, 673-80.
- Lanigan, F, O'Connor, D, Martin, F, Gallagher, WM 2007. Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci*, 64, 3159-84.
- Larsson, C 2006. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal*, 18, 276-84.
- Li, H, Fan, X, Houghton, J 2007. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*, 101, 805-15.
- Li, X, Huang, Y, Jiang, J, Frank, SJ 2008. ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cell Signal*, 20, 2145-55.
- Linden, A 1996. Increased interleukin-8 release by beta-adrenoceptor activation in human transformed bronchial epithelial cells. *Br J Pharmacol*, 119, 402-6.
- Liu, X, Wu, WK, Yu, L, Sung, JJ, Srivastava, G, Zhang, ST, *et al.* 2008. Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via beta-adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem*, 105, 53-60.
- Lonne, GK, Cornmark, L, Zahirovic, IO, Landberg, G, Jirstrom, K, Larsson, C 2010. PKCalpha expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Mol Cancer*, 9, 76.
- Lurje, G, Lenz, HJ 2009. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*, 77, 400-10.
- Lutgendorf, SK, Cole, S, Costanzo, E, Bradley, S, Coffin, J, Jabbari, S, *et al.* 2003. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 9, 4514-21.

Lutgendorf, SK, Johnsen, EL, Cooper, B, Anderson, B, Sorosky, JI, Buller, RE, *et al.* 2002. Vascular endothelial growth factor and social support in patients with ovarian carcinoma. *Cancer*, 95, 808-15.

Luthy, IA, Bruzzone, A, Pinero, CP, Castillo, LF, Chiesa, IJ, Vazquez, SM, *et al.* 2009. Adrenoceptors: non conventional target for breast cancer? *Curr Med Chem*, 16, 1850-62.

Lyle, KS, Raaijmakers, JH, Bruinsma, W, Bos, JL, de Rooij, J 2008. cAMP-induced Epac-Rap activation inhibits epithelial cell migration by modulating focal adhesion and leading edge dynamics. *Cell Signal*, 20, 1104-16.

Mackay, HJ, Twelves, CJ 2003. Protein kinase C: a target for anticancer drugs? *Endocr Relat Cancer*, 10, 389-96.

Malbon, CC, Wang, H, Macmillan Publishers Ltd, NPG 2001. Adrenergic Receptors. . *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*

Marchetti, B, Fortier, MA, Poyet, P, Follea, N, Pelletier, G, Labrie, F 1990. Beta-adrenergic receptors in the rat mammary gland during pregnancy and lactation: characterization, distribution, and coupling to adenylate cyclase. *Endocrinology*, 126, 565-574.

Marchetti, B, Labrie, F 1990. Hormonal regulation of beta-adrenergic receptors in the rat mammary gland during the estrous cycle and lactation: role of sex steroids and prolactin. *Endocrinology*, 126, 575-581.

Marchetti, B, Spinola, PG, Pelletier, G, Labrie, F 1991. A potential role for catecholamines in the development and progression of carcinogen-induced mammary tumors: hormonal control of beta-adrenergic receptors and correlation with tumor growth. *J Steroid Biochem.Mol.Biol*, 38, 307-320.

Marchetti, B, Spinola, PG, Plante, M, Poyet, P, Follea, N, Pelletier, G, *et al.* 1989. Beta-adrenergic receptors in DMBA-induced rat mammary tumors: correlation with progesterone receptor and tumor growth. *Breast Cancer Res.Treat.*, 13, 251-263.

Marinissen, MJ, Gutkind, JS 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 368-76.

- Martin, LJ, Minkin, S, Boyd, NF 2009. Hormone therapy, mammographic density, and breast cancer risk. *Maturitas*, 64, 20-6.
- Marusyk, A, Polyak, K 2010. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805, 105-17.
- Masur, K, Niggemann, B, Zanker, KS, Entschladen, F 2001. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res*, 61, 2866-9.
- May, L, Hill, S 2008. ERK phosphorylation: spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2013 - 2017.
- McCracken, MA, Miraglia, LJ, McKay, RA, Strobl, JS 2003. Protein kinase C delta is a prosurvival factor in human breast tumor cell lines. *Mol Cancer Ther*, 2, 273-81.
- McCubrey, J, Steelman, L, Chappell, W, Abrams, S, Wong, E, Chang, F, *et al.* 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1263 - 1284.
- McGarrigle, D, Huang, XY 2007. GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Sci STKE*, 2007, pe35.
- McGregor, BA, Antoni, MH 2009. Psychological intervention and health outcomes among women treated for breast cancer: a review of stress pathways and biological mediators. *Brain Behav Immun*, 23, 159-66.
- Mebratu, Y, Tesfaigzi, Y 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*, 8, 1168-75.
- Mehlen, P, Puisieux, A 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*, 6, 449-58.
- Mehrara, E. 2010. *Quantitative analysis of tumor growth and response to therapy*. Doctoral Thesis, Göteborg University.
- Meloche, S, Pouyssegur, J 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26, 3227-39.

- Michor, F, Polyak, K 2010. The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3, 1361-4.
- Mirzoeva, OK, Das, D, Heiser, LM, Bhattacharya, S, Siwak, D, Gendelman, R, *et al.* 2009. Basal Subtype and MAPK/ERK Kinase (MEK)-Phosphoinositide 3-Kinase Feedback Signaling Determine Susceptibility of Breast Cancer Cells to MEK Inhibition. *Cancer Research*, 69, 565-572.
- Mitchell, AJ, Chan, M, Bhatti, H, Halton, M, Grassi, L, Johansen, C, *et al.* 2011. Prevalence of depression, anxiety, and adjustment disorder in oncological, haematological, and palliative-care settings: a meta-analysis of 94 interview-based studies. *Lancet Oncol*, 12, 160-74.
- Mueck, AO, Seeger, H, Wallwiener, D 2004. Endogenous estradiol metabolism during treatment with oral contraceptives. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.*, 42, 160-164.
- Murga, C, Fukuhara, S, Gutkind, J 2000. A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 12069.
- Murga, C, Laguinge, L, Wetzker, R, Cuadrado, A, Gutkind, J 1998. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 19080.
- Nabha, SM, Glaros, S, Hong, M, Lykkesfeldt, AE, Schiff, R, Osborne, K, *et al.* 2005. Upregulation of PKC-delta contributes to antiestrogen resistance in mammary tumor cells. *Oncogene*, 24, 3166-76.
- Narod, SA 2010. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*, 7, 702-7.
- Nasir, A, Shackelford, RE, Anwar, F, Yeatman, TJ 2009. Genetic risk of breast cancer. *Minerva Endocrinol*, 34, 295-309.
- Navin, NE, Hicks, J 2010. Tracing the tumor lineage. *Mol Oncol*, 4, 267-83.
- Nguyen, DX, Bos, PD, Massague, J 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 9, 274-84.

- Nguyen, DX, Massague, J 2007. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, 8, 341-52.
- Nielsen, CK, Campbell, JI, Ohd, JF, Morgelin, M, Riesbeck, K, Landberg, G, *et al.* 2005. A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 65, 732-42.
- Niggemann, B, Drell, TLt, Joseph, J, Weidt, C, Lang, K, Zaenker, KS, *et al.* 2004. Tumor cell locomotion: differential dynamics of spontaneous and induced migration in a 3D collagen matrix. *Exp Cell Res*, 298, 178-87.
- Orimo, A, Gupta, PB, Sgroi, DC, Arenzana-Seisdedos, F, Delaunay, T, Naeem, R, *et al.* 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121, 335-48.
- Palm, D, Lang, K, Brandt, B, Zaenker, KS, Entschladen, F 2005. In vitro and in vivo imaging of cell migration: two interdependent methods to unravel metastasis formation. *Semin Cancer Biol*, 15, 396-404.
- Palm, D, Lang, K, Niggemann, B, Drell, TLt, Masur, K, Zaenker, KS, *et al.* 2006. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer*, 118, 2744-9.
- Parkin, DM 2004. International variation. *Oncogene*, 23, 6329-6340.
- Parkin, DM, Bray, F, Ferlay, J, Pisani, P 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*, 55, 74-108.
- Perez Piñero, C, Bruzzone, A, Sarappa, MG, Castillo, LF, Luthy, IA 2010. Involvement of alpha2- and beta2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. En revisión *Br J Pharmacol*.
- Pertovaara, A, Haapalinna, A, Sirvio, J, Virtanen, R 2005. Pharmacological Properties, Central Nervous System Effects, and Potential Therapeutic Applications of Atipamezole, a Selective alpha(2)-Adrenoceptor Antagonist 1. *CNS Drug Rev.*, 11, 273-288.
- Petersen, OW, Polyak, K 2010. Stem cells in the human breast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003160.

- Philipp, M, Brede, ME, Hadamek, K, Gessler, M, Lohse, MJ, Hein, L 2002. Placental alpha(2)-adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo. *Nat. Genet.*, 31, 311-315.
- Philipp, M, Hein, L 2004. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.*, 101, 65-74.
- Plummer, HK, III, Yu, Q, Cakir, Y, Schuller, HM 2004. Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines 1. *BMC.Cancer*, 4, 93.
- Polyak, K 2001. On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1552, 1-13.
- Polyak, K 2007. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*, 117, 3155-63.
- Polyak, K 2008. Is breast tumor progression really linear? *Clin Cancer Res*, 14, 339-41.
- Polyak, K, Hahn, WC 2006. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med*, 12, 296-300.
- Polyak, K, Kalluri, R 2010. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003244.
- Pullar, CE, Chen, J, Isseroff, RR 2003. PP2A activation by beta2-adrenergic receptor agonists: novel regulatory mechanism of keratinocyte migration. *J Biol Chem*, 278, 22555-62.
- Pullar, CE, Isseroff, RR 2006. The beta 2-adrenergic receptor activates pro-migratory and pro-proliferative pathways in dermal fibroblasts via divergent mechanisms. *J Cell Sci*, 119, 592-602.
- Pullar, CE, Manabat-Hidalgo, CG, Bolaji, RS, Isseroff, RR 2008. beta-Adrenergic receptor modulation of wound repair. *Pharmacol Res*, 58, 158-64.
- Pullar, CE, Rizzo, A, Isseroff, RR 2006. beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem*, 281, 21225-35.

- Raman, M, Chen, W, Cobb, MH 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26, 3100-12.
- Rangarajan, S, Enserink, JM, Kuiperij, HB, de Rooij, J, Price, LS, Schwede, F, *et al.* 2003. Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol*, 160, 487-93.
- Rasmussen, SG, Choi, HJ, Fung, JJ, Pardon, E, Casarosa, P, Chae, PS, *et al.* 2011. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature*, 469, 175-80.
- Rasmussen, SG, Choi, HJ, Rosenbaum, DM, Kobilka, TS, Thian, FS, Edwards, PC, *et al.* 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450, 383-7.
- Riggins, RB, Schrecengost, RS, Guerrero, MS, Bouton, AH 2007. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett*, 256, 1-24.
- Robert, J 2010. Cell signalling and cancer. *Bull Cancer*, 97, 1215-1222.
- Roberts, PJ, Der, CJ 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26, 3291-310.
- Roets, E, Peeters, G 1986. A comparison of the binding characteristics of the alpha 2-adrenoceptor antagonists 3H-yohimbine and 3H-rauwolscine in bovine teat muscles. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 279, 212-22.
- Roets, E, Peeters, G, Leysen, JE 1984. Identification of beta-adrenoceptors in bovine teat muscles by 3H-dihydroalprenolol binding. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 270, 203-14.
- Roets, E, Vandeputte-Van Messom, G, Peeters, G 1986. Relationship between milkability and adrenoceptor concentrations in teat tissue in primiparous cows. *J Dairy Sci*, 69, 3120-30.
- Romana-Souza, B, Santos, JS, Monte-Alto-Costa, A 2009. beta-1 and beta-2, but not alpha-1 and alpha-2, adrenoceptor blockade delays rat cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*, 17, 230-9.

- Rosenbaum, DM, Rasmussen, SG, Kobilka, BK 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459, 356-63.
- Russo, J, Hu, YF, Silva, ID, Russo, IH 2001a. Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microsc.Res.Tech.*, 52, 204-223.
- Russo, J, Lareef, H, Tahin, Q, Russo, IH 2002a. Pathways of carcinogenesis and prevention in the human breast. *Eur.J.Cancer*, 38 Suppl 6, S31-S32.
- Russo, J, Lareef, MH, Tahin, Q, Hu, YF, Slater, C, Ao, X, *et al.* 2002b. 17Beta-estradiol is carcinogenic in human breast epithelial cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 80, 149-162.
- Russo, J, Lynch, H, Russo, IH 2001b. Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer. *Breast J.*, 7, 278-291.
- Russo, J, Russo, IH 2004. Development of the human breast. *Maturitas*, 49, 2-15.
- Russo, J, Russo, IH 2008. Breast development, hormones and cancer. *Adv Exp Med Biol*, 630, 52-6.
- Russo, J, Snider, K, Pereira, JS, Russo, IH 2010. Estrogen induced breast cancer is the result in the disruption of the asymmetric cell division of the stem cell. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 1, 53-65.
- Russo, J, Tahin, Q, Lareef, MH, Hu, YF, Russo, IH 2002c. Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens. *Environ.Mol.Mutagen.*, 39, 254-263.
- Santen, R, Song, R, McPherson, R, Kumar, R, Adam, L, Jeng, M, *et al.* 2002. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 80, 239 - 256.
- Sastry, KSR, Karpova, Y, Prokopovich, S, Smith, AJ, Essau, B, Gersappe, A, *et al.* 2007. Epinephrine Protects Cancer Cells from Apoptosis via Activation of cAMP-dependent Protein Kinase and BAD Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 14094-14100.

Saunders, C, Limbird, LE 1999. Localization and trafficking of alpha2-adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *Pharmacol.Ther.*, 84, 193-205.

Schlessinger, J 2000. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211 - 225.

Schuller, HM, Al-Wadei, HA 2010. Neurotransmitter receptors as central regulators of pancreatic cancer. *Future Oncol*, 6, 221-8.

Shcherbakova, OG, Hurt, CM, Xiang, Y, Dell'Acqua, ML, Zhang, Q, Tsien, RW, *et al.* 2007. Organization of beta-adrenoceptor signaling compartments by sympathetic innervation of cardiac myocytes. *J Cell Biol*, 176, 521-33.

Shenoy, SK, Drake, MT, Nelson, CD, Houtz, DA, Xiao, K, Madabushi, S, *et al.* 2006. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 281, 1261-73.

Shipitsin, M, Campbell, LL, Argani, P, Weremowicz, S, Bloushtain-Qimron, N, Yao, J, *et al.* 2007. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 11, 259-73.

Singh, B, Berry, JA, Vincent, LE, Lucci, A 2006. Involvement of IL-8 in COX-2-mediated bone metastases from breast cancer. *J.Surg.Res.*, 134, 44-51.

Sivamani, R, Pullar, C, Manabat-Hidalgo, C, Roche, D, Carlsen, R, Greenhalgh, D, *et al.* 2009. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. *PLoS Med*, 6, e12.

Sloan, EK, Priceman, SJ, Cox, BF, Yu, S, Pimentel, MA, Tangkanangnukul, V, *et al.* 2010. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res*, 70, 7042-52.

Slotkin, TA, Zhang, J, Dancel, R, Garcia, SJ, Willis, C, Seidler, FJ 2000. Beta-adrenoceptor signaling and its control of cell replication in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.*, 60, 153-166.

Smith, ER, Cai, KQ, Smedberg, JL, Ribeiro, MM, Rula, ME, Slater, C, *et al.* 2010a. Nuclear Entry of Activated MAPK Is Restricted in Primary Ovarian and Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 5, e9295.

- Smith, FD, Langeberg, LK, Cellurale, C, Pawson, T, Morrison, DK, Davis, RJ, *et al.* 2010b. AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade. *Nat Cell Biol*, 12, 1242-9.
- Snoussi, K, Mahfoudh, W, Bouaouina, N, Fekih, M, Khairi, H, Helal, A, *et al.* 2010. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer*, 10, 283.
- Snoussi, K, Mahfoudh, W, Bouaouina, N, Helal, A, Chouchane, L 2006. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *Hum Immunol*, 67, 13 - 21.
- Soltoff, SP, Hedden, L 2010. Isoproterenol and cAMP block ERK phosphorylation and enhance [Ca²⁺]_i increases and oxygen consumption by muscarinic receptor stimulation in rat parotid and submandibular acinar cells. *J Biol Chem*, 285, 13337-48.
- Sood, AK, Armaiz-Pena, GN, Halder, J, Nick, AM, Stone, RL, Hu, W, *et al.* 2010. Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 1515-1523.
- Sood, AK, Bhatta, R, Kamat, AA, Landen, CN, Han, L, Thaker, PH, *et al.* 2006. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells 3. *Clin. Cancer Res.*, 12, 369-375.
- Stamp, G 2002. Breast Cancer Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group
- Stanford, C 2001. Adrenaline and Noradrenaline: Introduction. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* Nature Publishing Group.
- Stork, PJ 2002. ERK signaling: duration, duration, duration. *Cell Cycle*, 1, 315-7.
- Swaminathan, G, Varghese, B, Fuchs, SY 2008. Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13, 81-91.
- Taira, CA, Carranza, A, Mayer, M, Di Verniero, C, Opezzo, JA, Hocht, C 2008. Therapeutic implications of beta-adrenergic receptor pharmacodynamic properties. *Curr Clin Pharmacol*, 3, 174-84.

- Thaker, PH, Han, LY, Kamat, AA, Arevalo, JM, Takahashi, R, Lu, C, *et al.* 2006. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.*, 12, 939-944.
- Thaker, PH, Lutgendorf, SK, Sood, AK 2007. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle*, 6, 430-3.
- Thaker, PH, Sood, AK 2008. Neuroendocrine influences on cancer biology. *Semin Cancer Biol*, 18, 164-70.
- Tilan, J, Kitlinska, J 2010. Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. *J Oncol*, 2010, 539706.
- Turjanski, AG, Vaque, JP, Gutkind, JS 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, 26, 3240-53.
- Tworoger, SS, Hankinson, SE 2008. Prolactin and breast cancer etiology: an epidemiologic perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13, 41-53.
- Tyan, SW, Kuo, WH, Huang, CK, Pan, CC, Shew, JY, Chang, KJ, *et al.* 2011. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. *PLoS One*, 6, e15313.
- United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research, U 1998. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *Br J Cancer*, 77, 1-10.
- Urban, JD, Clarke, WP, von Zastrow, M, Nichols, DE, Kobilka, B, Weinstein, H, *et al.* 2007. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, 320, 1-13.
- Vandewalle, B, Revillion, F, Lefebvre, J 1990. Functional beta-adrenergic receptors in breast cancer cells. *J Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116, 303-306.
- Vargo-Gogola, T, Rosen, JM 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat.Rev.Cancer*, 7, 659-672.

Vazquez, SM. 2001. *Descripción, caracterización y regulación de receptores Alfa2-adrenérgicos en células tumorales y no tumorales de mama humana* Tesis Doctoral UBA.

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

Vazquez, SM, Mladovan, AG, Perez, C, Bruzzone, A, Baldi, A, Luthy, IA 2006. Human breast cell lines exhibit functional alpha(2)-adrenoceptors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* , 58, 50-61.

Vazquez, SM, Pignataro, O, Luthy, IA 1999. Alpha2-adrenergic effect on human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 55, 41-49.

Viniegra, M, Paolino, M, Arrossi, S 2010. *Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Informe final Julio 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales.* , Organización Panamericana de la Salud - OPS, 2010.

Violin, JD, DiPilato, LM, Yildirim, N, Elston, TC, Zhang, J, Lefkowitz, RJ 2008. beta2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *J Biol Chem*, 283, 2949-61.

Voss, MJ, Entschladen, F 2010. Tumor interactions with soluble factors and the nervous system. *Cell Commun Signal*, 8, 21.

Wang, JF, Min, JY, Hampton, TG, Amende, I, Yan, X, Malek, S, *et al.* 2008. Clozapine-induced myocarditis: role of catecholamines in a murine model. *Eur J Pharmacol*, 592, 123-7.

Warne, T, Moukhametzianov, R, Baker, JG, Nehme, R, Edwards, PC, Leslie, AG, *et al.* 2011. The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature*, 469, 241-4.

Waugh, DJ, Wilson, C 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 6735-41.

- Weigelt, B, Geyer, FC, Reis-Filho, JS 2010. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*, 4, 192-208.
- Wellnitz, O, Zurbriggen, A, Friis, RR, Blum, JW, Bruckmaier, RM 2001. Alpha1c- and beta2-adrenergic receptor mRNA distribution in the bovine mammary gland detected by competitive RT-PCR. *J Dairy Res.*, 68, 699-703.
- Whyte, J, Bergin, O, Bianchi, A, McNally, S, Martin, F 2009. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Research*, 11, 209.
- Wicha, MS, Liu, S, Dontu, G 2006. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*, 66, 1883-90; discussion 1895-6.
- Wolf, K, Alexander, S, Schacht, V, Coussens, LM, von Andrian, UH, van Rheenen, J, *et al.* 2009. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 931-41.
- Xiang, Y, Devic, E, Kobilka, B 2002a. The PDZ binding motif of the beta 1 adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 277, 33783-90.
- Xiang, Y, Rybin, VO, Steinberg, SF, Kobilka, B 2002b. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 277, 34280-6.
- Yang, EV, Kim, SJ, Donovan, EL, Chen, M, Gross, AC, Webster Marketon, JI, *et al.* 2009. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun*, 23, 267-75.
- Yang, EV, Sood, AK, Chen, M, Li, Y, Eubank, TD, Marsh, CB, *et al.* 2006. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.*, 66, 10357-10364.

Yilmaz, M, Christofori, G 2010. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Mol. Cancer Res.*, 8, 629-642.

Yuan, A, Li, Z, Li, X, Yi, S, Wang, S, Cai, Y, *et al.* 2010. The mitogenic effectors of isoproterenol in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*, 23, 151-7.

Zhang, D, Ma, QY, Hu, HT, Zhang, M 2010. beta2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NFkappaB and AP-1. *Cancer Biol Ther*, 10.

Zheng, M, Han, QD, Xiao, RP 2004. Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. *Sheng Li Xue Bao*, 56, 1-15.

Zhu, T, Gobeil, F, Vazquez-Tello, A, Leduc, M, Rihakova, L, Bossolasco, M, *et al.* 2006. Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol*, 84, 377-91.