Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Participación del factor de necrosis tumoral alfa en la proliferación de carcinomas mamarios

Rivas, Martín Alfredo

2010

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:
Rivas, Martín Alfredo. (2010). Participación del factor de necrosis tumoral alfa en la proliferación de carcinomas mamarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Rivas, Martín Alfredo. "Participación del factor de necrosis tumoral alfa en la proliferación de carcinomas mamarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA EN LA PROLIFERACIÓN DE CARCINOMAS MAMARIOS

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Martín Alfredo Rivas

Directora de Tesis: Dra. Roxana Schillaci
Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

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

Buenos Aires, Diciembre de 2010

RESUMEN

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA EN LA PROLIFERACIÓN DE CARCINOMAS MAMARIOS

RESUMEN

El factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) es una citoquina pro-inflamatoria implicada en promover el crecimiento de ciertos tipos de cánceres. En el presente trabajo de Tesis se exploraron los caminos de señalización intracelulares que llevan al crecimiento de las células de cáncer de mama inducido por TNFα y su interacción con el receptor tirosina quinasa tipo I, ErbB-2. Nuestros resultados indicaron que el TNFα, actuando a través del receptor de TNFα tipo 1 (TNFR1), indujo la activación de las quinasas activadas por mitógenos p42 y p44 (p42/p44 MAPK), la quinasa del amino terminal de c-jun (JNK) y la fosfatidilinositol 3-fosfato quinasa / Akt (PI3-K/Akt), la activación del factor de transcripción Factor Nuclear κB (NF-κB) y la proliferación celular. También comprobamos que la administración de TNFα *in vivo* indujo el crecimiento del tumor C4HD en ratones Balb/c y que el tratamiento con un inhibidor selectivo de NF-κB, Bay 11-7082, resultó en la regresión parcial de dicho tumor de mama. Asimismo, el Bay 11-7082 bloqueó la capacidad del TNFα de inducir el aumento de la proteína promotora del ciclo celular ciclina D1 y de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L. Un importante hallazgo fue demostrar que el TNFα indujo la transactivación de ErbB-2 en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2. En estas células, el TNFα activa a la tirosina quinasa c-Src, promueve la fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr877, y favorece la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3. Este último proceso lleva a la fosforilación de Akt, a la activación del factor de transcripción NF-κB, y al aumento en la expresión de ciclina D1. La presencia del inhibidor de ErbB-2, AG825, o de ARN cortos de interferencia (siRNA) contra ErbB-2, pero no la del anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab (Herceptin^{MR}) abolió la fosforilación de ErbB-2, la activación de NF-κB y la proliferación inducidas por TNFα. Nuestro trabajo revela que el TNFα es capaz de transactivar a ErbB-2 y utilizarlo como un intermediario en la generación de señales mitogénicas. Dado que el TNFα se encuentra presente en un alto porcentaje de cánceres de mama, nuestros hallazgos tendrían una gran importancia en la comprensión de la biología de tumores de mama que sobreexpresan ErbB-2 como así también en la elección del tratamiento al cual los pacientes son sometidos.

Palabras Clave:

Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNFα) – TNFR1/TNFR2 – ErbB-2 – Cáncer de mama – NF-κB – c-Src – Etanercept – Trastuzumab.

TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA INVOLVEMENT IN BREAST CANCER CELL PROLIFERATION

ABSTRACT

Tumor necrosis factor alpha (TNFα) is a pro-inflammatory cytokine that promotes the growth of certain cancer types. In the present Thesis we explored signaling pathways involved in TNFα-induced breast cancer growth and its interaction with the tyrosine kinase receptor I, ErbB-2. Our results indicate that TNFα, acting through TNFR1, induces activation of p42/p44 MAPK, JNK and PI3-K/Akt, NF-κB activation and cell proliferation. TNFα, when administered *in vivo*, induced C4HD tumor growth on Balb/c mice and treatment with a specific inhibitor of NF-κB, Bay 11-7082, induced a partial regression of said breast tumor. Bay 11-7082 blocked TNFα ability of inducing the cell cycle promoter protein cyclin D1 and the antiapoptotic protein Bcl-X_L. In addition we showed that TNFα induces ErbB-2 transactivation on breast cancer cells with ErbB-2 overexpression. We found that TNFα activates the tyrosine kinase c-Src, promotes ErbB-2 phosphorylation on Tyr877, and favors heterodimer formation between ErbB-2 and ErbB-3. This last event leads to Akt phosphorylation, NF-kB activation and to the increase in cyclin D1 protein expression. The presence of AG825, an ErbB-2 inhibitor, or small interference RNA (siRNA) to ErbB-2, but not the humanized monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin^{TM}) abolished ErbB-2 phosphorylation, NF-κB activation and TNFα-induced proliferation. Our findings reveal that TNFα is able to transactivate ErbB-2 and using it as an obligatory downstream signaling molecule in the generation of mitogenic signals. Given the fact that TNFα is present in a high percentage of invasive breast cancers, our work would be of importance for the understanding of breast cancer which overexpresses ErbB-2 and also for choosing the most appropriate treatment for patients.

Key words:

Tumor necrosis factor alpha (TNFα) – TNFR1/TNFR2 – ErbB-2 – Breast cancer – NF-κB – c-Src – Etanercept – Trastuzumab.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis doctoral han sido publicados en:

TNFα acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-κB-dependent pathways. Martín A. Rivas, Romina P. Carnevale, Cecilia J. Proietti, Cinthia Rosemblit, Wendy Beguelin, Mariana Salatino, Eduardo H. Charreau, Isabel Frahm, Sandra Sapia, Peter Brouckaert, Patricia V. Elizalde, Roxana Schillaci. *Experimental Cell Research* **314** (2008) 509-529.

Tumor Necrosis Factor α Promotes Breast Cancer Cell Proliferation through ErbB-2 Transactivation. Martín A. Rivas, Mercedes Tkach, Wendy Beguelin, Cecilia J. Proietti, Cinthia Rosemblit, Eduardo H. Charreau, Patricia V. Elizalde, Roxana Schillaci. *Breast Cancer Research and Treatment* **122** (2010) 111-124.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Roxana Schillaci. No se resumen en unas pocas líneas más de ocho años de enseñanza y dedicación. Gracias Rox por tanto apoyo, por tanto compromiso, por tanta confianza y gracias por la calidad de la formación que me brindaste, que me va a acompañar por el resto de mi vida científica y seguramente personal. Gracias por permitirme expresar mis pensamientos, por sugerir ideas continuamente, por darme tanta libertad y por haber hecho del laboratorio un grato lugar donde pasar tantas horas.

A la Dra. Patricia V. Elizalde, gracias por darme un lugar dentro de su grupo y permitirme ser uno más de sus becarios. Gracias por el apoyo personal y económico, por apoyar mi iniciativa con los miRNAs y sobre todo por transmitirme ese ideal tan alto de la ciencia, que permite que alcancemos en la Argentina una excelente formación.

Al Dr. Eduardo H. Charreau y al Instituto de Biología y Medicina Experimental por estimular constantemente el crecimiento académico y profesional, y por estar disponible para atender mis necesidades.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a sus docentes, por el compromiso con la educación pública, por encender en mi la chispa de la investigación y por la calidad de la educación que me brindaron, que hace que lleve con orgullo el honor de ser egresado de esa prestigiosa institución. Especialmente al Dr. Juan Carlos Calvo, por haber sido mi consejero de Tesis y por estar siempre dispuesto a atender mis inquietudes.

Al Dr. Alfredo A. Molinolo por su constante apoyo y ayuda, a la Dra. Claudia Lanari por proveernos del modelo tumoral C4HD y a la Dra. Isabel Frahm del Servicio de Patología y Biología Molecular del Sanatorio Mater Dei por estar siempre dispuesta a ayudarnos con las patologías.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio, presentes y pasados, que hicieron que ir a trabajar cada día sea una experiencia más agradable y más enriquecedora. A Mercedes, por ser mi gran compañera en la mesada, de quien sin duda aprendí más de lo que pude transmitirle. A Wendy, por tantas horas discutiendo un simple resultado y diseñando experimentos imaginarios. A Romi, Ceci, Cele, Cinthia, Franco, Lean, Flor, Rocío y Mariana por los consejos, por la ayuda en el lab día a día. A CeciFer y a Caro por hacerme terapia gratis en muchas oportunidades.

A mis padres, Elvira y Eduardo, por haberme indicado el camino, pero a su vez por haberme permitido que eligiera el mío. Por todo el esfuerzo hecho por mi educación y por acompañar siempre mis pasos.

A mi abuela Carmen, por enseñarme que la juventud es un estado de la mente.

A mis hermanas Laura y Nahir, por ser dos seres maravillosos y por estar presentes de manera incondicional en todo lo que emprendo. A Matías y Marcelo por los buenos momentos y por la amistad.

¡¡¡A mis amigos!!! Qué son tantos y tan buenos: Ale y Marita, Solcito, la Pepa, Lore, Noe, la Pochins, Mariano N, Mariano C, Charly, Mary, Fer, Naty, Sergio, Chitu, Gisela y Pablito, Nes y Gus, María José y Calita. ¡Sé que soy quien soy, gracias a que ustedes estuvieron siempre allí!

Y a Ariel, por ser mi compañero de aventuras, por compartir la vida a mi lado, por incentivarme a buscar siempre nuevos desafíos y por haber sido tan paciente durante la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta Tesis Doctoral a mis sobrinos:

Franco, Pilar, Lucila, Lourdes y Julia

Porque me hacen inmensamente feliz con su inocencia, con su picardía y con su amor. Porque ellos son la promesa de que el futuro puede ser mejor, y porque si ellos no estuvieran aquí, nada de esto tendría sentido.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN....4

Palabras Clave....5

ABSTRACT....6

Key words....6

AGRADECIMIENTOS....9

DEDICATORIA....11

ABREVIATURAS....18

INTRODUCCIÓN....21

Cáncer de mama....21

Factor de necrosis tumoral alfa....23

Rol fisiopatológico del TNFα....28

Familia de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I: ErbB....30

OBJETIVOS....36

MATERIALES Y MÉTODOS....39

Materiales y reactivos....39

Reactivos generales del laboratorio....39

TNFα murino y humano recombinante y muteínas de TNFα....39

Inhibidores farmacológicos....40

Anticuerpos bloqueantes....40

Animales y Tumores.....41
Cultivos primarios de células epiteliales C4HD.....41
Líneas celulares.....42
Ensayos de proliferación por incorporación de timidina-[^{3}H].....43
Ensayo de *Western blot*.....43
Anticuerpos.....44
Ensayos de co-inmunoprecipitación.....44
Citometría de flujo y recuento celular.....44
Transfecciones transitorias.....45
ARN de interferencia.....46
Crecimiento del tumor C4HD *in vivo*.....47
Crecimiento del tumor JIMT-1 *in vivo*.....48
Inmunohistoquímica.....48
Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....49
Ensayo de fosforilación in vitro con ATP no radioactivo.....49
Análisis estadístico.....50

RESULTADOS.....52
CAPÍTULO I ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR TNFα DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.....52

El TNFR1 y el TNFR2 inducen de manera diferencial la señalización vía p42/p44 MAPK, JNK y Akt.....52

El TNFR1 y el TNFR2 están involucrados en la proliferación del cáncer de mama inducida por TNFα.....55

El TNFα induce la activación transcripcional de NF-κB vía TNFR1 a través de la activación de JNK y Akt.....57

La proliferación de células de cáncer de mama y la expresión de Bcl-X_L y ciclina D1 inducidas por TNFα son dependientes de la actividad transcripcional de NF-κB.....61

El TNFα promueve el crecimiento *in vivo* del tumor C4HD a través de la activación de NF-κB.....65

CAPÍTULO II ESTUDIO DE LA TRANSACTIVACIÓN DE ERBB-2 POR TNFα.....70

La proliferación de las células C4HD inducida por TNFα requiere de la activación de ErbB-2.....70

La quinasa c-Src es mediadora de la fosforilación de ErbB-2 inducida por TNFα.....76

TNFα induce la fosforilación de ErbB-3, su dimerización con ErbB-2 y el reclutamiento de PI3-K a ErbB-3.....79

El bloqueo de la fosforilación de ErbB-2 inhibe la activación de PI3-K/Akt inducida por TNFα.....81

La inhibición de la actividad tirosina quinasa de ErbB-2 bloquea la activación del factor de transcripción NF-κB inducida por TNFα.....82

El trastuzumab no es efectivo para inhibir la proliferación inducida por TNFα en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2.....88

Efectividad *in vivo* de la proteína de fusión anti-TNFα, etanercept, en el tratamiento de tumores de mama que sobreexpresan ErbB-2.....90

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....98

El TNFR1 y el TNFR2 inducen la proliferación de células de cáncer de mama convirtiéndolos en posibles blancos terapéuticos.....98

NF-κB es un factor de transcripción clave en la proliferación del cáncer de mama inducido por TNFα.....100

El TNFα promueve *in vivo* el crecimiento del tumor de mama murino C4HD de manera dependiente de NF-κB.....102

El TNFα induce la transactivación del RTK-I ErbB-2 mediante la activación de la quinasa c-Src.....105

La activación del factor de transcripción NF-κB por TNFα requiere de la presencia de un ErbB-2 funcional.....108

Agentes anti TNFα, como el etanercept, podrían ser útiles en el tratamiento de tumores de mama resistentes a los efectos de trastuzumab.....109

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....113

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Akt: proteína quinasa B / Akt
ARNm: ARN mensajero
DMEM: Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco: Medio F-12 de Ham
DN: proteína dominante negativa
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ErbB-2: *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog*; homólogo 2 del oncogén viral de la leucemia eritroblástica u homólogo del oncogén derivado del neuro/gliobastoma; también denominado HER2 (humanos) o neu (rata)
ErbB-2-Y877F: ErbB-2 con mutación puntual en el residuo tirosina 877
ES: error estándar
FADD: dominio de muerte asociado al receptor Fas
hErbB-2-wt: ErbB-2 humano salvaje
hTNFα: factor de necrosis tumoral alfa humano
IKKβ: proteína quinasa de la proteína inhibidora del factor de transcripción κB beta
IκBα: proteína inhibidora del factor de transcripción κB alfa
IL: interleuquina
JNK: proteína quinasa del amino terminal de c-jun
KN-ErbB-2: ErbB-2 que carece de actividad quinasa
MEKK3: proteína quinasa de la quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos
mTNFα: factor de necrosis tumoral alfa murino
NF-κB: factor nuclear kappa B
p38 MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos p38
p42/p44 MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos p42/p44
PI3-K: fosfatidil inositol 3-fosfato quinasa
R1-TNF: muteína de TNFα murino de unión al TNFR1
R2-TNF: muteína de TNFα murino de unión al TNFR2
R1R2-TNF: muteína de TNFα murino de unión a ambos TNFR
RIP: proteína de interacción con el receptor del factor de necrosis tumoral alfa
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes por presencia de dodecil-sulfato de sodio.

RTK-I: familia de receptores con actividad quinasa de tirosinas tipo I

SFB: suero fetal bovino

SFBCh: suero fetal bovino libre de esteroides por tratamiento con carbón activado

siRNA: ARN cortos de interferencia

TNFR1: receptor del factor de necrosis tumoral alfa tipo 1

TNFR2: receptor del factor de necrosis tumoral alfa tipo 2

TRADD: dominio de muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral alfa

TRAF: factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral alfa

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad con una altísima incidencia, siendo el tipo de cáncer más frecuente en la mujer en el mundo entero y la segunda causa de muerte por cáncer, detrás del cáncer de pulmón. De acuerdo con los datos oficiales, en Argentina se estima que 18.712 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama por año. El Ministerio de Salud de la Nación, reportó que la mortalidad anual por cáncer de mama en Argentina asciende a 23,8 – 27,4 casos por cada 100.000 habitantes, significando esto alrededor de 5202 muertes por año por esta enfermedad (Matos et al, 1994; Matos et al, 1990; Instituto Nacional del Cáncer, 2010). La mortalidad por cáncer de mama ha disminuido en los últimos años en los países desarrollados gracias al diagnóstico precoz, a los mejores esquemas de tratamiento disponibles y a la reciente reducción de la incidencia (Fig. 1). Sin embargo, en los países subdesarrollados la mortalidad por cáncer de mama continúa siendo alta: el escaso acceso a planes de cobertura médica, a tratamientos personalizados de avanzada y mejores herramientas de diagnóstico, así como también la co-existencia de infecciones en situaciones de pobreza, impiden que los últimos avances se traduzcan en una mejora del tratamiento de la enfermedad (National Cancer Institute, 2010; Matos et al, 1994; Matos et al, 1990; Robles y Galanis, 2002).

El diagnóstico del cáncer de mama está basado en la determinación de características histopatológicas específicas que definen a los distintos cánceres de mama en subtipos histológicos. Adicionalmente, el diagnóstico se acompaña en la actualidad de la determinación de características moleculares específicas, tales como la presencia o ausencia de receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y del receptor con actividad de tirosina quinasa ErbB-2 [*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog*; homólogo 2 del oncogén viral de la leucemia eritroblástica u homólogo del oncogén derivado del neuro/gliobastoma; también denominado HER2 (humanos) o neu (rata)]. En función de la expresión diferencial de estos receptores, los cánceres de mama, a su vez, se subclasifican como luminales, sobre-expresores de ErbB-2 o triples negativos (RE-/RP-/ErbB-2-) y son asignados a un esquema de tratamiento apropiado (National Cancer Institute, 2010).

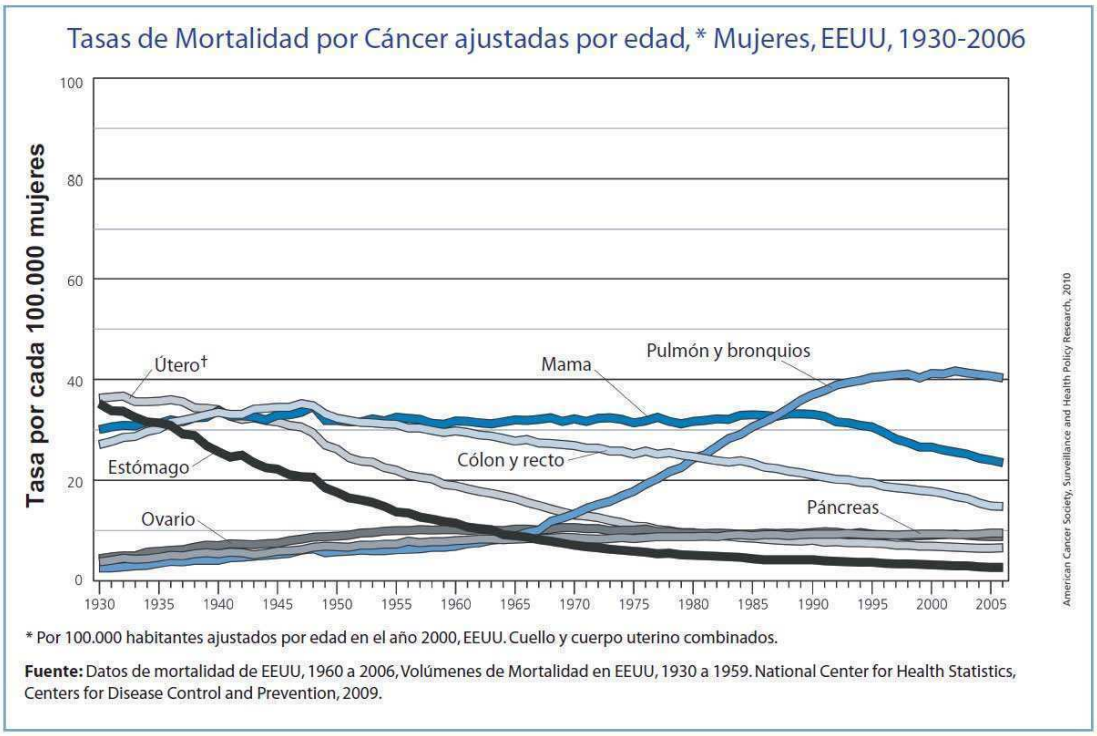


Fig. 1 Tasas de mortalidad por cáncer en mujeres, ajustadas por edad, EEUU, 1930-2006. Se muestra la tasa de mortalidad para el cáncer de mama, ovario, útero, estómago, páncreas, colorrectal, y de bronquio y pulmón por cada 100.000 mujeres. Adaptado de *American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2010*.

El tratamiento del cáncer de mama consiste, en general, en la tumorectomía o en la mastectomía y además puede consistir en radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal o terapias dirigidas. En particular, los pacientes cuyos tumores sobre-expresan ErbB-2 –aproximadamente el 16,8 – 25 % del total de los diagnosticados (Frahm et al, 2007; Slamon et al, 1987) – son tratados con trastuzumab (Herceptin^{MR}): un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el dominio extracelular del ErbB-2, cuyo mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado. A pesar de que cientos de estudios preclínicos generaron un gran optimismo en cuanto al tratamiento con trastuzumab de pacientes cuyos tumores sobre-expresan ErbB-2, en la práctica clínica se observa que alrededor de dos tercios de los pacientes tratados desarrollan resistencia a ese tratamiento, evolucionando la enfermedad a subtipos más agresivos y con probabilidades aún más bajas de recuperación (Wilken y Maihle, 2010). Dentro de las terapias dirigidas, se encuentra también aprobada para su uso en cáncer de mama avanzado que sobre-expresa ErbB-2 la droga ditosilato de lapatinib (Tykerb^{MR}) que es un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del mencionado receptor (Macfarlane y Gelmon, 2010; Baselga, 2010).

Factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) es una citoquina pluripotencial que regula una gran variedad de respuestas celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, inflamación y apoptosis. Aunque el TNFα fue originalmente caracterizado por causar la necrosis hemorrágica de tumores en altas concentraciones, hoy se sabe que en muchos tipos de cáncer, bajas concentraciones de TNFα aumentan el crecimiento y favorecen la progresión tumoral (Maeda et al, 2005). Este hallazgo, es coherente con una gran cantidad de trabajos que dan testimonio de que la inflamación en el microambiente tumoral cumpliría un rol pro-tumoral (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002; Maeda et al, 2005; Karin y Greten, 2005).

El TNFα se sintetiza como un precursor de membrana de 26 kDa y luego es clivado por una proteasa, liberando a la forma madura del TNFα, de 17 kDa de peso molecular (Kriegler et al, 1988). El TNFα biológicamente activo consiste en un homotrímero, de peso molecular 51 kDa, que se une a dos receptores (TNFRs) de membrana que reclutan proteínas de andamiaje, las cuales actúan como plataforma adaptadora y conducen a la activación de diversos caminos de señalización dependiendo el tipo celular. La estructura primaria del TNFα humano (hTNFα) y murino (mTNFα) se encuentra muy conservada, lo que determina que entre los receptores exista cierta especificidad de especie: mientras que el mTNFα es capaz de unirse a los dos receptores humanos, el hTNFα solo es capaz de ligar al TNFR1 murino (Rothe et al, 1992). Tanto el receptor tipo 1 de 55 kDa (TNFR1) como el receptor tipo 2 de 75 kDa (TNFR2), son glicoproteínas con un único dominio transmembrana (Rothe et al, 1992). Ambos receptores comparten un 28% de homología en su dominio extracelular de unión al ligando y carecen de actividad enzimática. La unión del TNFα determina la trimerización de los receptores, requerida para que el receptor pueda unir proteínas de señalización a su dominio citoplasmático. El TNFR1, a través de su dominio de muerte citoplasmático, recluta secuencialmente a la proteína con dominio de muerte asociada al TNFR (TRADD), al factor 2 asociado al receptor (TRAF-2), a la proteína de interacción con el receptor (RIP) y a la proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos (MEKK3) (Fig. 2). Esta última fosforila directamente a la quinasa de IκBβ (IKKβ) (Yang et al, 2001). Además, TRAF-2 puede también asociarse con la quinasa inductora de NF-κB (NIK), la cual es

necesaria junto con Akt para fosforilar a la IKKα (Hsu et al, 1995; Ozes et al, 1999). Las IKKs activadas causan la fosforilación de IκBs, inhibidores citoplasmáticos del factor de transcripción factor nuclear κB (NF-κB), gatillando su ubiquitinación y subsecuente degradación, que lleva a la liberación y translocación nuclear de NF-κB (Fig. 3) (Karin, 2006). TRADD puede también unir al dominio de muerte asociado a Fas (FADD), llevando a apoptosis mediante la activación de caspasas (Tartaglia et al, 1993). También se describió que el reclutamiento de TRAF2 es requerido para la activación de la proteína quinasa del amino terminal de c-Jun (JNK), para las proteínas quinasas activadas por mitógenos p42/p44 (p42/p44 MAPK) y para p38 MAPK (Liu et al, 1996). TRAF1 y TRAF2 son, además, las moléculas adaptadoras para la unión de las proteínas cIAP1 y cIAP2, importantes inhibidores de la apoptosis mediada por caspasas (Wang et al, 1998; Mahoney et al, 2008). Por otro lado, el TNFR2, aunque carece de dominio de muerte, es capaz de unir a TRAF2 a través de otra proteína adaptadora, TRAF1 (Rothe et al, 1994), proveyendo un mecanismo que explica algunas de las actividades compartidas entre los TNFR (Fig. 2), como la capacidad de activar a NF-κB.

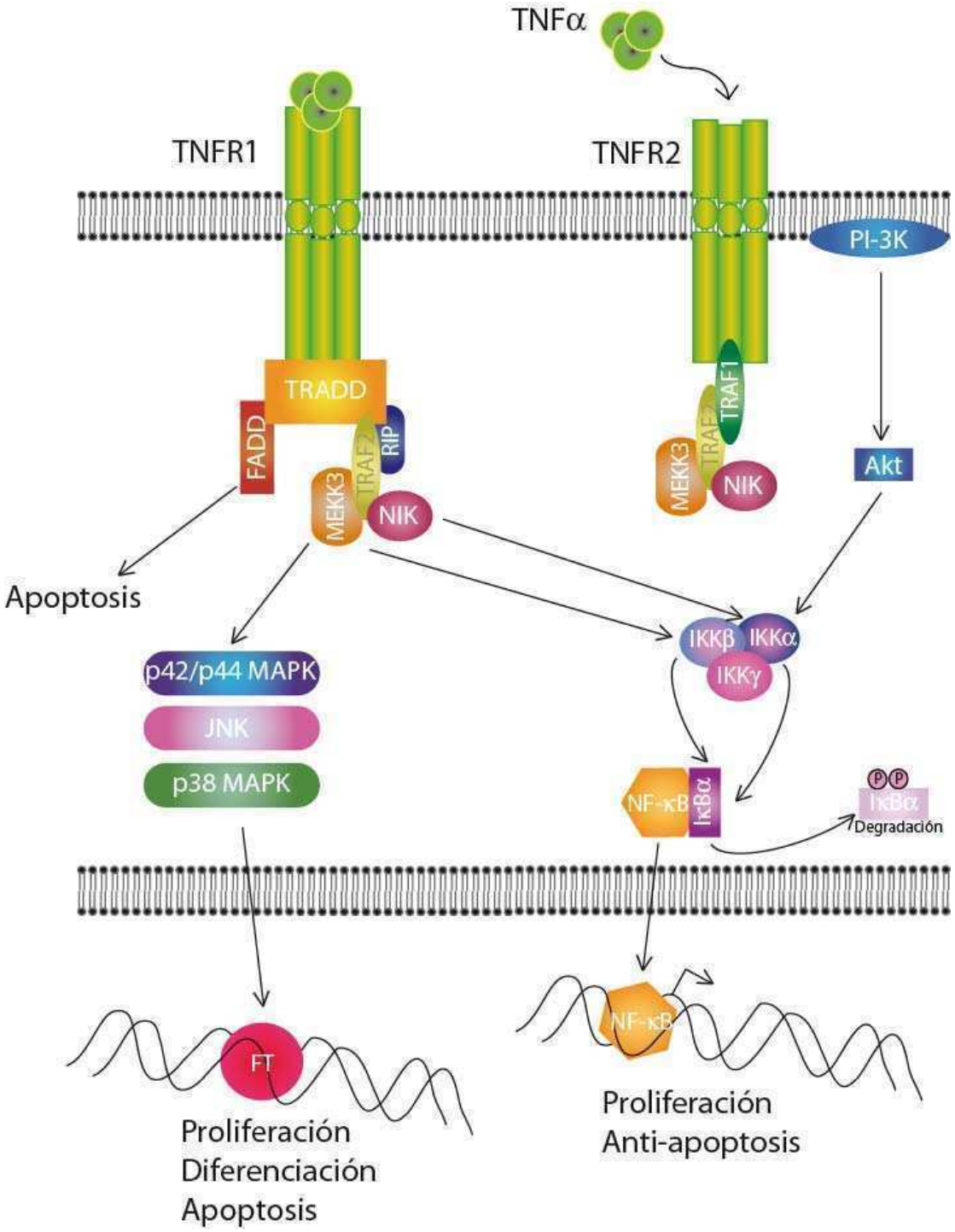


Fig. 2 Señales de transducción estimuladas por el TNFα a través de sus receptores. TNFα, Factor de necrosis tumoral alfa; TNFR, receptor del TNFα; TRADD, dominio de muerte asociado al TNFR1; FADD, dominio de muerte asociado a Fas; RIP, proteína de interacción con el receptor; TRAF, factor asociado al receptor de TNFα; PI3-K, fosfatidil inositol-3 fosfato quinasa; IKK, quinasa de IκB; IκB, proteína inhibidora de NF-κB; NF-κB, factor nuclear κB; MEKK3, quinasa de la quinasa de MEK1/2; NIK, quinasa inductora de NF-κB. Adaptado de Chan KF et al, Immunity 13 (2000) 419-422.

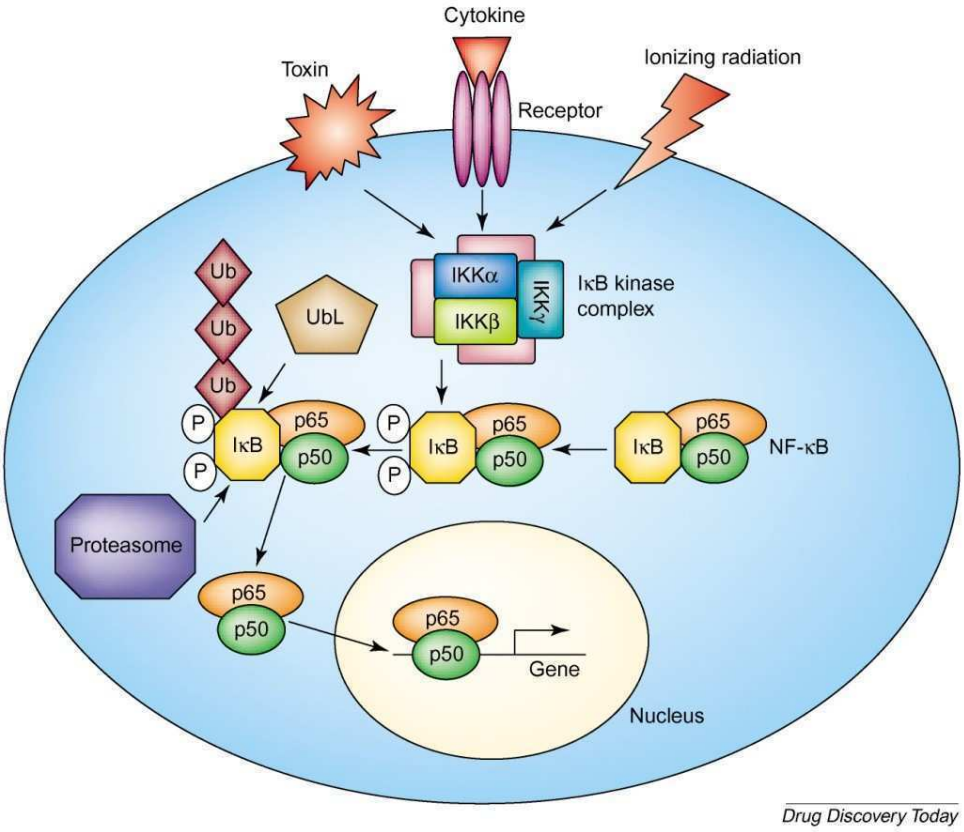


Fig. 3 Activación del factor de transcripción NF-κB. En células sin estimular, el factor de transcripción NF-κB (representado aquí por las subunidades p65 y p50) se encuentra en el citoplasma unido a la proteína inhibitoria de NF-κB alfa (IκBα). Frente a distintos tipos de estímulos, como puede ser el TNFα, la proteína IκBα es fosforilada por el complejo de quinasas de IκB (IKK). La fosforilación de IκBα la convierte en blanco de ubiquitinación por una ubiquitina-ligasa (UbL), que la marca para su degradación por el proteasoma. De esta manera, el dímero NF-κB puede translocar al núcleo y activar la transcripción de sus genes blanco. De: Haefner B, Drug Discov Today 7 (2002) 653-663.

La familia de factores de transcripción *factor nuclear κB* (NF-κB)/Rel juegan un rol fundamental en respuestas inmune e inflamatoria (Baeuerle y Henkel, 1994; Baeuerle y Baltimore, 1996). Existen cinco miembros de esta familia en mamíferos: p65 o RelA, RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105/p50) y NF-κB2 (p100/p52). Ambos, p105 y p100 son proteolíticamente procesados por el proteasoma para producir p50 y p52, respectivamente. Los productos, p50 y p52, forman complejos diméricos con las proteínas Rel: mientras que p50 se asocia con muchos de los miembros de la familia NF-κB, p52 tiende a formar dímeros primariamente con RelB. Una variedad de estímulos, como el TNFα y el lipopolisacárido bacteriano inducen la activación de la vía canónica de NF-κB, caracterizada por la activación del clásico complejo de quinasas de IκB (IKK), compuesto por IKKα, IKKβ e IKKγ, el cual fosforila a las proteínas inhibitorias IκB, marcándolas para la degradación rápida a través de la vía

ubiquitin-proteasoma (Ghosh y Karin, 2002). El clásico dímero que resulta activado por la vía canónica es el compuesto por la p65 (RelA) y p50 (producto del clivaje de p105). Adicionalmente, se sabe que eventos de fosforilación de p65 regulan positivamente la actividad transcripcional del dímero p65/p50. Por su parte, el BAFF, CD40L y ciertos otros factores activan la vía no canónica de activación de NF-κB, en la cual NF-κB2 es clivado de p100 a p52 en un proceso inducible por fosforilación y mediado por el proteasoma y regulado por las quinasas inductoras de NF-κB (NIK) e IKKα, pero no por IKKβ o IKKγ (Xiao et al, 2001b; Senftleben et al, 2001; Xiao et al, 2001a). La quinasa NIK fosforila a IKKα en los residuos Ser176 y 180 (Xiao et al, 2001a) y a p100 en Ser866/870, y luego recluta a IKKα a p100 donde IKKα fosforila residuos adicionales en el N- y C-terminal (Xiao et al, 2004), llevando a la ubiquitinación y procesamiento de p100 (Liang et al, 2006). Se ha demostrado que TRAF2 y TRAF3 son reguladores negativos de la vía no canónica de activación de NF-κB (Xia y Chen, 2005; Liao et al, 2004), y su unión diferencial a los receptores de TNFα jugarían un rol clave en determinar si las señales que se transducen activarán la vía canónica, la no canónica o ambas (Morrison et al, 2005).

Entre los genes humanos con elementos de respuesta para el factor de transcripción NF-κB se encuentran varios vinculados con la respuesta inmune como por ejemplo el receptor de células T (CD3), la interleuquina (IL)-2, IL-8, IL-9, IL-11, IL-6, algunas quimioquinas como CCL-2, CCL-5 (Rantes), CCL-11, o sus receptores CCR5, CCR-7 (Fig. 4) (Haefner, 2002). El TNFα, incluso, es un gen que posee en su promotor elementos de respuesta a NF-κB (Drouet et al, 1991), un dato de gran importancia dado su propuesto rol pro-tumoral. Además de estos genes, otros relacionados con dos de las características distintivas del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000), es decir la anti-apoptosis y la proliferación, poseen elementos κB en sus secuencias promotoras (Haefner, 2002; Karin et al, 2002) (Fig. 4). Ejemplos de estos genes son la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L y la proteína promotora del ciclo celular ciclina D1 (Karin et al, 2002).

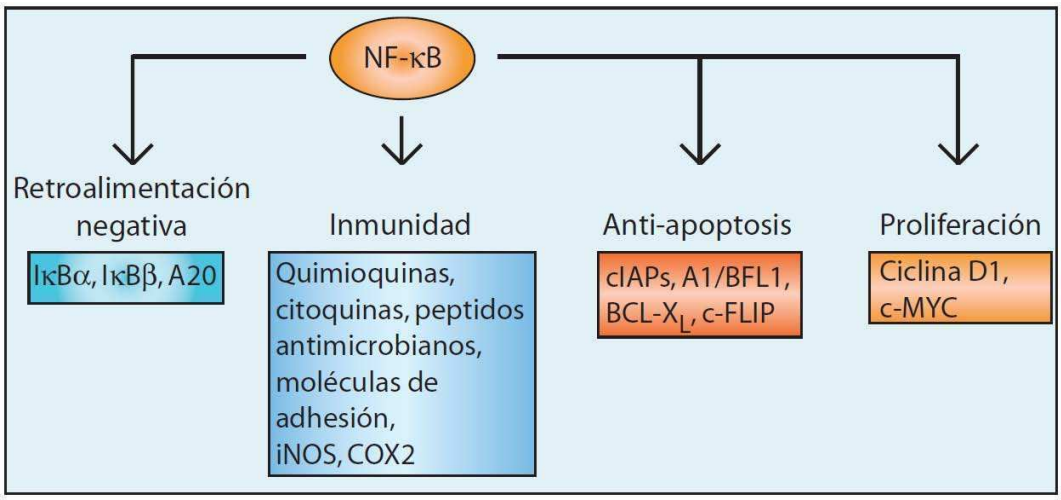


Fig. 4 Genes que contienen elementos de respuesta al factor de transcripción NF-κB en sus regiones promotoras. El factor de transcripción NF-κB activa la transcripción de genes relacionados con la retroalimentación negativa de activación de esa vía, inmunidad, anti-apoptosis y proliferación. IκBα, IκBβ proteína inhibidora de NF-κB alfa o beta, iNOS sintetasa de NO inducible, COX2 ciclooxigenasa 2, cIAPs proteína celular inhibidora de la apoptosis, A1/BFL1 miembro de la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-XL proteína extra larga del linfoma de células B, c-Myc proto-oncogén Myc. Adaptado de Karin, et al Nat Rev Cancer 2 (2002) 301.

La capacidad de TNFR1 y TNFR2 de mediar individualmente la señalización inducida por TNFα, ha sido un área ampliamente estudiada. El TNFR1 ha sido implicado en muchos procesos biológicos incluyendo citotoxicidad (Tartaglia et al, 1993), producción de IL-6 (Rothe et al, 1992), proliferación de fibroblastos (Kalb et al, 1996) e inducción de NF-κB (Tartaglia et al, 1993) mientras que, por su parte, el TNFR2 ha sido asociado con proliferación de timocitos y activación de NF-κB (Rothe et al, 1992).

Rol fisiopatológico del TNFα

Se sabe que el TNFα juega un rol fisiológico en el desarrollo normal de la glándula mamaria, promoviendo la proliferación e induciendo la morfogénesis ductal (Lee et al, 2000). Está reportado que el TNFR1 es el receptor mediador de la proliferación inducida por TNFα de células epiteliales normales, mientras que la activación de TNFR2 induce la acumulación de caseína (Varela y Ip, 1996).

En 1987, Spriggs *et al.* (Spriggs et al, 1987) reportó que el TNFα podía inducir a células de cáncer de mama a producir más TNFα. Este trabajo fue seguido por otros reportes que afirmaban que el ARNm y la proteína TNFα eran detectables en células malignas y estromales de biopsias de pacientes con cáncer (Beissert et al, 1989; Naylor et al, 1990; Naylor et al, 1993), en particular en aquellos con mal pronóstico.

Estos hallazgos llevaron a que Leibovich *et al*. sugirieran que el TNFα en realidad estimularía el crecimiento tumoral (Leibovich et al, 1987). Sin embargo, fue en 1999 cuando un trabajo del grupo de Balkwill mostró, en ratones *knock out* para el TNFα, que la luz ultravioleta no provoca cáncer de piel, como sí lo hace en ratones salvajes. De esta forma se proveyó una evidencia firme de que el TNFα es una citoquina clave para la promoción tumoral (Suganuma et al, 1999). El mismo grupo también ha demostrado que en cáncer de ovario el TNFα actúa como un factor de crecimiento autocrino y paracrino (Wu et al, 1993), y que además genera la liberación de una variedad de citoquinas (IL-6, factor inhibidor de la migración de macrófagos MIF y el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF) y quimioquinas (CCL2 y CXCL12)(Kulbe et al, 2005; Kulbe et al, 2007) que favorecen la progresión tumoral y la migración de las células a sitios de crecimiento secundarios. Más recientemente, también se ha mostrado que en carcinomas hepatocelulares, el TNFα es un promotor de la progresión tumoral en etapas tempranas (Pikarsky et al, 2004).

En los últimos años, ciertos trabajos reconocen que el TNFα confiere también propiedades pro-metastásicas e incluso afirman que induce la transición epitelio-mesenquimal en tumores (Chuang et al, 2008; Egberts et al, 2008; Kim et al, 2009; Wu y Zhou, 2010; Hou et al, 2010). En un trabajo reciente, el grupo dirigido por el Dr. Karin identificó que ciertos carcinomas de pulmón expresan altos niveles del proteoglicano versicán. Esta proteína es liberada al microambiente tumoral donde activa receptores de tipo Toll (TLR2 y TLR6) en macrófagos y produce un aumento en la producción de TNFα, que es requerida para el establecimiento de las metástasis en este tipo tumoral. Esos resultados explican cómo las células de cáncer avanzado hacen uso de componentes del sistema inmune innato, para generar un microambiente inflamatorio favorable para el establecimiento de las metástasis (Kim et al, 2009).

En particular, en cáncer de mama, los efectos del TNFα son variables: se ha demostrado que el TNFα induce apoptosis o inhibe la proliferación de células MCF-7 (Burow et al, 1998), mientras que se ha mostrado que una gran cantidad de líneas celulares de cáncer de mama son resistentes a la apoptosis inducida por TNFα (Zhou et al, 2000). Las diferencias en susceptibilidad a la apoptosis inducida por TNFα podrían ser explicadas por la expresión diferencial de TNFRs, por la generación diferencial de ceramidas, por la activación de caspasas, y/o por la expresión diferencial de proteínas de la familia Bcl-2 (Burow et al, 1998). Por su parte, la resistencia a los efectos citotóxicos del TNFα es causado por activación constitutiva

de ErbB-2/Akt/NF-κB en líneas celulares de cáncer de mama (Zhou et al, 2000). Más aún, se ha descripto que el TNFα es mitogénico en células de cáncer de mama de rata inducido por 1-metil 1-nitrosourea (Varela et al, 2001) y en la línea celular de cáncer de mama humano T47D (Pirianov y Colston, 2001). Existen reportes que muestran evidencias de que las mismas células tumorales son capaces de sintetizar TNFα, y que otra fuente de la citoquina serían los macrófagos infiltrantes del tumor, poniendo de manifiesto la importancia del TNFα en el microambiente tumoral (Balkwill y Mantovani, 2001). Los caminos de señalización intracelular activados por TNFα que conducen a la proliferación del cáncer de mama han sido parcialmente delineados, con NF-κB jugando un importante rol (Varela et al, 2001). Sin embargo, la participación de TNFR1 y TNFR2, el mecanismo molecular a través del cual el TNFα controla el crecimiento del cáncer de mama y la participación de quinasas en la regulación de este proceso continúa inexplorada.

Familia de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I: ErbB

Tal como se describió previamente en esta Introducción, el ErbB-2 es una molécula clave en cáncer de mama y existe una amplia evidencia que sugiere que la señalización a través de este receptor contribuye a la transformación oncogénica. La familia de receptores tirosina quinasa tipo I (RTK-I) se compone de cuatro receptores relacionados: ErbB-1 (EGFR/HER1), ErbB-2 (Neu/HER2), ErbB-3 y ErbB-4 (Yarden y Sliwkowski, 2001). Como regla general, en presencia de ligandos, los receptores forman hetero- u homodímeros que son transfosforilados por los dominios quinasa activos de su contraparte. Las excepciones son ErbB-3, que tiene una actividad tirosina quinasa muy baja, y ErbB-2, para quien no se conocen ligandos y se lo considera, por lo tanto, un receptor huérfano. Se han descripto, hasta la actualidad, una gran cantidad de ligandos de los RTK-I, que incluyen seis ligandos del EGFR, y todas las isoformas conocidas del factor de diferenciación Neu/Heregulina/Neuregulina que se unen a ErbB-3 y a ErbB-4 (Tzahar et al, 1996; Harris et al, 2003). Una vez fosforilados, estos receptores actúan como sitios de anclaje para el reclutamiento de proteínas adaptadoras o enzimas, que inician cascadas de señalización intracelular capaces de controlar múltiples procesos celulares (Fig. 5).

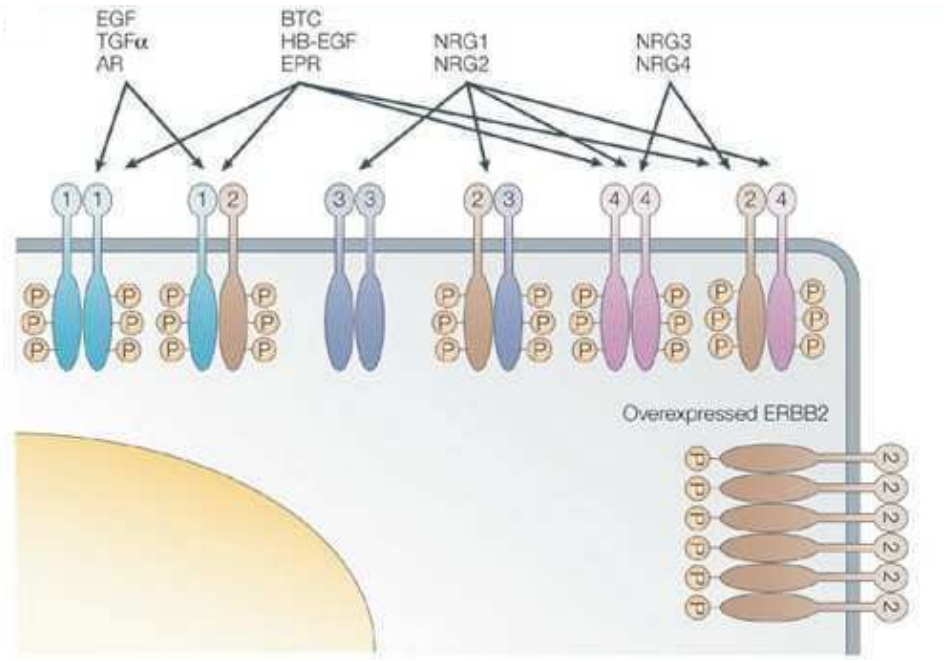


Fig. 5 Receptores pertenecientes a la familia de quinasas de tirosina de tipo I (RTK I) y sus ligandos. En la figura se muestra un esquema de los receptores RTK I, donde 1, 2, 3 y 4 hacen referencia a ErbB-1/EGFR/HER1, ErbB-2/neu/HER2, ErbB-3/HER3 y ErbB-4/HER4, respectivamente. Se muestran los posibles homo- y heterodímeros. El ErbB-2 es, además, capaz de oligomerizar entre sí cuando está sobreexpresado. En la figura se indican también los ligandos que se hallaron unidos a los respectivos dímeros. EGF factor de crecimiento epidérmico, TGFα factor de crecimiento transformante alfa, AR amfirregulina, BTC betacelulina, HB-EGF factor semejante al EGF de unión a heparina, EPR epirregulina, NRG1-4 neuregulina/heregulina 1-4 (Harris et al, 2003).

Como todos los miembros de la familia de RTK-I, el ErbB-2 es una proteína de un solo paso de membrana. Posee 4 dominios extracelulares, que se numeran comúnmente del I al IV, siendo el dominio I el que contiene al NH_2-terminal y el dominio IV el más proximal a la membrana plasmática (Brandt-Rauf et al, 1994b; Brandt-Rauf et al, 1994a) (Fig. 6). A continuación posee un dominio hidrofóbico, que lo ancla y posiciona en la membrana, y una región COOH-terminal citoplasmática, donde se encuentra la actividad de tirosina quinasa y también los residuos blanco de esa actividad, como el residuo de autofosforilación tirosina (Tyr) 1222 en humanos o su análogo murino Tyr1272, y el residuo Tyr877 (humano) / Tyr927 (murino), que son blanco de fosforilación de la quinasa citoplasmática c-Src (Fig. 6). Los receptores de esta familia, cuando unen ligandos (lo hacen en un bolsillo que forman entre los dominios I, II y III), sufren un cambio conformacional que deja expuesto al dominio II, conocido como el dominio de dimerización (Fig. 6) (Brennan et al, 2000). Curiosamente, aunque la molécula de ErbB-2 no puede unir ligandos, presenta una conformación abierta y extendida que le permite homo- o heterodimerizar con

cualquiera de los demás ErbB, dado que su conformación se asemeja a la del ErbB-3 unido a un ligando (Fig. 6). Es quizás por ese motivo que el ErbB-2 es el compañero de dimerización más frecuentemente encontrado formando dímeros con cualquier otro receptor ErbB (Graus-Porta et al, 1997). Sin embargo, de todos los dímeros posibles, el de ErbB-2/ErbB-3 es el de mayor potencial oncogénico, debido en parte a la capacidad única que posee el ErbB-3 de unir a la fosfatidilinositol 3-fosfato quinasa (PI3-K) y activar así a la vía de la quinasa Akt (Fedi et al, 1994; Graus-Porta et al, 1997).

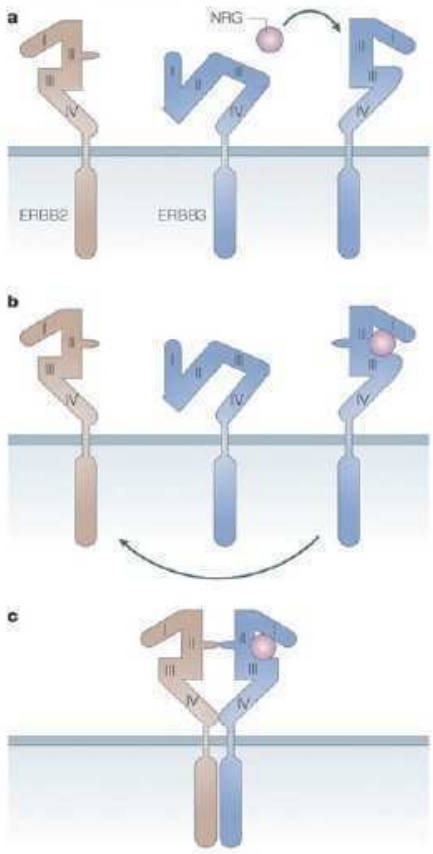


Fig. 6 Estructura y dominios de ErbB-2 y ErbB-3. Los receptores RTK tipo I, poseen 4 dominios extracelulares (I a IV), uno de transmembrana y otro intracelular donde se encuentra la actividad de quinasa de tirosinas y los sitios de fosforilación. El ligando se une en un bolsillo que se forma entre los dominios I, II y III. A, se muestra un esquema que representa a ErbB-2 y ErbB-3 en ausencia y presencia de ligandos (NRG). Cuando ErbB-3 une ligandos, sufre un cambio confomacional que le permite exponer el dominio II de dimerización. ErbB-2, en cambio, presenta siempre una conformación permisiva para la dimerización. B, se muestra que el ErbB-3 unido al ligando NRG es capaz de heterodimerizar con ErbB-2. C, representación gráfica del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 + NRG.

Además, en la primer parte de la porción citoplasmática, entre los aminoácidos 655 y 668 contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) que es importante para la localización de ErbB-2 en el núcleo (Chen et al, 2005). Al respecto, en nuestro laboratorio demostramos que cuando el ErbB-2 es activado por hormonas esteroideas, transloca al núcleo de la célula donde actúa como un co-activador transcripcional de

la proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3 (STAT3) en el promotor del gen de la ciclina D1 (Beguelin et al, 2010).

Es un hecho de gran relevancia clínica que la sobreexpresión de ErbB-2 ha sido involucrada en el desarrollo de ciertos tipos de cánceres humanos. Como se describió previamente en esta Introducción, se ha determinado que entre el 16,8 y el 25 % de los pacientes con cáncer de mama poseen amplificado el gen ERBB-2 y por lo tanto sus tumores expresan altos niveles del receptor ErbB-2 (Frahm et al, 2007; Slamon et al, 1987). Esos tumores tienden a ser más agresivos y existe una correlación negativa entre los niveles de ErbB-2 en el tumor y la sobrevida total del paciente y el tiempo de latencia antes de la recurrencia (Slamon et al, 1987). Por ese motivo, ErbB-2 ha sido una molécula intensamente estudiada por su potencial como blanco terapéutico. Como consecuencia de esos estudios se han desarrollado principalmente dos clases de terapias anti-ErbB-2 que están actualmente disponibles en el tratamiento clínico: anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular del receptor (Carter et al, 1992) o, recientemente, moléculas de bajo peso molecular inhibidoras de la actividad tirosina quinasa (Rusnak et al, 2001). Si bien las terapias dirigidas a ErbB-2 han mostrado cierta eficacia clínica, los efectos antitumorales obtenidos no son tan drásticos como los esperados en base a los ensayos preclínicos (Hynes y Lane, 2005). Por ejemplo, solo el 30 % de los pacientes tratados con el anticuerpo monoclonal dirigido al dominio IV de ErbB-2, trastuzumab (Herceptin®), respondió al tratamiento. En el restante 70% de los pacientes, se observan fenómenos de resistencia a los efectos antitumorales del trastuzumab, ya sean resistencias *de novo* o adquiridas. Por lo tanto, en los últimos años se han comenzado a describir a nivel molecular los determinantes de la resistencia (Hynes y Lane, 2005). En ese sentido, se propone que la amplificación de ligandos de ErbBs, la mutación en la fosfatasa PTEN (encargada de remover los fosfatos de la Akt y de esa manera desactivarla), o formas constitutivamente activas de la PI3-K, son responsables de fenómenos de resistencia a trastuzumab observados en distintos modelos celulares (Esteva et al, 2010; O'Brien et al, 2010; Koninki et al, 2010). Adicionalmente, la activación de ErbB-2 por ligandos no clásicos ha sido reportada y podría constituir otra causa de resistencia (Ritter et al, 2007). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos a través de los cuales ErbB-2 puede ser activado a través de receptores y ligandos no clásicos es un promisorio campo de investigación que

proveerá nuevos blancos terapéuticos y estrategias para predecir la respuesta de un paciente al tratamiento.

Además de la señalización y activación de los RTK-I por sus ligandos endógenos intrínsecos, es sabido que receptores estructuralmente no relacionados pueden comunicarse entre sí en lo que se conoce como transactivación de receptores. Existen reportes de transactivación de ErbB-2 por ligandos de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G, como el factor derivado de las células estromales 1α (SDF-1α) (Cabioglu et al, 2005) involucrando la participación de la quinasa c-Src; por hormonas como la prolactina que actúa a través de la activación de la quinasa Janus 2 (Jak2) (Yamauchi et al, 2000) y por citoquinas como la IL-6 (Qiu et al, 1998). Hasta el presente, ciertos grupos han demostrado la transactivación por TNFα de solo un miembro de la familia de receptores ErbB, el EGFR (Lee et al, 2007; Argast et al, 2004; Chokki et al, 2006; Chen et al, 2004). En esos trabajos se muestra que el TNFα induce la transactivación de EGFR en células del epitelio respiratorio humano, en células de músculo liso de tráquea, en hepatocitos normales y en células epiteliales mamarias a través de la activación de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) las cuales son capaces de liberar ligandos de EGFR de la membrana plasmática (Lee et al, 2007; Chokki et al, 2006; Chen et al, 2004). Sin embargo, no hay reportes que demuestren la capacidad del TNFα de transactivar a ErbB-2.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Resultados recientemente publicados por nuestro grupo, sobre los cuales se basa la hipótesis desarrollada en esta Tesis Doctoral, indican que el TNFα induce la proliferación *in vitro* de células del tumor de mama murino C4HD y de la línea celular de cáncer de mama humano T47D, a través de un mecanismo que requiere activación de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK) p42/p44, la quinasa del amino terminal de c-jun (JNK) y la quinasa Akt, pero no la quinasa p38 MAPK (Rivas et al, 2008).

Por lo tanto, en el **CAPÍTULO I** de esta Tesis Doctoral se desarrollan los siguientes objetivos:

- Estudiar la participación de los receptores TNFR1 y TNFR2 en la activación de las vías de transducción de señales p42/p44 MAPK, JNK y PI3-K/Akt por TNFα en células de cáncer de mama.
- Evaluar la participación del factor de transcripción NF-κB en los efectos proliferativos inducidos por el TNFα en células de cáncer de mama.
- Determinar la participación de TNFR1 y TNFR2 en la activación de NF-κB.
- Establecer un modelo *in vivo* de cáncer de mama murino promovido por TNFα, que pueda ser utilizado como una herramienta para evaluar una eventual terapia dirigida contra el NF-κB.

Por otro lado, dado que la sobreexpresión de ErbB-2 ha sido correlacionada con la activación constitutiva de NF-κB (Zhou et al, 2000), y que este receptor tirosina quinasa juega un rol fundamental en la proliferación de las células C4HD (Balana et al, 1999; Balana et al, 2001; Labriola et al, 2003), el **CAPÍTULO II** de esta Tesis Doctoral se centrará en la hipótesis novedosa de que en células de cáncer de mama estaría ocurriendo alguna interacción entre la señalización inducida por el TNFα y ErbB-2. Por lo tanto, se desarrollarán los siguientes objetivos, en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2:

- Evaluar la posibilidad de una interacción entre la vía de señalización del TNFα y el ErbB-2.
- Determinar el mecanismo a través del cual el TNFα sería capaz de inducir la activación de ErbB-2 en células de cáncer de mama.

- Estudiar las implicancias de la interacción propuesta en relación a la activación de NF-κB inducida por el TNFα.
- Estudiar la utilidad de una terapia anti TNFα en tumores de mama que sobre-expresan ErbB-2.
- Evaluar el impacto de la transactivación de ErbB-2 por TNFα sobre terapias drigidas al ErbB-2 como trastuzumab e inhibidores farmacológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Reactivos generales del laboratorio

Las sales utilizadas en el laboratorio (NaCl, KCl, Na_2HPO_4-$12H_20$, KH_2PO_4), así como también los solventes orgánicos (etanol, metanol) fueron comprados a Merck, Mallinckrodt o a Sigma Aldrich con calidad pro-análisis certificada. La acrilamida, EDTA, Tris y Glicina fueron adquiridos a Bio-Rad. El acetato de medroxiprogesterona (MPA), y el β-estradiol utilizados son de Sigma Aldrich. Solución enzimática: tripsina (Sigma Aldrich) 2,5 mg/ml, albumina 5 mg/ml y colagenasa tipo II (Gibco BRL, Gaitherburg, MD) 240 U/ml. Tripsina-EDTA: tripsina 2,5 mg/ml, EDTA 1 mM en PBS 1X. PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,76 mM, pH 7,4. Formol neutro: se realizó una dilución al 10% de p-formaldehído (Merck) en PBS 1X.

TNFα murino y humano recombinante y muteínas de TNFα

En todos los experimentos se utilizó TNFα murino (mTNFα) o humano (hTNFα) ambos de Cell Sciences (Canton, MA, EEUU) a una concentración de 20 ng/ml a menos que se indique otra cosa. Las proteínas mutantes de TNFα murino (referidas en esta Tesis como "muteínas") fueron obtenidas mediante ingeniería genética, y son capaces de unirse selectivamente a uno u otro TNFR (Ameloot et al, 2001). Las mismas fueron construidas reemplazando ciertos aminoácidos de la región 50-90, que difiere entre el mTNFα y el hTNFα (Ameloot et al, 2001). Dichas muteínas fueron utilizadas en concentraciones de entre 2 y 200 ng/ml y los ensayos se realizaron en DMEM + 0,1% SFBCh. Las muteínas fueron cedidas por el Dr. P. Brouckaert, Universidad de Ghent, Bélgica. Se utilizaron las siguientes muteínas: mTNF-D71S/Y72T/Δ73H/E89T (R1-TNF) que se une selectivamente a TNFR1, hTNF-S71D/T72Y/H73Δ/T89E (R1R2-TNF) una mutante de hTNFα que tiene la capacidad de unirse a ambos receptores murinos (Ameloot et al, 2001), y mTNF-R32Y/A145R (R2-TNF) la cual se une solo a TNFR2 (Rivas et al, 2008).

En algunos ensayos, utilizamos heregulina β1 recombinante humana (HRG, Millipore, Bedford, MA) a una concentración de 20 ng/ml.

Inhibidores farmacológicos

Se utilizaron los siguientes inhibidores farmacológicos: SP600125 10 o 5 μM (C4HD o T47D, respectivamente; Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU), PD980559 10 μM, LY294002 2 μM y Bay 11-7082 1 o 1,5 μM (C4HD o T47D respectivamente; todos de Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) para bloquear las vías de señalización JNK, MEK1/2, PI3-K/Akt y NF-κB respectivamente. Se utilizó 10 μM de AG825 (Calbiochem) para inhibir la fosforilación de ErbB-2, 2 μM del inhibidor de la familia de quinasas Src, 4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidina (PP2, Calbiochem) y 10 μM del inhibidor de la familia de PKC, GF109203X (Calbiochem). También se utilizó 10 μM del inhibidor de proteaseas de amplio espectro GM6001 y su control negativo correspondiente (Calbiochem). Los mismos fueron agregados 60 minutos antes del agregado de TNFα, o de HRG en ciertos ensayos. Se realizaron controles para verificar que DMSO (1:2000), utilizado como vehículo de los inhibidores farmacológicos, no modificaba la proliferación basal ni la inducida por TNFα. En ciertos ensayos se utilizó 0,5 μM de dasatinib (LC Laboratories, Woburn, MA, USA), un inhibidor dual de las quinasas de tirosina BCR/ABL y Src aprobado para su uso en pacientes con leucemia mielocítica crónica y leucemia linfoblástica aguda cromosoma Philadelphia positivo (Steinberg, 2007). También utilizamos al compuesto GW2974 (1 μM, Sigma Aldrich), análogo estructural del ditosilato de lapatinib, inhibidor dual de EGFR y ErbB-2 aprobado para su uso clínico en pacientes con cáncer de mama que sobreexpresa ErbB-2 y que es resistente a trastuzumab (Geyer et al, 2006).

Anticuerpos bloqueantes

El etanercept (Enbrel^{MR}, Pfizer, New York, NY, EEUU), es una proteína de fusión entre el TNFR2 y el Fc de la IgG humana, y fue generosamente provisto por Pfizer. Se usaron anticuerpos de conejo que bloquean al TNFR1 o TNFR2 murinos (Dentener et al, 1994), provistos por el Dr. W. A. Buurman, Universidad de Maastricht, Holanda.

En ciertos experimentos fueron utilizados 10 μg/ml de anticuerpo monoclonal anti ErbB-3 de ratón (Oncoprotein Ab-5, Neomarkers, Freemont, CA), o de anticuerpo monoclonal anti ErbB-4 de ratón (Oncoprotein Ab-3, Neomarkers) o una IgG de ratón.

El trastuzumab (Herceptin^{MR}, Genentech BioOncology, Roche Biochemicals, Indianapolis, IN, EEUU) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio IV del ErbB-2 y fue usado a una concentración de 10 µg/ml.

Animales y Tumores

Los experimentos fueron realizados en ratones hembras vírgenes de la cepa Balb/c, criados en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) – CONICET. Todos los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con los más altos estándares de cuidados animales, como se detalla en la guía del *National Insitute of Health* (NIH) de los EEUU para el cuidado y uso de animales de laboratorio, y fueron aprobados por el comité de ética del IBYME. La línea tumoral mamaria ductal progestágeno-dependiente C4HD, generosamente cedida por la Dra. Claudia Lanari, fue originada en ratones tratados con 40 mg de acetato de medroxiprogesterona (MPA) cada tres meses durante un año, y ha sido mantenido por transplante serial en animales singeneicos tratados con 40 mg MPA (Medrosterona, Laboratorios Craveri, Buenos Aires, Argentina) de depósito en el flanco opuesto al inóculo tumoral (Lanari et al, 1986; Salatino et al, 2004; Proietti et al, 2005). El tumor C4HD expresa receptores de progesterona (RP) y estrógenos (RE), carece de expresión de EGFR, sobreexpresa ErbB-2, exhibe altos niveles de ErbB-3 y baja expresión de ErbB-4 (Balana et al, 2001; Labriola et al, 2003; Lanari et al, 1989).

Se utilizaron ratones *nude* (stock N:NIH (S)-FoxnI nu, procedentes del NIH, EEUU) para los experimentos de xenotransplante de líneas celulares de cáncer de mama humano. Los mismos fueron criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de La Plata, y alojados en el bioterio del IBYME cuando los mismos tuvieron dos meses de edad. El transporte y alojamiento se realizó bajo condiciones de asepsia.

Cultivos primarios de células epiteliales C4HD

Se realizaron cultivos primarios de células epiteliales C4HD, a partir de tumores creciendo en ratones tratados con MPA, de acuerdo a lo descripto previamente (Elizalde et al, 1998; Balana et al, 1999; Balana et al, 2001). Tumores C4HD fueron extirpados asépticamente, y sometidos a una separación mecánica con tijeras seguida de digestión enzimática con tripsina y colagenasa durante 45 minutos a 37°C. Luego, las células se pusieron en suspensión en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12*

sin rojo fenol (DMEM, Sigma-Aldrich) + 2% de suero fetal bovino al cual se le había inactivado el complemento por calentamiento (65°C 30 min, SFB, Bioser, Buenos Aires, Argentina) y se dejaron sedimentar durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y las células remanentes se volvieron a poner en suspensión. Este procedimiento se repitió aproximadamente 10 veces, hasta que no se detectaron fibroblastos en el sobrenadante (Lanari et al, 1989). Las células epiteliales fueron cultivadas en DMEM más 10% SFB, durante 48 h para favorecer la adhesión de explantos de células epiteliales y luego fueron incubadas en DMEM + 2,5% SFB deprivado de esteroides por tratamiento con carbón activado (SFBCh) + 10 nM MPA durante otras 48-72 h. Luego de ello, se realizaron todos los experimentos descriptos. El cultivo de células epiteliales fue de una pureza mayor al 98%.

Líneas celulares

Las células T47D, SK-BR-3 y BT-474 fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). La línea celular T47D se mantuvo en DMEM + 10 % SFB. En experimentos donde se estimuló con TNFα humano (hTNFα), las células T47D se cultivaron en DMEM sin rojo fenol suplementado con 0,1% de SFBCh, y fueron sometidas a los mismos tratamientos descriptos para las células C4HD. La línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3 fue mantenida en medio McCoy's 5A + 10% SFB. Las células SK-BR-3 expresan EGFR y ErbB-3, sobreexpresan ErbB-2 y tienen baja a indetectable expresión de ErbB-4 (Plowman et al, 1993). Esta línea celular expresa ambos receptores de TNFα (resultados no mostrados). La línea celular de carcinoma mamario BT-474, fue mantenida en medio RPMI 1640 (referido aquí como RPMI) + 10% SFB, siguiendo las recomendaciones de la ATCC. Estas células sobreexpresan ErbB-2, tienen muy bajos niveles de los restantes receptores con actividad de tirosina quinasa y expresan TNFR1 y TNFR2. La línea celular JIMT-1 fue obtenida de la *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH* (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), y es mantenida en cultivo en DMEM + 10% SFB. Esta línea expresa ambos receptores de TNFα (resultados no mostrados). Los tratamientos con TNFα se realizaron siempre en células cultivadas en el medio de cultivo correspondiente con el agregado de 0,1% SFBCh (C4HD o T47D) o de 1% SFBCh (BT-474, SK-BR-3).

Ensayos de proliferación por incorporación de timidina-[^{3}H]

Las células fueron puestas en suspensión mediante tratamiento con tripsina- EDTA, y fueron sembradas en placas de 96 hoyos (P96) a una densidad de 1 - 2 x 10^4 células por hoyo. Dado que las células C4HD y T47D son extremadamente sensibles a los progestágenos, los experimentos se realizaron en DMEM + 0.1% SFBCh. En el caso de las células BT-474 y SK-BR-3, se utilizó 1% SFBCh en el medio de cultivo correspondiente. Siempre que se utilizaron inhibidores farmacológicos, los mismos fueron agregados al medio de cultivo 60 min antes del agregado de TNFα o HRG. Luego de 24 h de incubación en presencia de los diferentes estímulos o inhibidores, se agregó un pulso de 1 μCi de timidina-[^{3}H] (New England Nuclear, Dupont, Boston MA, EEUU; actividad específica: 20 Ci/mmol). Luego de 16 horas, las células fueron despegadas con tripsina-EDTA y cosechadas. Los ensayos se realizaron por octuplicado. En experimentos previos hemos demostrado que la incorporación de timidina-[^{3}H] correlacionaba con el número de células por hoyo (Rivas et al, 2008; Dran et al, 1995). Diferencias entre control y grupos experimentales fueron analizadas por ANoVA seguida de prueba *t* de Tukey entre grupos.

Ensayo de *Western blot*

Los extractos proteicos totales de células sometidas a los distintos tratamientos descriptos, fueron obtenidos a partir de homogenatos de células en *buffer* conteniendo Tris (pH 7,4) 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, SDS 0,1%, Mg_2Cl 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 10 μg/ml, pepstatina 5 μg/ml, aprotinina 5 μg/ml, Na_3VO_4 1 mM y NaF 25 mM. Los lisados fueron centrifugados a 12.000 g durante 30 min a 4° C, y se determinó el contenido proteico en el sobrenadante mediante el método de Bradford. Las proteínas fueron solubilizadas en un *buffer* de carga (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, 2β-Mercaptoetanol 0,7 mM y azul de bromofenol 0,01%) y resueltas por peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas fueron luego electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente fueron detectadas con los anticuerpos correspondientes. Luego de los lavados, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). Se utilizó el reactivo de luminiscencia *Enhanced*

Chemiluminiscence Plus (GE Healthcare, Bukinghamshire, Reino Unido) para la detección de la actividad peroxidasa.

Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados durante el desarrollo de la presente Tesis: p42/p44 MAPK (C-14), fosfo-p42/p44 MAPK (E-4), JNK (N-18), fosfo-JNK (G-7), ciclina D1(72-13G), Neu/ErbB-2 (C-18), ErbB-3 (C-17), fosfo-tirosina (PY99), p85 fosfatidilinositol 3-fosfato-quinasa (PI3-K) y Bcl-X_L (S-18), todos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU); Akt y fosfo-Ser473-Akt, fosfo-IκBα (Ser32/36), IκBα, fosfo-c-Src (Tyr416), c-Src (36D10), fosfo-ErbB-2 (Tyr1221/1222), fosfo-ErbB-2 (Tyr877/927), fosfo-p65 NF-κB, p65 NF-κB, TNFα y EGFR de Cell Signaling (Beverly, MA, EEUU), β-actina (Clone ACTN05) de Neomarkers (Freemont, CA, EEUU), y v-Src (ab-1) de Calbiochem. Los anticuerpos bloqueantes del TNFR1 y del TNFR2 fueron generosamente cedidos por el Dr. Wim Buurman, Universidad de Maastrich, Holanda (Dentener et al, 1994).

Ensayos de co-inmunoprecipitación

La asociación entre ErbB-2, ErbB-3 y p85 PI3-K fue estudiada mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Las mismas fueron realizadas como se describió previamente (Balana et al, 1999). Quinientos μg de lisados proteicos fueron incubados con 2 μg de un anticuerpo anti-ErbB-2 o anti-ErbB-3 durante 16 h a 4°C y los inmunocomplejos fueron capturados adicionando proteína A-agarosa (Santa Cruz Biotechnology) durante 2 h a 4°C en continua agitación. La mezcla fue lavada, las proteínas liberadas por calentamiento a 100ºC en *buffer* de siembra, y las proteínas fueron detectadas mediante ensayos de *Western blot*. Como control negativo de la inmunoprecipitación se utilizó suero preinmune de conejo.

Citometría de flujo y recuento celular

Las células C4HD fueron cosechadas con *buffer* fosfato salino (PBS)-EDTA 1 mM y fueron incubadas con un anticuerpo de conejo anti TNFR1 o TNFR2 murinos, lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo anti conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU). Para la detección por citometría de flujo del ErbB-2, se utilizó el anticuerpo ErbB-2 9G-6 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) seguida por incubación con un anticuerpo anti-ratón

conjugado a ficoeritrina (PE, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Las células fueron entonces lavadas y un total de 10^4 células por muestra fueron analizadas usando un citómetro FACScalibur (citometrías de TNFR) o FACSAria (citometrías de ErbB-2; ambos, Becton Dickinson, La Jolla, CA, EEUU). La tinción basal fue evaluada utilizando un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo al de detección. El análisis de los datos se realizó con el programa Cell Quest (Becton Dickinson) o WinMDI (J. Trotter). Para el análisis del ciclo celular, cultivos primarios de células C4HD fueron sometidos a los distintos tratamientos descriptos, fueron cosechadas y fijadas en etanol 70% por 24h a 4° C. Posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS, seguido de digestión por ARNsa (ARNsa A 50 U/ml) y tinción con ioduro de propidio (20µg/ml) durante 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad. El análisis del ciclo celular se realizó mediante el software Modfit LT (Beckton Dickinson).

Para los análisis de apoptosis y recuento celular, cultivos primarios de células C4HD o células BT-474 fueron ayunados durante 72 h en DMEM + 0,1% SFBCh y luego sometidos a los diferentes tratamientos por 96 h. La apoptosis se investigó mediante tinción de la superficie celular con Anexina V-FITC (Immunotech).

El recuento celular fue usado para corroborar que la incorporación de timidina correlaciona con la proliferación celular. Las células viables fueron contadas con el colorante de exclusión Azul Trypan.

Transfecciones transitorias

Las células C4HD, T47D, SK-BR-3 o BT-474 fueron transfectadas en forma transitoria con 1 µg de un vector con el gen reportero luciferasa bajo el control de sitios κB del promotor HIV (generosamente provisto por el Dr. M. Bell, Mayo Clinic, Rochester, MN, EEUU) 24 h en DMEM suplementado con SFBCh 2,5% + MPA 10 nM (C4HD), DMEM + 10% SFB (T47D), McCoy's 5A + 10% SFB (SK-BR-3) o RPMI + 10% SFB (BT-474) siempre en la ausencia antibióticos. Además, se utilizaron las siguientes construcciones: promotor de ciclina D1-Luc (provisto por el Dr R. Pestell, Northwestern University Medical School, Chicago, IL), ErbB-2 salvaje humano (Dr T. Akiyama, Gumma University, Gumma, Japón), ErbB-2-YFP quinasa negativo (KN-ErbB-2) (Dr A. Gertler, Protein Laboratories Rehovot, Israel) (Eisenberg et al, 2004) y ErbB-2-Y877F (Dr O. Segatto, Centro Recerca Sperimentale, Roma, Italia) (Segatto et al, 1990). El vector de expresión de TNFα

murino (pS23SMTNF) y su correspondiente vector vacio (pSV2neo) fueron adquiridos a la Colección Belga Cooordinada de Microorganismos (BCCM-LMBP) (Xu et al, 1999). Se utilizaron los reactivos de transfección FuGENE 6 o FuGENE HD (Roche Biochemicals, Indiana, IN, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para corregir variaciones en la eficiencia de transfección se cotransfectó, en todos los casos, con 10 ng del plásmido de expresión CMV-pRL renilla (Promega, Madison, WN, EEUU). Como control, las células fueron transfectadas con un vector pPGL3-luc vacío. En ciertos experimentos, en los cuales se evaluó el rol de p42/p44 MAPK, JNK, Akt o IκBα, sobre la activación de NF-κB, se utilizaron mutantes dominantes negativas de esas vías. Con esa intención, las células C4HD y T47D se co-transfectaron con 0,5 μg de pCDNA Raf 301, que bloquea la vía de Raf/MEK/p42/p44 MAPK o con 1 μg de pEBG SEK kr (que bloquea la activación de JNK), generosamente provistas por el Dr. O. Coso (Universidad de Buenos Aires), junto con el vector κB-lucifersa y pRL renilla. Además usamos 0,5 μg de un plásmido codificante para la dominante negativa de la subunidad de p85 de PI3-K (Δp85), provista por el Dr. Y. Shimizu (Universidad de Minnessota, MN), o 0,5 μg de IκB super-represor (ssIκB) que contiene mutaciones puntuales en las serinas 32 y 36, y por lo tanto impide la fosforilación y proteólisis de IκBα (cedida por el Dr. B. Kaltschmidt, Universidad de Freiburg, Alemania). Las células fueron tratadas con TNFα, muteínas de TNFα, o preincubadas con SP600125, PD98059, LY294002 o Bay 11-7082 por 60 min y tratadas con TNFα durante 18 h o permanecieron sin tratar en DMEM + 0,1% SFBCh. Las células fueron lavadas una vez con PBS y fueron lisadas en *Passive Lysis Buffer* 1X (Promega) usando un ciclo de congelado y descongelado. La presencia de las actividades luciferasa de luciérnaga y de renilla fue analizada utilizando el sistema *Dual Luciferase System* (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La actividad transcripcional fue estandarizada como el cociente entre la actividad luciferasa por unidad de actividad luciferasa de renilla. Para cada punto de datos, se analizaron triplicados.

ARN de interferencia

Los ARN de interferencia (siRNAs) dirigidos contra el ARNm de ErbB-2 de ratón fueron sintetizados por Dharmacon, Inc (Lafayette, CO, EEUU). (ErbB-2siRNA#02: antisentido, 5'GAUGUCCUCCGUAAGAAUA3', ErbB-2siRNA#03 antisentido 5'GAUGGUGCUUACUCAUUGA3', ErbB-2siRNA#04 antisentido

5'GGAAUCCUAAUCAAACGA A3'). Un oligonucleótido cuya secuencia no es alineable con blancos celulares fue usado como control negativo (Dharmacon). La transfección de siRNAs y pcDNA3.1 o el vector de expresión de ErbB-2 humano y el vector κB-luciferasa + CMV-pRL fue realizada usando el reactivo de transfección DharmaFECT Duo siguiendo el protocolo usual, con 25 nM de siRNA durante 3 días. El tratamiento de las células y la medición de actividad reportera se realizaron como se describió previamente.

Crecimiento del tumor C4HD *in vivo*

Ratones hembras vírgenes de la cepa Balb/c fueron inoculados subcutáneamente (s.c.) en el flanco izquierdo con un fragmento de tumor C4HD de ~1 mm^3, y fueron inyectados s.c. cerca del sitio de implantación del tumor con 10 ng mTNFα/día en 50 µl de PBS, o con 50 µl PBS/día, en ambos casos en ausencia de MPA. Los animales fueron monitoreados cuidadosamente, y se registró semanalmente el peso corporal. El ancho (A) y largo (L) del tumor fueron medidos con un calibre Vernier tres veces por semana, y el volumen tumoral (mm^3) se calculó como $(L \times A^2)/2$. Al día 16, cuando los tumores habían alcanzado un volumen promedio de 60-70 mm^3, los animales tratados con TNFα fueron separados al azar en cuatro grupos experimentales y tratados como se detalla: 1) 10 ng mTNFα/día; 2) 10 ng mTNFα/día + 5 mg/kg Bay 11-7082 los días 16, 19 y 21; 3) 10 ng mTNFα/día + vehículo los días 16, 19 y 21; o 4) 50 µl PBS/día. El Bay 11-7082 fue inyectado intraperitonealmente (i.p.) disuelto en 0,5% metilcelulosa (200 µl/ratón). La tasa de crecimiento tumoral se calculó como la pendiente de las curvas de crecimiento. Al día 26, los animales fueron sacrificados y el tumor removido. Los tejidos destinados a estudios moleculares fueron mantenidos a -80º C, y los que se utilizarían para análisis histopatológico de rutina (H&E) fueron fijados en formol neutro 10%. También fueron sometidas a estudio histológico muestras de hígado, pulmón, bazo y riñón. Todas las muestras fueron examinadas por un patólogo que desconocía el tratamiento que había recibido cada animal. Varios cortes de cada tumor u órgano fueron evaluados.

En los experimentos en los que se utilizó etanercept, el tumor C4HD fue implantado en ratones *nude*. Brevemente, un fragmento del tumor C4HD de ~1 mm^3, proveniente de ratones Balb/c, fue implantado en el flanco de ratones *nude* en presencia de un depósito de liberación lenta de MPA. Los animales fueron inyectados i.p. con 5 mg/kg de etanercept disuelto en PBS estéril.

Crecimiento del tumor JIMT-1 *in vivo*

Ratones hembras vírgenes *nude* fueron inoculados subcutáneamente (s.c.) en el flanco izquierdo con 3 x 10^6 células JIMT-1. Los animales fueron monitoreados cuidadosamente, y se registró semanalmente el peso corporal. El ancho (A) y largo (L) del tumor fueron medidos con un calibre Vernier tres veces por semana, y el volumen tumoral (mm^3) se calculó como (L x A^2)/2. Cuando los tumores se hicieron palpables, los animales fueron separados al azar en cuatro grupos experimentales y tratados como se detalla: 1) IgG humana 5 mg/kg, dos veces por semana; 2) etanercept 5 mg/kg, dos veces por semana; 3) trastuzumab 5 mg/kg, una vez por semana e IgG humana 5 mg/kg una vez por semana; o 4) etanercept 5 mg/kg dos veces por semana + trastuzumab 5 mg/kg una vez por semana. El etanercept y el trastuzumab fueron inyectados i.p. disueltos PBS estéril (100 µl/ratón). La tasa de crecimiento tumoral se calculó como la pendiente de las curvas de crecimiento.

Inmunohistoquímica

Los tejidos fijados en formol durante 16-20 h y luego embebidos en parafina. Posteriormente fueron cortados en secciones de 4 µm, y luego desparafinados en xileno y alcoholes de distinta gradación. Las tinciones fueron realizadas manualmente, las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno 3% durante 5 min, y la recuperación de antígenos se realizó en un *buffer* conteniendo citrato de sodio 10 mM pH 6 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La expresión de la subunidad p65 de NF-κB y fosfo-Akt se estudiaron en secciones consecutivas de tejido usando los anticuerpos de p65 (C22B4) y Akt (Ser 473), ambos de Cell Signaling, o un anticuerpo control de isotipo, y luego se desarrolló la reacción usando el sistema de detección EnVision (Dako Cytomation Corp). Los cortes fueron tratados con 3,3-diaminobencidina como cromógeno durante 1 min, y se realizó tinción de contraste con hematoxilina. La expresión fue analizada por un patólogo que desconocía el tratamiento que había recibido cada muestra.

La inmunomarcación para ErbB-2, por su parte, se realizó siguiendo las recomendaciones de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) 2006 (Wolff et al, 2007). Al protocolo indicado arriba se le hicieron algunas modificaciones: para la recuperación antigénica, los cortes fueron llevados al horno de microondas en presencia de una solución de ácido cítrico 10 mM (alta potencia, durante un total de

20 min). Luego se realizaron tres lavados de 1 min con agua destilada y se agregó una solución de metanol + H_2O_2 3%. Se lavó con agua destilada durante 20 min y posteriormente con buffer Tris 1 mM (1 a 2 min). Se incubó con el anticuerpo policlonal de conejo anti ErbB-2 humano A0485 (1:500) durante 16-18 a 4°C. Se realizaron tres lavados con Tris de 5 min c/u. Se dejó secar y se aplicó el reactivo Envision (Dako, Carpinteria, California, EEUU) durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con Tris 1mM de 5 min c/u y se aplicó una solución al 2% de diaminobencidina durante 5 min. Se realizó un lavado con agua destilada y se realizó una tinción de contraste con hematoxilina. Luego el preparado se deshidrató en una serie de alcoholes de graduación creciente y se montó utilizando el medio de montaje Vectashield (Vector, Burlingame, California, EEUU). Las secciones fueron evaluadas por un patólogo experimentado que desconocía el protocolo experimental y los resultados de expresión de ErbB-2 se puntuaron siguiendo las guías de ASCO/CAP (Wolff et al, 2007). De esta forma la puntuación fue de 0 cuando no se observo marcación, 1+ si la marcación fue débil e incompleta de membrana plasmática en cualquier proporción de células tumorales, 2+ marcación completa de membrana plasmática que es no uniforme o débil pero que se observa la circunferencia celular en al menos un 10% de las células tumorales o marcación intensa y completa de la membrana en ≤ 30% de las células tumorales y 3+ tinción intensa y completa de la membrana en más del 30% de las células tumorales.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Células C4HD, SK-BR-3 o BT-474 fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio y fueron incubadas en medio DMEM + 0,1% SFBCh (C4HD) o McCoy's 5A + 1% SFBCh o RPMI 1640 + 1% SFBCh (BT-474) en presencia o ausencia de 20 ng/ml de hTNFα durante 30 min. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol frío y luego fueron bloqueadas con PBS + 1% albúmina sérica bovina (BSA) a temperatura ambiente. La proteína ErbB-2 fue localizada utilizando el anticuerpo ErbB-2 9G-6 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) seguida por incubación con un anticuerpo anti-ratón conjugado a rodamina (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). En experimentos control no se detectó tinción usando el anticuerpo secundario solamente o con el anticuerpo anti ErbB-2 preincubado con el péptido bloqueante correspondiente. Los núcleos fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-

fenilindol (DAPI). Un mínimo de 30-40 células fueron analizadas usando un microscopio confocal laser Nikon C1.

Ensayo de fosforilación in vitro con ATP no radioactivo

Las células C4HD fueron preincubadas o no con 10 μM de PP2 durante 60 min y luego fueron tratadas o no con TNFα durante 5 min. Las células fueron lisadas en un *buffer* de lisis para quinasas (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 1% NP-40, 2.5 mM MgCl2) y la quinasa c-Src fue inmunoprecipitada a partir de 500 μg de extractos proteicos usando un anticuerpo anti-v-Src (Ab-1, Calbiochem). ErbB-2 fue inmunoprecipitado a partir de 500 μg de extractos proteicos de células C4HD no estimuladas. ErbB-2 así inmunoprecipitado fue sometido a un ensayo de fosforilación *in vitro* con c-Src inmunoprecipitada de cada tratamiento. La reacción fue realizada incubando los inmunocomplejos conteniendo a c-Src con el ErbB-2 inmunoprecipitado como sustrato, en 30 μl de *buffer* quinasa con el agregado de 3.3 mM DTT y 100 μM de ATP durante 30 min a 30ºC, como se describió previamente (Salatino et al, 2006). Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, los geles transferidos a membranas de nitrocelulosa e inmunoblots realizados utilizando anticuerpos anti Tyr877/927ErbB-2. Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re incubadas con un anticuerpo anti ErbB-2. La parte inferior de la membrana fue revelada con un anti c-Src total. Como control de especificidad, 500 μg de extractos proteicos de células C4HD tratadas con TNFα 5 min fueron inmunoprecipitadas con suero preinmune de ratón y sometidas a los mismos protocolos de fosforilación *in vitro*.

Análisis estadístico

Las diferencias entre el control y los grupos experimentales fueron analizadas mediante ANoVA, seguida por prueba *t* de Tukey. El análisis de regresión lineal se realizó sobre curvas de crecimiento, y las pendientes fueron comparadas mediante ANoVA para determinar la significación estadística. Los análisis estadísticos entre los histogramas obtenidos por citometría de flujo fue realizada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En todos los estudios, una diferencia de $P<0,05$ fue considerada significativa.

RESULTADOS

RESULTADOS

CAPÍTULO I
ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR TNFα DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

El TNFR1 y el TNFR2 inducen de manera diferencial la señalización vía p42/p44 MAPK, JNK y Akt

Tal como se expuso en la introducción, el TNFα ejerce sus efectos biológicos a través de los receptores TNFR1 y TNFR2 (Rothe et al, 1992). Sin embargo, aún no ha sido explorada su participación en los efectos proliferativos del TNFα en cáncer de mama. En nuestro laboratorio hemos demostrado que el TNFα induce el aumento de la proliferación de las células C4HD, provenientes del tumor mamario murino dependiente de progestágenos C4HD (Rivas et al, 2008). Por ese motivo nos interesó determinar la presencia de los receptores de TNFα mediante *Western blot* en extractos proteicos de células C4HD. Se incluyeron extractos de timocitos murinos como control positivo de la expresión de ambos receptores. La Fig. 7A muestra que las células C4HD tienen niveles similares de TNFR1 a los observados en timocitos, en tanto que la expresión de TNFR2 es más baja. El TNFR2 reveló dos componentes del receptor de 70 y 60 kDa (Fig. 7A), similar a lo descripto por Sheehan et al en células L929 (Sheehan et al, 1995).

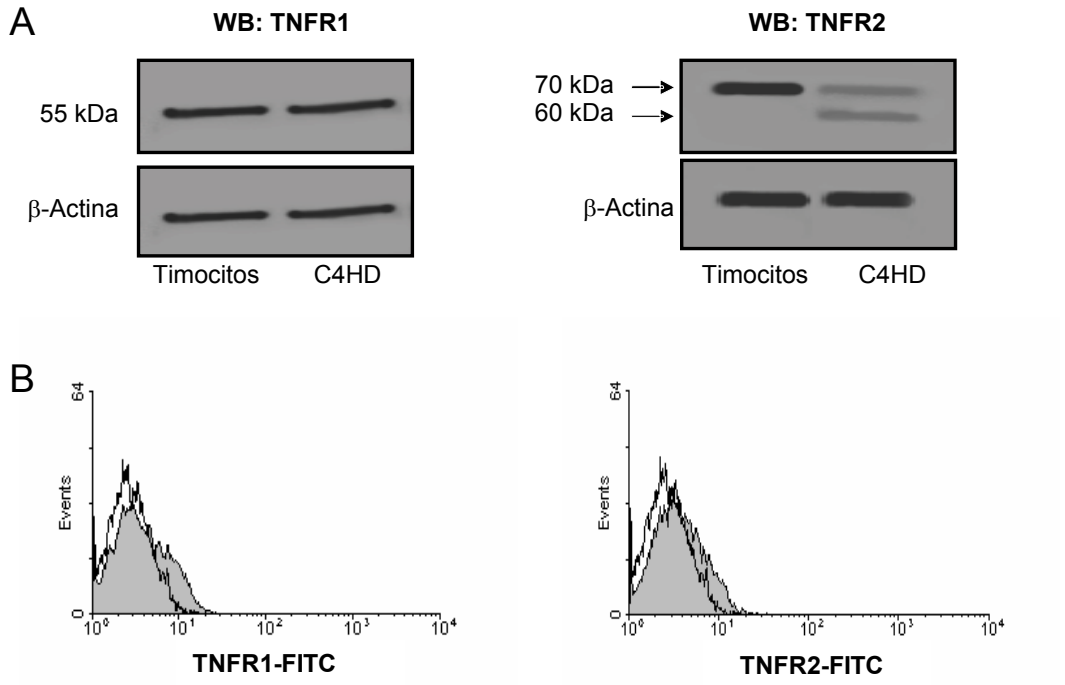


Fig. 7 Expresión de TNFR1 y TNFR2 en células C4HD. A Cincuenta μg de proteínas de células C4HD o de lisados de timocitos fueron sometidos a SDS-PAGE y la inmunodetección se realizó con anticuerpos anti TNFR1 o TNFR2. B Células C4HD fueron evaluadas mediante una inmunofluorescencia indirecta usando como anticuerpo primario un anti TNFR1 o TNFR2 y como secundario uno conjugado a FITC. La fluorescencia fue analizada por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de la expresión de TNFR1 y TNFR2. Las áreas grises definen la expresión de TNFRs, superpuesta a los histogramas de células incubadas con un anticuerpo irrelevante (área blanca). Los experimentos mostrados son representativos de un total de tres. WB *Western blot*.

Los datos del *Western blot* fueron confirmados mediante análisis por citometría de flujo de la expresión en la superficie celular de ambos receptores, utilizando anticuerpos anti TNFR1 o anti TNFR2. En la Fig. 7B, se observan niveles similares de ambos receptores en células C4HD.

Con el objetivo de estudiar la contribución de cada TNFR en la activación de las vías de transducción de señales p42/p44 MAPK, JNK y Akt que participan en la proliferación de las células C4HD (Rivas et al, 2008), se utilizaron anticuerpos bloqueantes de los TNFR, así como también muteínas de TNFα murino. Las células C4HD fueron preincubadas con los anticuerpos bloqueantes del TNFR1 o TNFR2 previo al tratamiento con TNFα. Como se muestra en la Fig. 6, el bloqueo de la unión TNFα-TNFR1 resultó en la inhibición de la activación de p42/p44 MAPK, JNK y PI3-K/Akt inducida por TNFα (Fig. 8, calle 3). De manera similar, el bloqueo de la unión de TNFα a TNFR2, resultó en la inhibición de la capacidad de TNFα de activar las tres vías de transducción mencionadas (Fig. 8, calle 4). Anticuerpos irrelevantes

del mismo isotipo (IgG de conejo) no interfirieron sobre la acción del TNFα en las mismas condiciones experimentales.

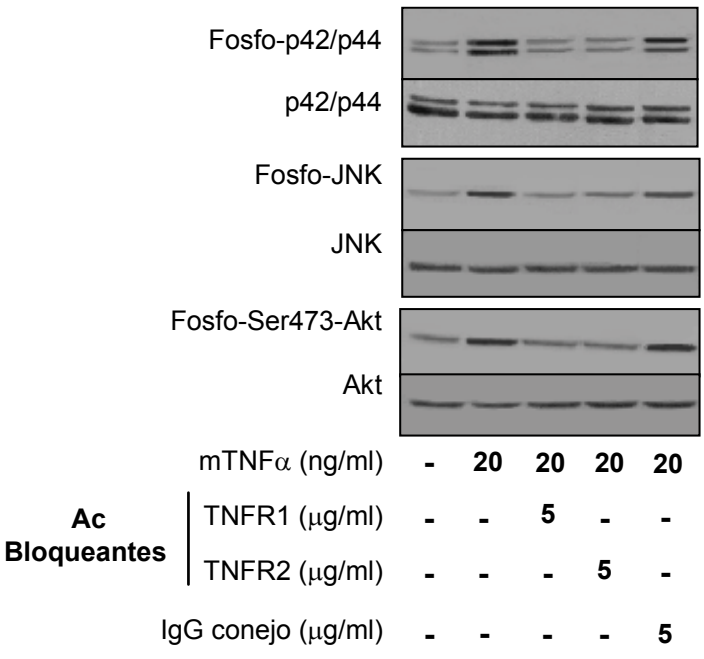


Fig. 8 Participación de TNFR1 y TNFR2 en la activación de las vías de transducción de señales p42/p44 MAPK, JNK y Akt: anticuerpos bloqueantes. Las células C4HD fueron pre-incubadas durante 60 min en ausencia o presencia de 5 μg/ml de anticuerpos bloqueantes anti TNFR1 o anti TNFR2, previo al agregado de mTNFα durante 5 o 15 min. Extractos proteicos totales se utilizaron para realizar *Western blots* de fosfo-p42/p44 MAPK, o fosfo-JNK y fosfo-Akt, respectivamente. Como control de especificidad se utilizó un anticuerpo irrelevante (IgG de conejo). Las membranas fueron sometidas a *stripping* y se las reveló con un anticuerpo anti MAPK, JNK o Akt total para corregir variaciones debidas a diferencias de cargas. Los experimentos mostrados son representativos de cuatro realizados.

Para confirmar estos resultados, usamos muteínas de mTNFα que son moléculas de TNFα con mutaciones específicas que les confieren la capacidad de unirse de manera selectiva al TNFR1 o al TNFR2 murinos. Tres muteínas distintas fueron utilizadas: un mTNFα que no se une a TNFR2 murino, pero sí al TNFR1 (R1-TNF); un hTNFα que une ambos receptores murinos (R1R2-TNF); y un mTNFα que se une específicamente a TNFR2 murino (R2-TNF). Observamos que R1-TNF y R1R2-TNF estimularon la fosforilación de p42/p44 MAPK, Akt y JNK a un nivel similar al inducido por mTNFα salvaje en células C4HD (Fig. 9, calles 3 y 5 versus calle 2). Por otro lado, el R2-TNF fue capaz de activar a p42/p44 MAPK, pero no a JNK y Akt (Fig. 9, calle 4), en células C4HD. Además, se utilizó hTNFα como otra herramienta para estimular específicamente al TNFR1, dado que es capaz de unirse a TNFR1 pero no a TNFR2 murino (Rothe et al, 1992). Observamos que hTNFα también fue capaz de inducir la activación de las tres quinasas a un nivel similar al del mTNFα (Fig. 9, calle 6) o al de R1-TNF (calle 3).

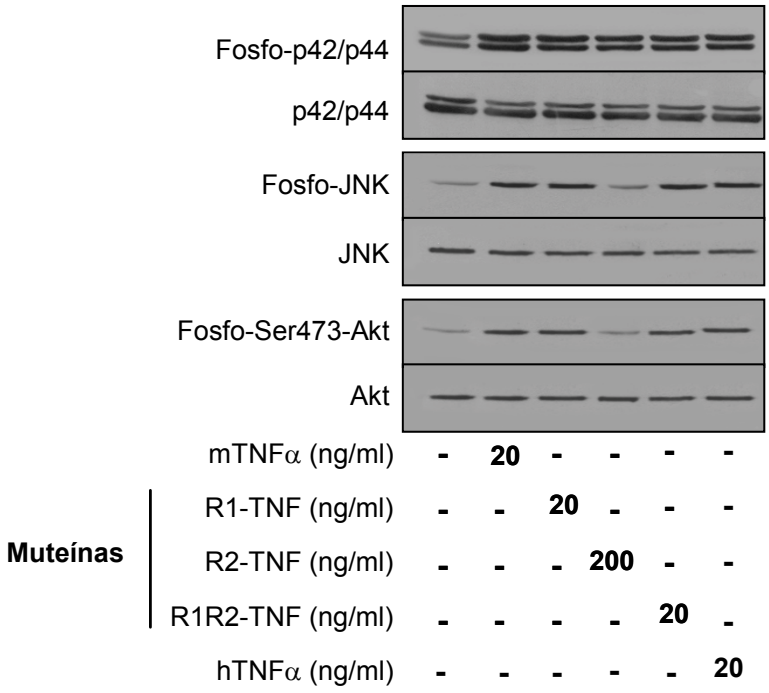


Fig. 9 Participación de TNFR1 y TNFR2 en la activación de las vías de transducción de señales p42/p44 MAPK, JNK y Akt: muteínas. Las células C4HD fueron incubadas durante 5 (p42/p44 MAPK) o 15 min (JNK y Akt) con muteínas específicas del TNFR1 (R1-TNF, 20 ng/ml), del TNFR2 (R2-TNF, 200 ng/ml) o de ambos receptores (R1R2-TNF, 20 ng/ml). Se incluyó al mTNFα como control, y al hTNFα como una herramienta para estimular específicamente al TNFR1 murino. Extractos proteicos totales se utilizaron para realizar *Western blots* de fosfo-p42/p44 MAPK, fosfo-JNK y fosfo-Akt. Las membranas fueron sometidas a *stripping* y se las reveló con un anticuerpo anti MAPK, JNK o Akt total para corregir variaciones debidas a diferencias de cargas. Los experimentos mostrados son representativos de cuatro realizados.

El TNFR1 y el TNFR2 están involucrados en la proliferación del cáncer de mama inducida por TNFα

Luego caracterizamos la participación de los TNFRs en la proliferación de las células C4HD. Para ello se utilizaron nuevamente como herramienta a los anticuerpos bloqueantes y a las muteínas de TNFα. La preincubación de estas células con concentraciones saturantes de anticuerpos de conejo neutralizantes del TNFR1 o TNFR2 murinos, redujeron significativamente la proliferación inducida por TNFα en ensayos de incorporación de timidina-[^{3}H], sugiriendo que cada receptor juega un rol importante *per sé* en la proliferación de las células C4HD inducida por TNFα (Fig. 10). La adición de anticuerpos de conejo del mismo isotipo, no tuvieron efecto sobre la proliferación inducida por el TNFα en las células C4HD.

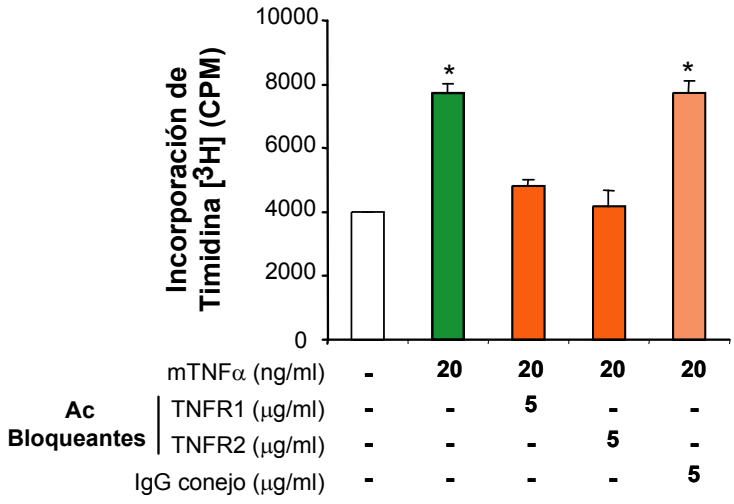


Fig. 10 Participación de TNFR1 y TNFR2 en la proliferación de células de cáncer de mama inducida por TNFα: anticuerpos bloqueantes. Las células se pre-incubaron durante 60 min con 5 μg/ml de anticuerpos bloqueantes anti TNFR1 o TNFR2, previo al agregado de mTNFα. Anticuerpos control de isotipo (IgG de conejo) fueron también agregados en la misma condición. La proliferación se midió a las 48 h de cultivo, estando presente un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h. Los datos mostrados son media ± ES de tres experimentos. * P<0,001 vs. control.

Luego, se utilizaron las muteínas, en concentraciones entre 2 y 200 ng/ml. La proliferación alcanzada en respuesta a R1-TNF fue semejante a la obtenida con TNFα salvaje (Fig. 11), alcanzando el máximo a 20 ng/ml. Notablemente, la adición de R2-TNF, solo indujo un pequeño aumento de la proliferación de las células C4HD a una concentración de 200 ng/ml, no pudiendo la misma ser aumentada aún en presencia de mayores concentraciones (resultado no mostrado). Finalmente, R1R2-TNF resultó ser la más efectiva en inducir la proliferación, dado que 200 ng/ml fueron capaces de aumentar en un 50% la proliferación inducida por TNFα salvaje (Fig. 11). También se observó que el hTNFα es capaz de inducir la proliferación, al mismo nivel que el mTNFα (Fig. 11).

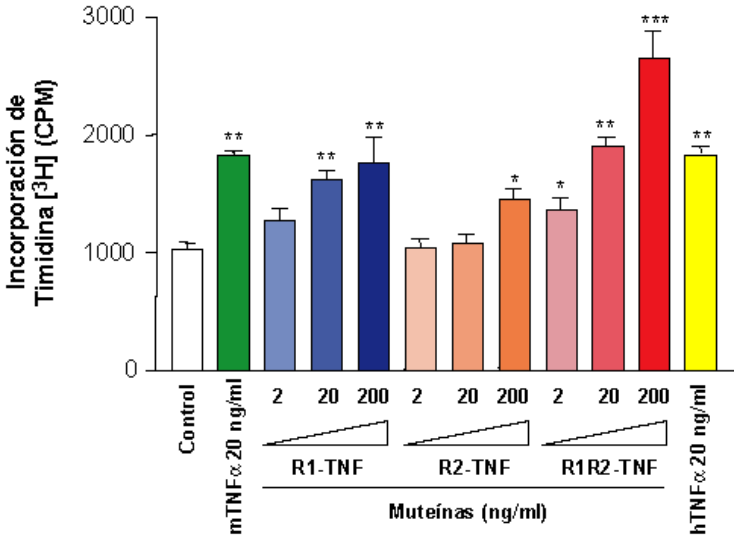
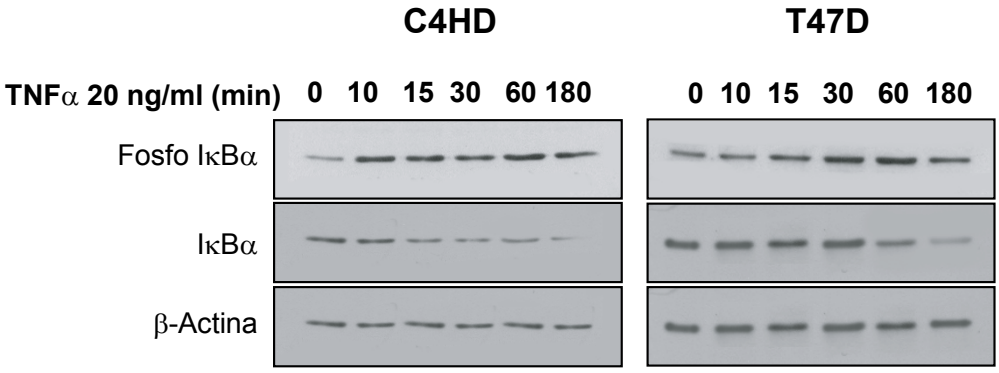


Fig. 11 Participación de TNFR1 y TNFR2 en la proliferación de células de cáncer de mama inducida por TNFα: muteínas. Las células se incubaron con 2, 20 o 200 ng/ml de muteínas específicas del TNFR1 (R1-TNF), del TNFR2 (R2-TNF) o de ambos receptores (R1R2-TNF). La proliferación se midió a las 48 h de cultivo, estando presente un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h. Se incluyó al mTNFα como control, y al hTNFα como una

herramienta para estimular específicamente al TNFR1 murino. El experimento mostrado es representativo de tres realizados. * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs. control.

El TNFα induce la activación transcripcional de NF-κB vía TNFR1 a través de la activación de JNK y Akt

El factor de transcripción NF-κB es un mediador común de los efectos del TNFα en diversos modelos. La activación de NF-κB inducida por TNFα a través de la vía canónica involucra la fosforilación, ubiquitinación y degradación del inhibidor citoplasmático IκBα. Para determinar si el factor de transcripción NF-κB cumple algún rol en la proliferación de células de cáncer de mama inducida por TNFα y estudiar el curso temporal de la fosforilación y/o degradación de IκBα, estimulamos células C4HD y T47D con TNFα durante 0-180 min y realizamos ensayos de *Western blot* utilizando anticuerpos contra la forma fosforilada en Ser 32/36 de IκBα, y de IκBα total. Observamos que el TNFα indujo la fosforilación de IκBα, alcanzando el nivel máximo a los 10 min en células C4HD y a los 30 min en T47D (Fig. 12). La degradación de IκBα fue detectada a partir de los 60 min de estimulación con TNFα en ambos tipos celulares (Fig. 12). Además, como otra manera corroborar que el TNFα activaba a NF-κB, las C4HD o T47D fueron transfectadas de manera transitoria con una construcción reportera κB-luciferasa. El tratamiento de células C4HD y T47D con TNFα indujo un aumento de 3 y 4 veces en la actividad transcripcional de NF-κB respectivamente, en relación al control no estimulado (Fig. 13). El bloqueo de la actividad NF-κB mediante el uso de Bay 11-7082, inhibidor farmacológico de la fosforilación de IκBα (Pierce et al, 1997), abolió la capacidad del TNFα de activar a la construcción reportera, en ambos tipos celulares (Fig. 13). Como control de especificidad del efecto, se realizó una transfección con un plásmido sin sitios de unión a NF-κB (pGL3 basic) y no se observaron modificaciones por el agregado de TNFα.



◄ **Fig. 12 El TNFα induce la fosforilación de IκBα en células de cáncer de mama.** Las células C4HD y T47D fueron tratadas entre 0 y 180 min en DMEM + 0,1% SFBCh suplemen-tado con mTNFα o hTNFα 20 ng/ml, respectivamente. Veinticinco µg de proteínas de extractos celulares, obtenidos como se describe en Materiales y Métodos, fueron sometidos a SDS-PAGE y revelados con anticuerpos anti fosfo IκBα (*primeros paneles*), anti IκBα (*segundos paneles*) y β-actina (*terceros paneles*), luego de sucesivos procesos de *stripping*. El experimento mostrado es representativo de tres realizados.

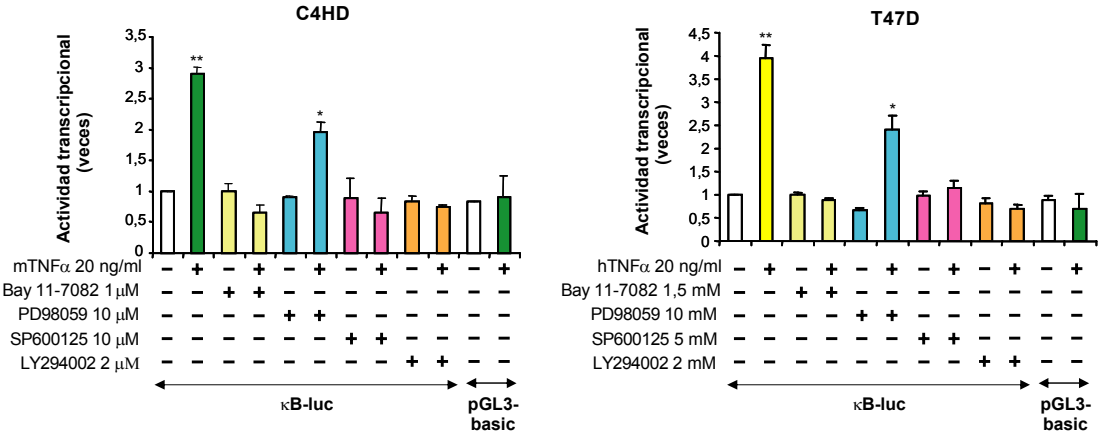


Fig. 13 El bloqueo de la actividad de JNK y PI-3K/Akt inhibe la actividad transcripcional de NF-κB inducida por TNFα en células de cáncer de mama: ensayos de actividad κB-luciferasa. Las células C4HD y T47D fueron transfectadas de manera transitoria con 1 µg/hoyo de una construcción κB-luciferasa y con 10 ng/hoyo de un vector de expresión CMV-pRL renilla como control interno. Las células fueron pre-incubadas o no durante 60 min con PD98059 10 µM, SP600125 10 µM (C4HD) o 5 µM (T47D), LY294002 2 µM, Bay 11-7082 1 µM (C4HD) o 1,5 µM (T47D) previo al agregado de TNFα durante 18 h. Las células fueron también transfectadas con un pGL3-luc que carece de la inserción κB. En todos los casos, las células fueron cosechadas y homogeneizadas. Las actividades luciferasa y renilla fueron medidas como se describe en Materiales y Métodos. El experimento mostrado es representativo de tres realizados. * P<0,05, **P<0,01 vs. control.

Si bien está ampliamente reportado que el TNFα activa diversas vías de señalización, como PI3-K/Akt, que convergen en la activación del factor de transcripción NF-κB (Ozes et al, 1999), la participación de p42/p44 MAPK y JNK en su regulación transcripcional ha sido poco explorada. Por ello, estudiamos la contribución de las vías de señalización activadas por el TNFα en la activación transcripcional de NF-κB. Para determinar si p42/p44 MAPK, JNK y Akt afectan la actividad de NF-κB inducida por TNFα, examinamos los niveles de fosforilación de IκBα en células C4HD y T47D pre-tratadas con los respectivos inhibidores farmacológicos y luego estimuladas durante 10 o 30 min con TNFα. La inhibición de Akt con LY294002 y la de JNK con SP600125 previnieron efectivamente la

fosforilación de IκBα, mientras que la inhibición de p42/p44 MAPK, por PD98059 o U0126 (otro inhibidor selectivo de MEK1/2), no afectó significativamente la fosforilación de IκBα en las células C4HD (Fig. 14 y no mostrado). En la línea celular T47D, la inhibición de la vía de p42/p44 MAPK inhibió de manera parcial la fosforilación de IκBα (Fig. 14). Bay 11-7082 fue incluido para confirmar que las concentraciones utilizadas fueron efectivas para inhibir la fosforilación de IκBα. También utilizando células C4HD y T47D transfectadas con la construcción κB-luciferasa, observamos que la adición de SP600125 o LY294002 (inhibidores de JNK y PI3-K, respectivamente) fueron capaces de inhibir por completo la la activación de NF-κB inducida por TNFα. Por su parte, la inhibición de p42/p44 MAPK por PD98059 o U0126, inhibió parcialmente la actividad luciferasa en respuesta a TNFα (Fig. 13).

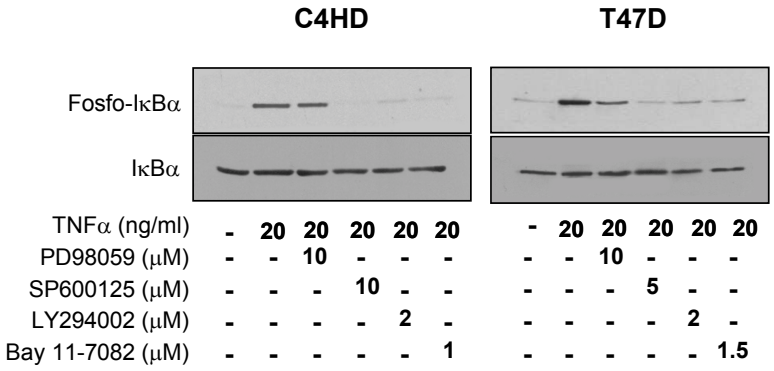


Fig. 14 El bloqueo de la actividad de JNK y PI-3K/Akt inhibe la fosforilación de IκBα. Las células C4HD o T47D fueron pre-incubadas o no durante 60 min con PD98059 10 μM, SP600125 10 μM (C4HD) o 5 μM (T47D), LY294002 2 μM, Bay 11-7082 1 μM (C4HD) o 1,5 μM (T47D) previo al agregado de TNFα durante 10 (C4HD) o 30 min (T47D). Veinticinco μg de proteínas de extractos celulares, obtenidos como se describe en Materiales y Métodos, fueron sometidos a SDS-PAGE y revelados con anticuerpos anti fosfo IκBα (*primeros paneles*) y anti IκBα (*segundos paneles*) luego de un paso de *stripping*. El experimento mostrado es representativo de tres realizados.

Otro enfoque metodológico para el estudio de la participación de p42/p44 MAPK, JNK y Akt mediante una aproximación que no involucre la utilización de inhibidores farmacológicos fue el empleo de mutantes dominantes negativas que interfieren con la activación de las vías de transducción arriba mencionadas. Se observó que la transfección de las células C4HD o T47D con Raf 301, que impide la activación de p42/p44 MAPK, no impidió la activación de NF-κB inducida por TNFα (Fig. 15). Por su parte, el bloqueo de la activación de PI3-K/Akt y JNK con vectores de expresión codificantes para la mutante dominante negativa de la subunidad p85 de PI3-K (Δp85) o para la forma dominante negativa de SEK-1, respectivamente,

suprimieron la activación de NF-κB inducida por TNFα. Una construcción súper-represora de la quinasa IκBα (IκBss) fue incluida como control. La Fig. 16 muestra *Western blots* representativos de la efectividad de estas construcciones.

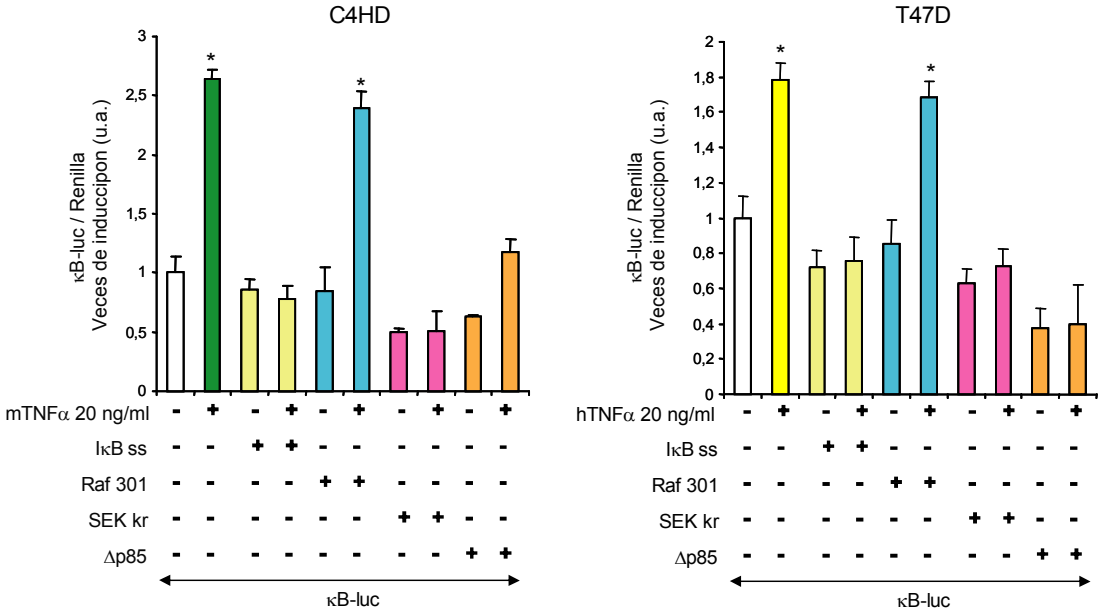
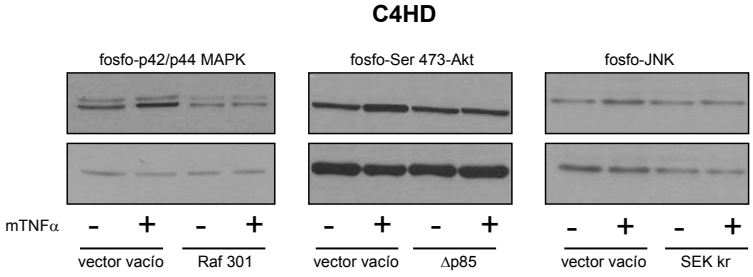


Fig. 15 El bloqueo de la actividad de JNK y PI-3K/Akt inhibe la actividad transcripcional de NF-κB inducida por TNFα en células de cáncer de mama: uso de mutantes dominantes negativas en ensayos de actividad κB-luciferasa. Las células C4HD (*panel izquierdo*) y T47D (*panel derecho*) fueron transfectadas de manera transiente con 0,5 µg/hoyo de P6 de IκB-súper-represor (IκBss, un inhibidor de la fosforilación de IκBα), Raf 301 o SEK kr (dominante negativo la quinasa activadora de p42/p44 MAPK o de JNK, respectivamente), o con Δp85 (dominante negativo de la PI-3K), junto con 1 µg/hoyo de la construcción κB-luciferasa y 10 ng/hoyo de CMV-pRL renilla como control interno. Las células se estimularon durante 18 h y luego fueron cosechadas y homogeneizadas. Las actividades luciferasa y renilla fueron medidas como se describe en Materiales y Métodos. El experimento mostrado es representativo de tres realizados. *P<0,001 vs. control.

Otro punto de interés fue evaluar la capacidad de cada TNFR de inducir la activación transcripcional de NF-κB mediante el uso de muteínas. La muteína R1-TNF aumentó 2 veces la actividad transcripcional de NF-κB y la R1R2-TNF indujo 3 veces de activación. Por su parte, la muteína R2-TNF indujo a NF-κB pobremente (0,5 veces de inducción, Fig. 17).

Fig. 16 Efectividad de las mutantes dominantes negativas para inhibir las vías de transducción correspondientes. Las células C4HD fueron transfectadas de



manera transiente con 0,5 µg/hoyo de P6 de Raf 301, SEK kr o Δp85. Luego de 48 h de transfección fueron ayunadas 24 h y estimuladas con mTNFα durante 5 (p42/p44 MAPK) o 15 min (JNK y Akt). Veinticinco µg de proteínas de extractos celulares, obtenidos como se describe en Materiales y Métodos, fueron sometidos a SDS-PAGE y revelados con anticuerpos anti fosfo-p42/p44 MAPK, fosfo-JNK o fosfo-Ser 473-Akt y con anti p42/p44 MAPK, JNK o Akt total luego de un paso de *stripping*. El experimento mostrado es representativo de tres realizados.

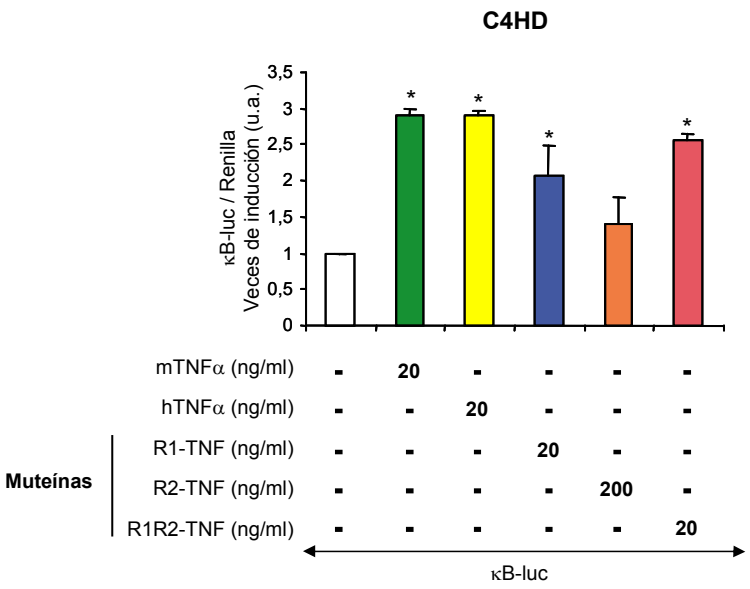


Fig. 17 Participación de TNFR1 y TNFR2 en la activación de NF-κB por TNFα en células de cáncer de mama. Las células C4HD transfectadas con la construcción κB-luciferasa fueron incubadas con muteínas de TNFα, R1-TNF, R1R2-TNF (20 ng/ml) o R2-TNF (200 ng/ml), o con 20 ng/ml de mTNFα o hTNFα durante 18 h y luego fueron cosechadas y homogeneizadas. Las actividades luciferasa y renilla fueron medidas como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como n-veces de inducción de actividad luciferasa con respecto a células control creciendo en ausencia de TNFα. Los datos mostrados son promedio ± ES de cuatro experimentos independientes. *P<0,001 vs. control.

Estos resultados sugieren que el TNFα, actuando principalmente a través del TNFR1, induce la activación de las vías de transducción de señales p42/p44 MAPK, JNK, Akt y la activación transcripcional de NF-κB, a través de la activación de JNK y Akt, en células de cáncer de mama C4HD y T47D.

La proliferación de células de cáncer de mama y la expresión de Bcl-X_L y ciclina D1 inducidas por TNFα son dependientes de la actividad transcripcional de NF-κB.

NF-κB es uno de los principales mediadores de las funciones del TNFα, llevando a la síntesis de proteínas reguladoras de la apoptosis y del ciclo celular entre otras (Fig. 4) (Karin y Lin, 2002). En esta Tesis hemos observado que el TNFα induce la activación de NF-κB y nos preguntamos cuáles serían los genes blanco de dicha activación y su participación en el efecto biológico final. Por ese motivo, investigamos la expresión de Bcl-X_L y ciclina D1, dos genes blanco conocidos de NF-κB, vinculados con el efecto antiapoptótico y proliferativo, mediante *Western blot* de

extractos proteicos de células C4HD y T47D. En la Fig. 18, se muestra que el TNFα provocó el aumento en los niveles de expresión de la proteína Bcl-X_L tanto en células C4HD como en T47D, a las 48 h de tratamiento. También observamos que la proteína promotora del ciclo celular ciclina D1 aumentó en células C4HD, de manera coincidente con estudios realizados en células T47D (Rubio et al, 2006). La preincubación con Bay 11-7082, bloqueó el aumento de ambas proteínas inducido por TNFα (Fig. 18).

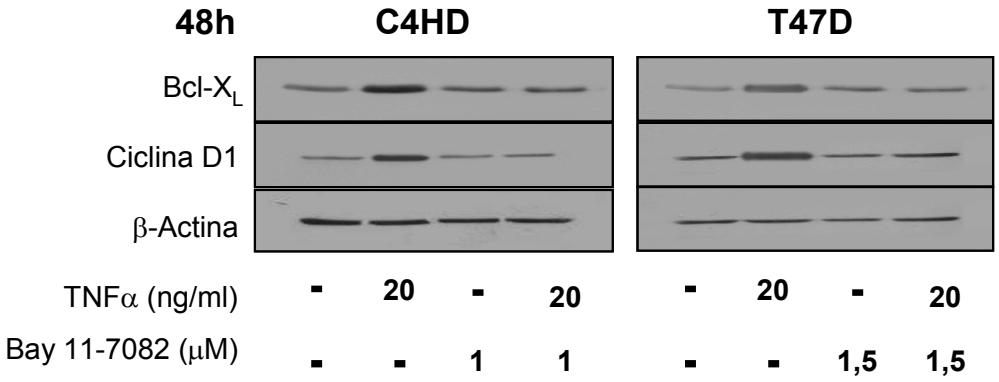


Fig. 18 Importancia de la activación de NF-κB por TNFα en el aumento de expresión de Bcl-X_L y ciclina D1 en células de cáncer de mama. Las células C4HD y T47D fueron incubadas durante 48 h en presencia de 20 ng/ml de mTNFα o hTNFα, respectivamente, Bay 11-7082 1 μM (C4HD) o 1,5 μM (T47D) o pre-incubadas durante 60 min con estos inhibidores previo al agregado de TNFα. Cincuenta μg de proteínas de homogenatos celulares fueron sometidos a SDS-PAGE y revelados con anticuerpos anti Bcl-X_L o anti ciclina D1. Las membranas fueron sometidas a *stripping* e hibridizadas con un anticuerpo anti β-actina. El experimento mostrado es representativo de tres realizados.

Posteriormente investigamos la participación de NF-κB en la proliferación inducida por TNFα. Para ello, células C4HD y T47D fueron tratadas con Bay 11-7082 previo al agregado de TNFα murino o humano. El efecto mitogénico del TNFα fue evaluado mediante tinción con ioduro de propidio y análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo, mostrando un aumento del porcentaje de células en fase S del ciclo celular a las 24 (dato no mostrado) y 36 h (Fig. 19), y de las fases G2/M a las 48 h (Fig. 19) con respecto a células control, confirmando los resultados previos utilizando incorporación de timidina-[^{3}H]. Como se muestra en la Fig. 19 (cuarto histograma), la adición de Bay 11-7082 tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células C4HD en comparación con las células tratadas con TNFα (segundo histograma) reduciendo la fase S a las 36 h y la fase G_2/M a las 48 h. La presencia de Bay 11-7082 no tuvo efecto en la proliferación celular basal y la

distribución en las distintas fases del ciclo (tercer vs primer histograma). Sin embargo, cuando el cultivo se prolongó hasta las 96 h y se evaluó la apoptosis mediante tinción con Anexina V, Bay11-7082 indujo apoptosis de las células C4HD (Fig. 20, tercer histograma vs primer histograma). La presencia de TNFα no pudo prevenir este efecto (Fig. 20, cuarto vs segundo histograma). También es notorio que el tratamiento con TNFα previno la apoptosis basal de las células C4HD (Fig. 20, segundo vs primer histograma), en línea con nuestros resultados que muestran que el TNFα induce el aumento de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L (Fig. 18). En paralelo, realizamos recuentos celulares para corroborar que la incorporación de timidina-[^{3}H] correlaciona con el aumento en el número de células inducido por el TNFα en células C4HD. En la Fig. 21 se observa que el TNFα indujo un aumento del 38,92 ± 0,01% en el número de células a las 96 h de cultivo. En el mismo experimento, el tratamiento con Bay 11-7082 + TNFα redujo el número de células en un 46,30 ± 0,04% con respecto a las células tratadas con TNFα.

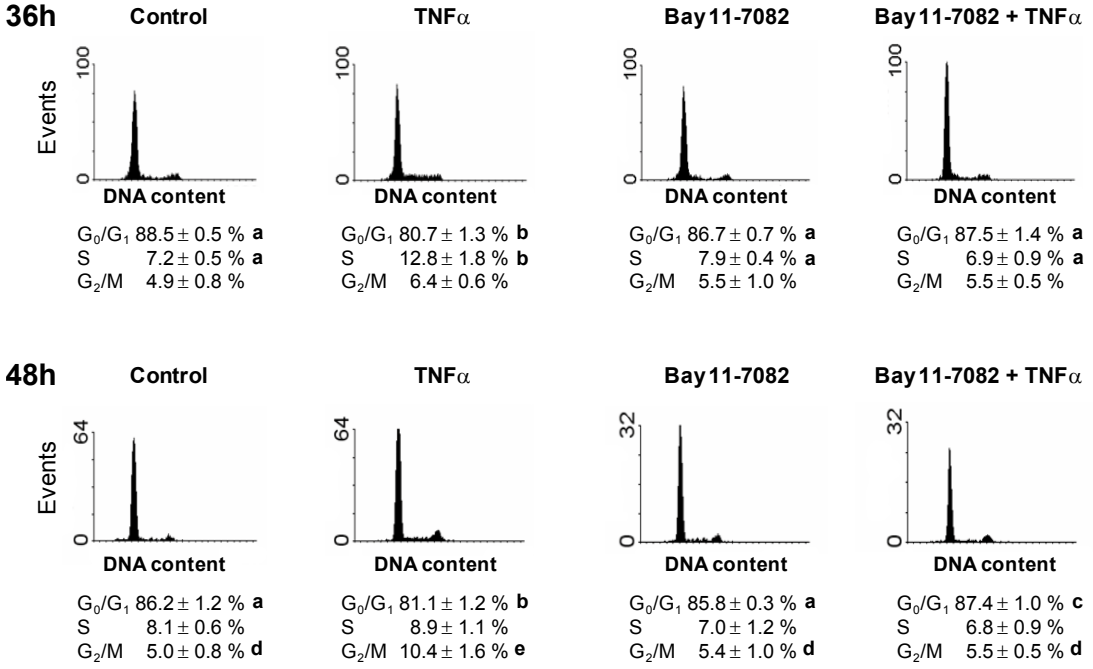


Fig. 19 La activación de NF-κB es esencial para la progresión del ciclo celular de las células de cáncer de mama estimuladas con TNFα. Las células C4HD fueron incubadas en presencia de 20 ng/ml de mTNFα, Bay 11-7082 1 μM o pre-incubadas con este inhibidor previo al agregado de TNFα. Las células fueron teñidas con ioduro de propidio y la distribución de las mismas en el ciclo celular fue analizada mediante citometría de flujo a las 36 y 48 h. Se muestran histogramas representativos de tres experimentos realizados. Los datos mostrados son porcentajes promedio de los tres experimentos ± ES. b vs. a y e vs. d $P<0,05$, b vs. c $P<0,01$.

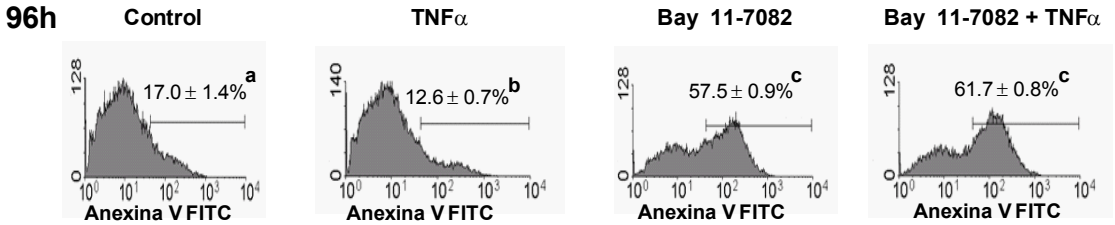
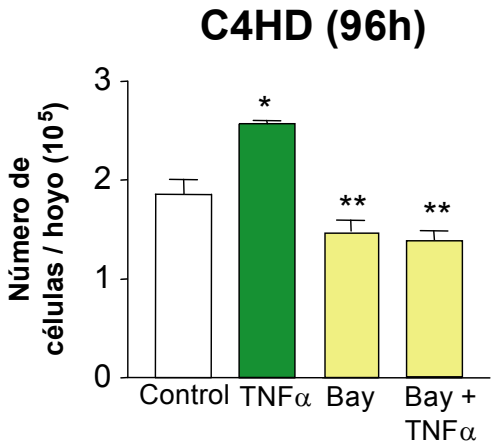
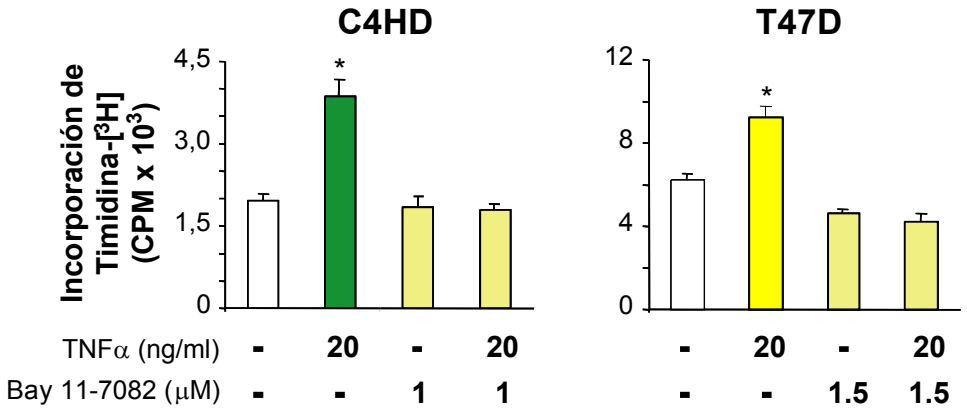


Fig. 20 La activación de NF-κB es esencial para el efecto antiapoptótico inducido por TNFα en células de cáncer de mama. Las células C4HD fueron incubadas en presencia de 20 ng/ml de mTNFα, Bay 11-7082 1 μM o pre-incubadas con este inhibidor previo al agregado de TNFα. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas en células C4HD cultivadas durante 96 h en presencia de los tratamientos que se indican. La unión de Anexina V- FITC a la superficie celular fue medida por citometría de flujo. b vs. a $P<0,05$, b vs. c $P<0,01$. Se muestran porcentajes promedio de tres experimentos realizados.

Fig. 21 La activación de NF-κB es esencial para la proliferación inducida por TNFα en células de cáncer de mama: recuento celular. Las células C4HD fueron incubadas en presencia de 20 ng/ml de mTNFα, Bay 11-7082 1 μM o pre-incubadas con este inhibidor previo al agregado de TNFα. Se realizaron recuentos celulares utilizando al colorante de exclusión Azul Trypan, a las 96 h de tratamiento. El número de células al comienzo del experimento fue de 2 x 10^5 células por hoyo. El ensayo se realizó por cuadruplicado y fue repetido tres veces con resultados similares. *P<0,05 vs. control, *P<0,01 vs. TNFα.



Estudios similares se realizaron mediante incorporación de timidina-[^{3}H] a las 48 h. El bloqueo de la actividad de NF-κB con Bay 11-7082 inhibió la proliferación celular inducida por TNFα, y no tuvo efecto sobre la proliferación basal de las células C4HD y T47D (Fig. 22). En conjunto, nuestros resultados indican que la activación de NF-κB es un requisito en el mecanismo de inducción de la proliferación y supervivencia por TNFα en células de tumor de mama.



◄ Fig. 22 La activación de NF-κB es esencial para la proliferación inducida por TNFα en células de cáncer de mama: ensayos de incorporación de timidina-[^{3}H]. Las células C4HD o T47D fueron incubadas en presencia de 20 ng/ml de mTNFα o hTNFα, Bay 11-7082 1 o 1,5 μM, respectivamente, o pre-incubadas durante 60 min con este inhibidor previo al agregado de TNFα. La proliferación se midió a las 48 h de cultivo, estando presente un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h. El experimento mostrado es representativo de tres realizados. b vs. a $P<0,001$.

El TNFα promueve el crecimiento *in vivo* del tumor C4HD a través de la activación de NF-κB

Con el objetivo de evaluar si el TNFα era capaz de promover el crecimiento *in vivo* del tumor C4HD, ratones hembras Balb/c fueron inoculadas subcutáneamente (s.c.) con un fragmento de tumor C4HD e inyectados s.c. diariamente con 10 ng de TNFα o con PBS. Como se observa en la Fig. 23 y en la Tabla 1, el TNFα fue capaz de inducir la toma del tumor C4HD, así como también su crecimiento. Por otro lado, los ratones que recibieron solo PBS, no desarrollaron el tumor (Fig. 23 y Tabla 1). Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 60-70 mm^3 al día 16, los ratones fueron separados al azar en tres grupos experimentales: 1) los ratones continuaron recibiendo inyecciones diarias de 10 ng de mTNFα, o 2) fueron tratados con 10 ng/día de mTNFα más 5 mg/kg Bay 11-7082 los días 16, 19 y 21; o 3) fueron tratados con 10 ng/día de mTNFα más vehículo. Se utilizó una dosis de 5 mg/kg de Bay 11-7082, la dosis mínima efectiva hallada, dado que 1 mg/kg de Bay 11-7082 no fue capaz de disminuir el tamaño del tumor C4HD inducido por TNFα, en un ensayo preliminar (dato no mostrado). La curva de crecimiento tumoral en presencia de TNFα más el vehículo de Bay-11-7082 resultaron indistinguibles de la obtenida con TNFα solo (Fig. 23). La administración de Bay 11-7082 a los animales portadores del tumor C4HD creciendo en presencia de TNFα, resultó efectiva para disminuir la tasa de crecimiento tumoral y el volumen tumoral en comparación con los animales tratados con TNFα o TNFα + vehículo (Fig. 23 y Tabla 1). Con el objetivo de dilucidar el comportamiento del tumor promovido por TNFα, en un grupo adicional se interrumpió el tratamiento con TNFα al día 16. Se observó una progresiva y significante regresión del tumor, luego de la interrupción del tratamiento (Fig. 23, inserto). En conjunto, estos datos revelan que el TNFα permitió la toma del tumor C4HD y que su posterior crecimiento fue dependiente de TNFα, siendo NF-κB un factor de transcripción clave involucrado en el crecimiento tumoral.

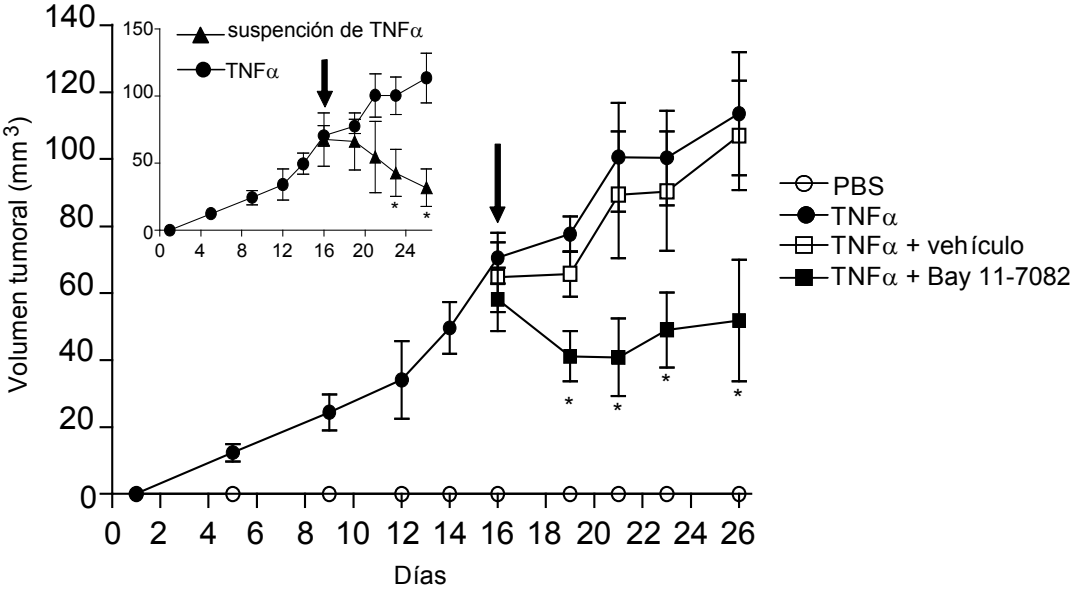


Fig. 23 TNFα promueve el crecimiento *in vivo* del tumor C4HD y puede ser inhibido a través del bloqueo de la activación de NF-κB. Ratones hembras de la cepa Balb/c fueron inoculados s.c. en el flanco izquierdo con un fragmento de tumor C4HD de 1 mm^3 y fueron inyectados con 10 ng mTNFα/día disuelto en 50 µl PBS (●), o con 50 µl de PBS/día (○) durante los primeros 16 días. Al día 16, los animales tratados con mTNFα fueron separados en tres grupos experimentales (n=5/grupo) y recibieron los siguientes tratamientos: 10 ng mTNFα/día + 5 mg/kg Bay 11-7082 los días 16, 19 y 21 (■), 10 ng mTNFα/día + vehículo (200 µl metil celulosa) los días 16, 19 y 21 (□), o 10 ng mTNFα/día (●). Un grupo adicional de animales tratados con TNFα que al día 16 dejaron de recibir TNFα (▲), se muestra en el inserto. El ancho y largo del tumor fueron medidos tres veces por semana para calcular el volumen tumoral, como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa el volumen promedio de 5 tumores más desvío estándar. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares. *P<0,01 vs. TNFα.

Tabla 1 El TNFα promueve el crecimiento del tumor C4HD de manera dependiente de NF-κB

Tratamiento al día 1	Día 16			Tratamiento al día 16	Día 26		
	Volumen tumoral (mm^3) (media ± SE)	Toma tumoral	Tasa de crecimiento (mm^3/día)		Volumen tumoral (mm^3) (media ± SE)	Tasa de crecimiento (mm^3/día)	Figuras mitóticas por HPF
PBS	0	0/10	----				
TNFα	65.5 ± 5.1	20/26 (76%)	4.3 ± 0.6	TNFα	107.1± 16.2 [a] (51.6)[c]	4.4 ± 0.5	6 (5-8)
				TNFα+ vehículo	102.5 ± 14.1 [a] (49.6)	4.2 ± 0.5	6 (5-8)
				TNFα+ Bay	51.8 ± 11.5 [b]	-0.3 ± 1	1 (0-3)

Los experimentos se realizaron en ratones Balb/c como se describió bajo Materiales y Métodos. La tasa de crecimiento entre los días 1 y 16 fue calculada como la pendiente de la curva de crecimiento. El volumen tumoral se estimó usando la fórmula (LxA^2)/2, donde L es la longitud del tumor y A el ancho. Al día 16, los animales que desarrollaron tumores fueron tratados con TNFα, TNFα + vehículo o TNFα + Bay 11-7082. Las tasas de crecimiento fueron calculadas como la pendiente de las curvas de crecimiento entre los días 16 y 26. El volumen tumoral y el porcentaje de inhibición del crecimiento en tumores del grupo TNFα + Bay 11-7082 fueron calculados al día 26 versus los grupos TNFα y TNFα + vehículo. a vs. b $P<0,02$. c Porcentaje de inhibición con respecto al grupo TNFα + Bay. El número de figuras mitóticas fue contado por campo de alto aumento (HPF, magnificación x400) y se expresó como la mediana y el rango obtenido por 10 HPF observados.

Los tumores fueron extirpados al día 26 de cada protocolo experimental y sus características histopatológicas fueron evaluadas mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones histológicas. La Fig. 24 muestra secciones representativas de tumores de los grupos experimentales TNFα y TNFα más Bay 11-7082. Los tumores desarrollados en ratones que recibieron TNFα mostraron características de carcinomas mamarios ductales, compuestos de pseudolóbulos sólidos de células glandulares altamente cohesivas con poca diferenciación tubular, separados por escaso estroma fibroblástico (Fig. 24). Por otro lado, aproximadamente un 40-50% de la masa tumoral remanente de los tumores tratados con TNFα más Bay 11-7082 mostraba necrosis, apoptosis y hialinización. Además, el análisis histológico de esos tumores reveló un número significativamente menor de figuras mitóticas en comparación con los tumores de animales tratados con TNFα (Tabla 1). El examen histológico del hígado, pulmón, riñón y bazo no reveló ningún cambio patológico en los animales tratados con TNFα. En el grupo tratado con Bay 11-7082, sin embargo, se observó una moderada displasia hepática de características benignas. No se observó pérdida o ganancia de peso en ningún grupo de ratones durante el curso del experimento.

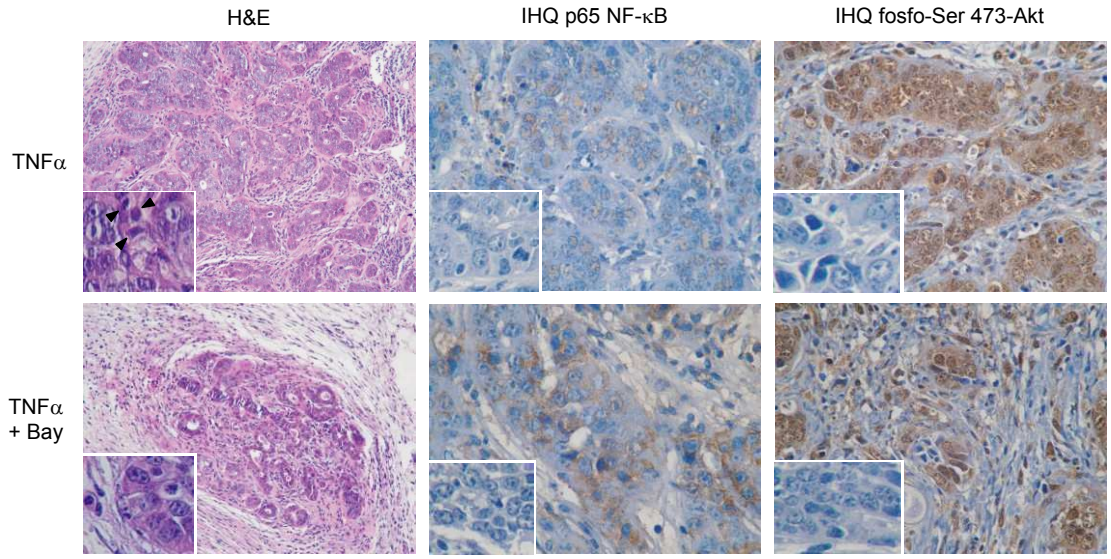


Fig. 24 Análisis histopatológicos e inmunohistoquímica (IHQ) de tumores C4HD promovidos por mTNFα que recibieron tratamiento con Bay 11-7082. Secciones de tejido del tumor C4HD obtenido luego de la administración de mTNFα y luego sometido a los distintos tratamientos que se describen en la Fig. 21. TNFα: carcinoma mamario ductal compuesto por pseudolóbulos altamente cohesivos de células glandulares, separados por escaso estroma vascular (H&E x100). Características atípicas y ciertas figuras mitóticas se indican mediante puntas de flecha a mayor aumento (inserto, H&E x400). TNFα + Bay 11-7082: se observa necrosis del tumor, apoptosis y hialinización. En un área no necrótica del tumor se muestra la ausencia de mitosis (inserto, H&E x400). IHQ de p65. TNFα: el tumor de mama C4HD muestra inmunorreactividad nuclear de p65 en células tumorales. TNFα + Bay 11-7082: se observa marcación de p65 citoplasmática pero no nuclear en células tumorales. IHQ de fosfo Ser 473 Akt: TNFα y TNFα + Bay 11-7082: se observa marcación nuclear y citoplasmática de Akt en tumores provenientes de ambos grupos. Las secciones fueron incubadas con anticuerpos específicos o anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo como control (inserto), y los anticuerpos unidos fueron visualizados mediante detección de inmunoperoxidasa. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina como coloración de contraste, aumento x400.

Dado que Bay 11-7082 es un inhibidor de la degradación de IκBα y bloquea la translocación de NF-κB desde el citoplasma al núcleo, razonamos que la presencia de la proteína p65, miembro de la familia NF-κB, en el citoplasma sería un marcador de la inhibición ejercida por Bay 11-7082 y por lo tanto realizamos inmunohistoquímica para determinar la localización de p65, en muestras de tejido tumoral. En tumores C4HD crecidos en ratones que recibieron TNFα, observamos la presencia de marcación nuclear de p65 en un alto porcentaje de células tumorales. Esta proteína, sin embargo, no fue detectable en células estromales (Fig. 24). Los tumores provenientes de ratones tratados con TNFα más Bay 11-7082, exhibieron marcación citoplasmática de p65 (Fig. 24). Estos datos sugieren que el TNFα fue capaz de inducir la translocación nuclear de p65 en células tumorales, en tanto que la administración de Bay 11-7082 *in vivo* inhibió este efecto. Además exploramos el

estado de activación y localización de Akt en estas muestras de tumor. Observamos un patrón similar de tinción para fosfo-Ser 473-Akt, mostrando presencia nuclear y citoplasmática en tumores provenientes de ambos grupos, TNFα y TNFα + Bay 11-7082. Este resultado, sugiere que la activación de Akt no fue afectada por el tratamiento con el inhibidor de IκBα, Bay 11-7082, reafirmando el concepto de que Akt es una quinasa que se encuentra rio arriba en la vía de activación de NF-kB.

Otra manera de comprobar la efectividad de la inhibición de NF-κB por la administración de Bay 11-7082 *in vivo*, fue mediante la evaluación de la expresión de IκBα por *Western blot* en extractos proteicos de tumores provenientes del grupo TNFα y TNFα + Bay 11-7082. La Fig. 25, muestra que la capacidad del TNFα de inducir activación y degradación de IκBα, fue inhibida por la administración de Bay 11-7082. Finalmente, exploramos la expresión de las proteínas reguladas por NF-κB, Bcl-X_L y ciclina D1, en extractos de tumores crecidos con TNFα y luego tratados o no con Bay 11-7082. Como se muestra en la Fig. 25, la administración de Bay 11-7082 inhibió la expresión de Bcl-X_L y ciclina D1 inducida por TNFα (Fig. 25).

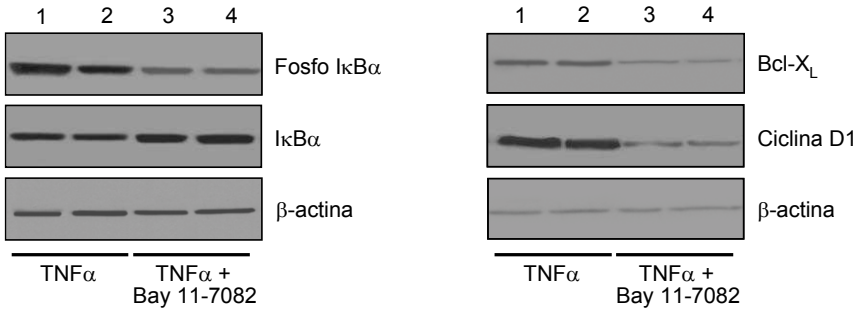


Fig. 25 Efecto del tratamiento con Bay 11-7082 sobre la fosforilación y degradación de IκBα, y sobre la expresión de Bcl-xL y ciclina D1 en el tumor C4HD promovido por TNFα. Cincuenta μg de proteínas totales de lisados tumorales fueron sometidos a SDS-PAGE y revelados usando anticuerpos anti fosfo-IκBα y anti IκBα (*panel izquierdo*), o con anti Bcl-x_L y anti ciclina D1 (*panel derecho*). Se muestran dos muestras representativas de cada grupo experimental: tumor de ratones tratados con TNFα (calles 1 y 2) y TNFα + Bay 11-7082 (calles 3 y 4). Las membranas fueron sometidas a un proceso de *stripping* y re-incubadas con anticuerpo anti β-actina. El experimento mostrado es representativo de tres realizados.

CAPÍTULO II ESTUDIO DE LA TRANSACTIVACIÓN DE ERBB-2 POR TNFα

La proliferación de las células C4HD inducida por TNFα requiere de la activación de ErbB-2

Los resultados mostrados en esta Tesis, así como también evidencias previas, demuestran que el TNFα induce la proliferación de células de cáncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo* y que utiliza al factor de transcripción NF-κB como un mediador de sus efectos proliferativos (Rivas et al, 2008). En particular, las células C4HD sobreexpresan ErbB-2, una molécula clave en la proliferación de estas células (Balana et al, 1999; Balana et al, 2001; Labriola et al, 2003). Por otro lado, ha sido reportado que el TNFα es capaz de transactivar a EGFR (o ErbB-1), miembro de la familia de RTK-I (Lee et al, 2007; Argast et al, 2004; Chokki et al, 2006; Chen et al, 2004). Sin embargo, la interacción de TNFα con ErbB-2 no ha sido aún explorada. Por lo tanto, hemos investigado la existencia de una interacción entre la señalización de ErbB-2 y el efecto proliferativos inducido por TNFα. Con ese propósito, realizamos ensayos de proliferación en presencia o ausencia del inhibidor dual de los receptores quinasa de tirosinas EGFR/ErbB-2, la tirfostina AG825. Dado que en trabajos previos hemos demostrado que las células C4HD no expresan EGFR (Lanari et al, 1989; Balana et al, 1999; Balana et al, 2001), los resultados obtenidos utilizando este inhibidor serían solamente atribuibles al bloqueo de ErbB-2. Los resultados de la Fig. 26 muestran que la proliferación de las células C4HD inducida por 20 ng/ml de TNFα fue inhibida por la adición de AG825. La proliferación inducida por HRG, ligando natural de ErbB-3 y ErbB-4 que heterodimerizan con ErbB-2, fue completamente suprimida por 100 μM de AG825 (Fig. 26), siendo esta concentración efectiva para inhibir la fosforilación de ErbB-2 inducida por HRG (Fig. 26, panel derecho).

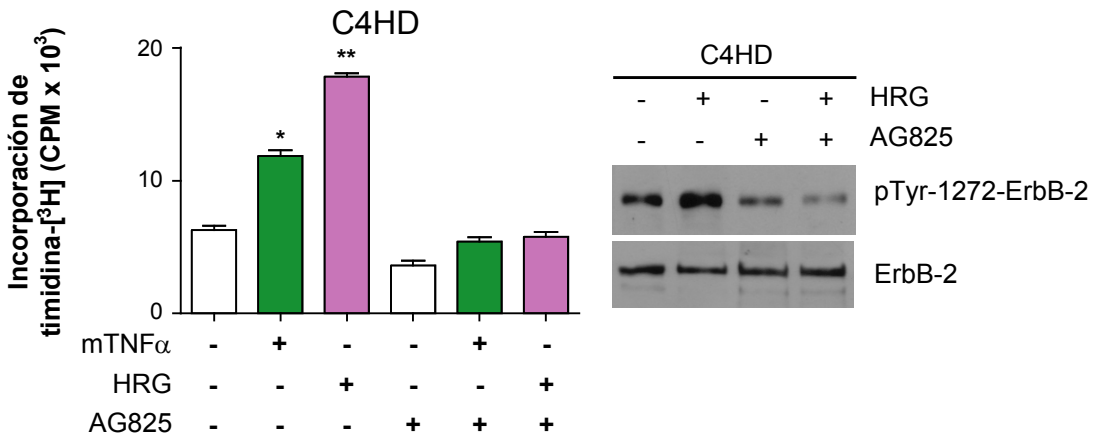


Fig. 26 El inhibidor del receptor tirosina quinasa ErbB-2, AG825, inhibe la proliferación de células de cáncer de mama C4HD inducida por TNFα. Cultivos primarios de células epiteliales C4HD fueron pre-tratados durante 60 min con 100 µM AG825 o con 1:2000 de DMSO y fueron luego tratados o no con 20 ng/ml de mTNFα o con 20 ng/ml de heregulina (HRG) durante 48 h, en presencia de un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h (*panel izquierdo*). Los resultados presentados son promedio ± ES de octuplicados. El experimento mostrado es representativo de un total de cuatro. *P<0.05, ** P< 0.001 vs. control. Las células C4HD fueron pre-tratadas durante 60 min con 100 µM AG825 o con 1:2000 de DMSO y fueron luego tratadas o no con 20 ng/ml de HRG durante 5 min. Cincuenta µg de proteínas de extractos celulares totales fueron sometidas a SDS-PAGE e inmunoblot con un anticuerpo anti fosfo ErbB-2 Tyr1222/1272 (*panel derecho*). Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo anti ErbB-2. Se muestra un experimento representativo de un total de tres.

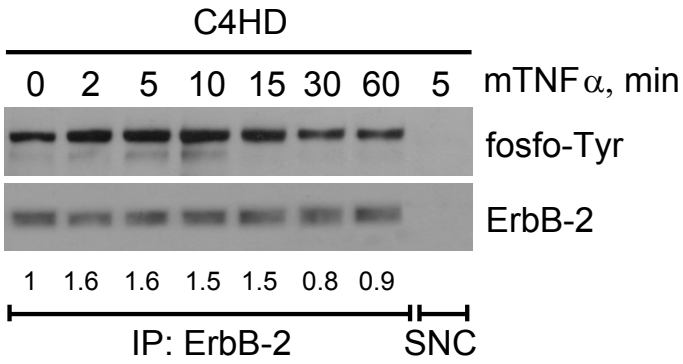


Fig. 27 El TNFα induce la fosforilación en tirosinas de ErbB-2 en células de cáncer de mama C4HD. Las células C4HD fueron tratadas con 20 ng/ml de mTNFα durante los tiempos que se indican, y ErbB-2 fue inmunoprecipitado a partir de 500 µg de extractos proteicos. Como control, los extractos fueron también inmunoprecipitados con suero preinmune de conejo (SNC). Los inmunocomplejos fueron sometidos a SDS-PAGE y analizados mediante *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-fosfo-Tyr (*primer panel*). Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo anti ErbB-2 (*segundo panel*). Las bandas fueron cuantificadas utilizando *Image J* y se muestra el resultado obtenido dividiendo los niveles de p-Tyr sobre ErbB-2 total. Se muestra un experimento representativo de un total de tres. IP Inmunoprecipitación.

Dado que la proliferación inducida por TNFα resultó ser dependiente de la actividad tirosina quinasa de ErbB-2, nos propusimos examinar si la presencia de TNFα afectaba los niveles de fosforilación de ErbB-2, un marcador ampliamente utilizado de activación de este receptor. Extractos proteicos totales de células C4HD tratadas entre 0 y 60 minutos con TNFα fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo

anti ErbB-2 y se determinó el contenido de tirosinas fosforiladas mediante *Western blot*. La Fig. 27 muestra que la fosforilación en tirosinas totales de ErbB-2 aumentó entre los 2 y 15 minutos de tratamiento. Para caracterizar esta activación, realizamos *Western blots* utilizando anticuerpos específicamente dirigidos contra uno de los principales sitios de autofosforilación de la porción C-terminal de ErbB-2, la tirosina (Tyr) 1272, sitio análogo al humano Tyr1221/1222. La fosforilación en este residuo fue sustancialmente más alta en células C4HD tratadas con TNFα y alcanzó su máximo a los 5 minutos de tratamiento (Fig. 28). La adición de AG825 bloqueó la fosforilación inducida por TNFα en Tyr1272 de manera dosis dependiente (Fig. 28). Para extender estos resultados a otros modelos experimentales, utilizamos a las líneas celulares de cáncer de mama humano SK-BR-3 y BT-474 que son ampliamente utilizadas como modelo para estudiar la sobreexpresión de ErbB-2 y que expresan, además, ambos receptores de TNFα: TNFR1 y TNFR2 (resultados no mostrados). Observamos que el TNFα indujo un aumento de la proliferación medida por incorporación de timidina-[^{3}H] a las 48 h de cultivo en ambas líneas celulares y que, de manera similar a lo observado para las C4HD, la presencia de AG825 inhibió dicho efecto proliferativo (Fig. 29). En estos dos modelos humanos, el TNFα también indujo un aumento en la fosforilación del residuo Tyr1221/1222 a partir de los 2 minutos de tratamiento, alcanzando un pico a los 15-30 minutos de estimulación (Fig. 30) que fue bloqueado por la adición de AG825. Por lo tanto, demostramos por primera vez que el TNFα es capaz de transactivar a ErbB-2 en células de cáncer de mama murino y humano.

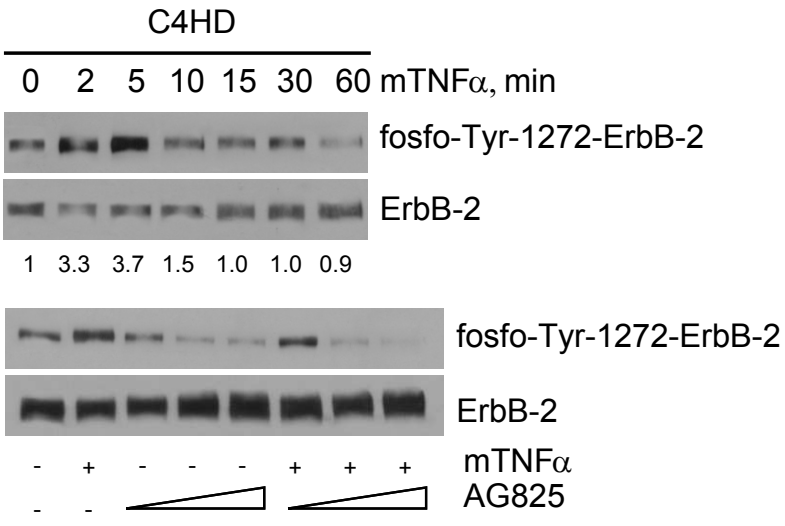


Fig. 28 El TNFα induce la fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr-1272 en células de cáncer de mama C4HD. Las células C4HD fueron tratadas con 20 ng/ml de mTNFα durante los tiempos que se indican, y cincuenta µg de proteínas de extractos celulares totales fueron sometidas a SDS-PAGE e *inmunoblot* con un anticuerpo anti fosfo-ErbB-2 Tyr1222/1272. Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re-incubadas

con un anticuerpo anti ErbB-2. Las células fueron pre-incubadas con 50, 80 o 100 µM de AG825 durante 60 minutos y luego estimuladas con TNFα, y se realizó *Western blot* con un anticuerpo anti fosfo-ErbB-2 Tyr1222/1272 como se indica. Las bandas fueron cuantificadas utilizando *Image J* y se muestra el resultado obtenido dividiendo los niveles de p-Tyr-1272-ErbB-2 sobre ErbB-2 total. Se muestra un experimento representativo de un total de cinco con resultados similares.

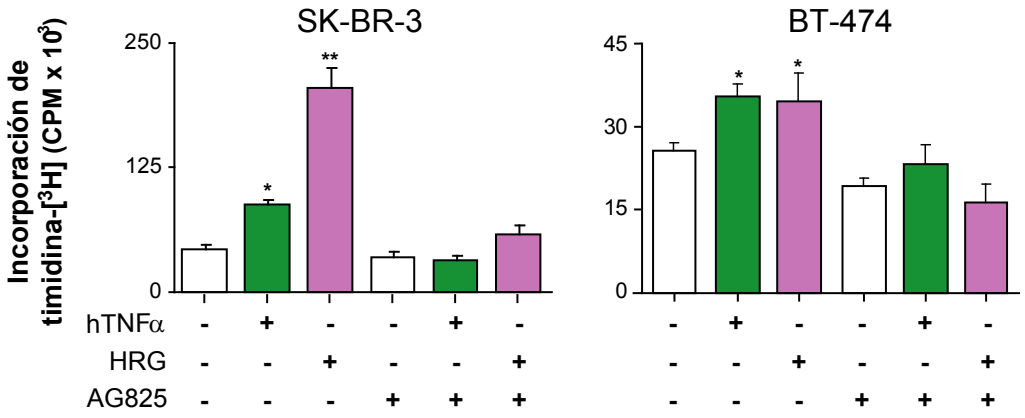


Fig. 29 El TNFα requiere de la fosforilación de ErbB-2 para inducir la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama humanas. Las células SKBR-3 y BT-474 fueron pre-tratadas durante 60 min con 100 µM AG825 o con 1:2000 de DMSO y fueron luego tratados o no con 20 ng/ml de mTNFα o con 20 ng/ml de heregulina (HRG) durante 48 h, en presencia de un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h. Los resultados presentados son promedio ± ES de octuplicados. El experimento mostrado es representativo de un total de tres. *P<0.05, ** P< 0.001 vs. control.

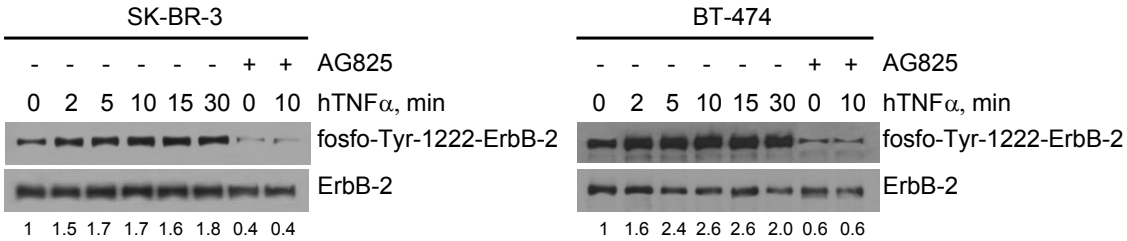


Fig. 30 El TNFα induce la fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr-1222 en líneas celulares de cáncer de mama humanas. Las células SKBR-3 y BT-474 fueron pre-tratadas durante 60 min con 100 µM AG825 y luego fueron tratadas o no con hTNFα durante los tiempos que se indican. Cincuenta µg de proteínas de extractos celulares totales fueron sometidas a SDS-PAGE e inmunoblot con un anticuerpo anti fosfo ErbB-2 Tyr1222/1272 (*primer panel*). Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo anti ErbB-2 (*segundo panel*). Las bandas fueron cuantificadas utilizando *Image J* y se muestra el resultado obtenido dividiendo los niveles de p-Tyr-1222-ErbB-2 sobre ErbB-2 total. Se muestra un experimento representativo de un total de tres con resultados similares.

Otro de los efectos característicos de la activación de ErbB-2 por los ligandos de su familia es la internalización del receptor. Por lo tanto, examinamos la localización subcelular de ErbB-2 en los tres modelos antes mencionados. Mediante

inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal demostramos que en células no estimuladas, el ErbB-2 se encuentra localizado principalmente en la membrana plasmática. El tratamiento con TNFα durante 30 min indujo un gran aumento en la localización citoplasmática de ErbB-2 (Fig. 31). Otra evidencia de la internalización del ErbB-2 fue obtenida mediante marcación de las células con un anticuerpo primario anti ErbB-2 y un secundario conjugado a ficoeritrina y posterior análisis por citometría de flujo. La expresión de ErbB-2 en la membrana plasmática fue significativamente disminuída por el tratamiento con TNFα durante 30 minutos en células de cáncer de mama que sobreexpresa ErbB-2 (Fig. 32). Por otro lado, confirmamos que esta disminución no se debió a procesos de degradación del ErbB-2, dado que en ensayos de *Western blot* sobre extractos proteicos totales, los niveles de ErbB-2 fueron similares en ausencia o presencia de TNFα. Estos resultados en su conjunto sugieren que el TNFα es capaz de activar a ErbB-2 induciendo su fosforilación e internalización al citoplasma de las células de cáncer de mama.

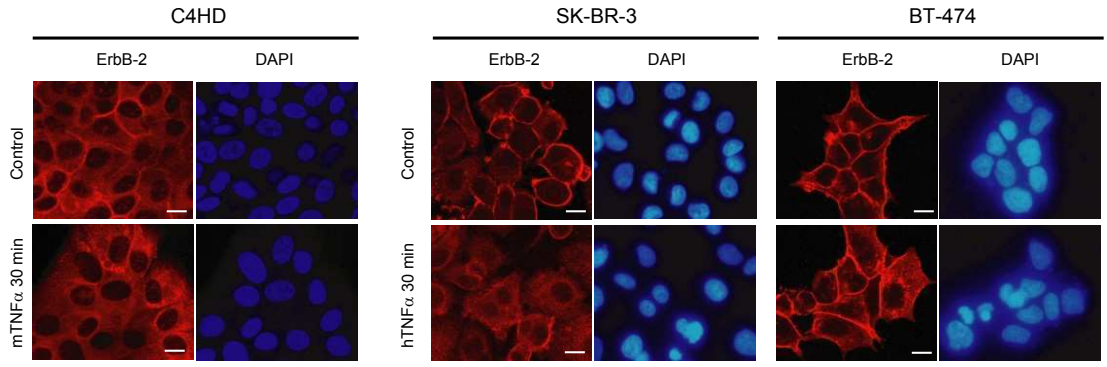
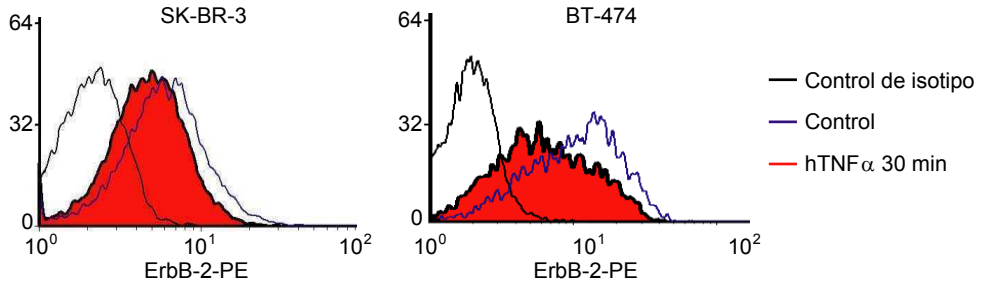


Fig. 31 El TNFα induce la internalización de ErbB-2 en células de cáncer de mama. Localización de ErbB-2 por inmunofluorescencia y microscopía confocal en células tratadas con TNFα. Cultivos primarios de células C4HD o las líneas celulares de cáncer de mama humano SKBR-3 y BT-474 fueron crecidas en cubreobjetos estériles y ayunadas durante 24 h. Las células fueron tratadas con TNFα y fijadas con metanol a los 30 min de tratamiento. Cada imagen es representativa de al menos 10 obtenidas (barras de escala: 10 µm). En experimentos control no se detectó tinción realizando la incubación con el anticuerpo secundario únicamente o con el anticuerpo anti ErbB-2 pre-incubado con el péptido bloqueante específico. Los núcleos fueron teñidos con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).



◄ **Fig. 32 Expresión de ErbB-2 mediante citometría de flujo en células BT-474 y SK-BR-3 tratadas con TNFα.** La expresión de ErbB-2 fue revelada mediante incubación con un anticuerpo anti-ErbB-2 seguida por un anticuerpo secundario conjugado con ficoeritrina (PE; ErbB-2-PE). Se muestran histogramas representativos de la expresión de ErbB-2 en células tratadas o no con hTNFα durante 30 min. La diferencia de intensidad de fluorescencia media de células SK-BR-3 control y tratadas con hTNFα fue de 4,4 y 2,9, respectivamente ($P<0,01$) y la de las células BT-474 control y tratadas con hTNFα fue de 22,2 y 10,0, respectivamente ($P<0,001$). Se utilizó la prueba estadística de Kolmorgorov-Smirnov.

Los resultados mostrando que el TNFα es capaz de inducir la fosforilación y translocación al citoplasma de ErbB-2, nos condujeron a investigar el mecanismo de transactivación de ErbB-2 inducido por TNFα. En ese sentido, basándonos en la bibliografía existente, planteamos dos mecanismos posibles de activación de ErbB-2 por TNFα que podrían estar ocurriendo de manera alternativa o incluso en simultáneo. Una de las opciones puestas a prueba fue que el TNFα estuviera liberando ligandos de los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I. Es conocido el hecho de que el TNFα puede inducir transactivación de EGFR, a través de la liberación de ligandos de EGFR de la membrana celular en líneas celulares de células epiteliales del epitelio respiratorio humano y también en células epiteliales mamarias humanas (Lee et al, 2007; Chokki et al, 2006; Chen et al, 2004). Por otro lado, las heregulinas son ligandos naturales de ErbB-3 y ErbB-4 que se producen como proformas unidas a la membrana y cuyos ectodominios actúan como hormonas una vez que son clivados por metaloproteasas (MMPs) (Falls, 2003). Por lo tanto, investigamos si el TNFα activa a ErbB-2 de manera ligando dependiente o independiente de ErbBs. Para ello, realizamos ensayos de proliferación con las células C4HD, en los cuales pre-incubamos a las células con anticuerpos bloqueantes de ErbB-3 y ErbB-4 previo al tratamiento con TNFα. El crecimiento inducido por TNFα no fue modificado por la presencia de anticuerpos anti ErbB-3 ni anti ErbB-4 (Fig. 33). Sin embargo, de acuerdo con lo reportado previamente, los anticuerpos anti ErbB-3 y anti ErbB-4 inhibieron la proliferación inducida por HRG en células C4HD (Labriola et al, 2003). Para descartar que el TNFα estuviera induciendo la liberación de ligandos exploramos el efecto de un inhibidor de MMPs de amplio espectro, el GM6001, sobre la fosforilación de ErbB-2. El tratamiento de células C4HD o SK-BR-3 con 10 μM de GM6001 no modificó la fosforilación de ErbB-2 inducida por TNFα en ninguno de estos tipos celulares (Fig. 34). Estos resultados sugieren fuertemente que la activación

de ErbB-2 inducida por TNFα no se produciría a través de la liberación de ligandos de los receptores con actividad de tirosina quinasa en células de cáncer de mama.

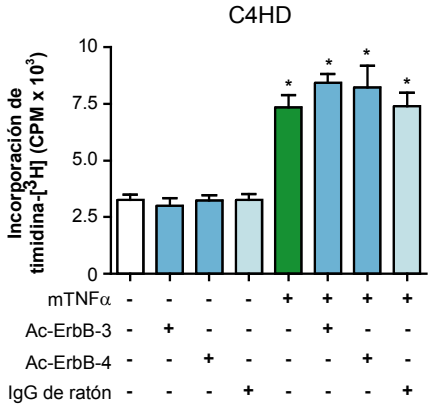


Fig. 33 Participación de ErbB-3 y ErbB-4 en la proliferación inducida por TNFα en células C4HD. Las células C4HD fueron pre-incubadas durante 60 min con los anticuerpos monoclonales anti ErbB-3 o anti ErbB-4 (10 μg/ml) o con una IgG de ratón como control y luego fueron tratadas o no con mTNFα por 48 h, en presencia de un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h. Los resultados presentados son promedio ± ES de octuplicados. El experimento mostrado es representativo de un total de tres realizados. *P<0.001 vs. control.

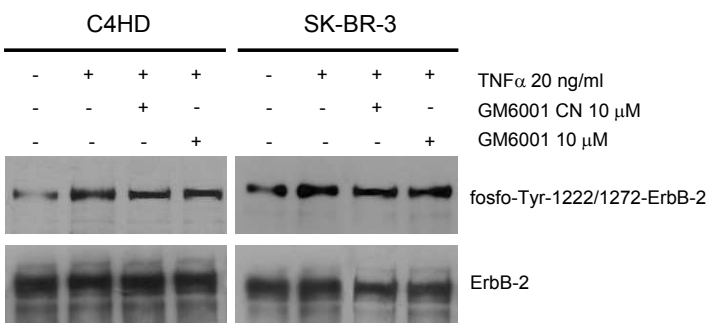


Fig. 34 La fosforilación de ErbB-2 inducida por TNFα no requiere de la actividad de metaloproteasas. Las células C4HD y SK-BR-3 fueron estimuladas con TNFα durante 5 o 10 min respectivamente o fueron pre-tratadas durante 60 min con 10 μM de GM6001 o un análogo estructural que carece de actividad (control negativo, GM6001 CN). La fosforilación de ErbB-2 fue determinada en los extractos celulares utilizando un anticuerpo anti fosfo-Tyr1222/1272-ErbB-2 (*paneles superiores*) y luego sometidas a *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo anti ErbB-2 (*paneles inferiores*).

La quinasa c-Src es mediadora de la fosforilación de ErbB-2 inducida por TNFα

La otra opción considerada fue que el TNFα estuviera activando a ErbB-2 de manera ligando independiente y que la activación de ErbB-2 estuviera ocurriendo mediante la fosforilación directa por quinasas intracelulares. En este sentido, recientemente se ha demostrado que la fosforilación de ErbB-2 en el residuo tirosina 877 (tirosina 927 en ratón), ubicada en el *loop* de activación del dominio quinasa es importante para la actividad quinasa intrínseca (Xu et al, 2007). Curiosamente, observamos que el TNFα indujo un aumento en la fosforilación de ErbB-2 en Tyr877/927 en células SK-BR-3, BT-474 y C4HD (Fig. 35). También ha sido reportado que la tirosina quinasa c-Src fosforila directamente a ErbB-2 en el residuo Tyr877 (Ishizawar et al, 2007). En vista de que el TNFα aumentó la fosforilación en Tyr877/927, nosotros hipotetizamos que la quinasa c-Src podría estar involucrada en

este efecto. Por lo tanto, estudiamos la activación de c-Src y obsevamos que el TNFα indujo la fosforilación de c-Src en el residuo tirosina 416 en células C4HD, entre los 2 y 5 minutos de estimulación (Fig. 36). El pre-tratamiento de células C4HD, BT-474 y SK-BR-3 con PP2, un inhibidor de la familia de quinasas c-Src, o con Dasatinib, un inhibidor de la familia de quinasas Src que se usa en la clínica médica, disminuyó drásticamente la fosforilación de ErbB-2 en tirosina 927/877 inducida por TNFα (Fig. 36).

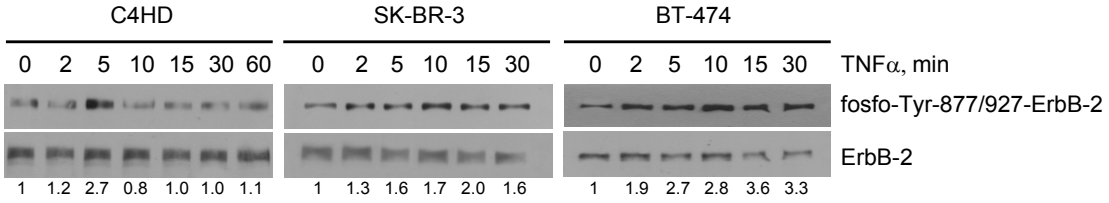


Fig. 35 El TNFα induce la fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr-877/927 en células de cáncer de mama murinas y humanas. Las células C4HD, SKBR-3 y BT-474 fueron tratadas o no con hTNFα durante los tiempos que se indican. Cincuenta µg de proteínas de extractos celulares totales fueron sometidas a SDS-PAGE e inmunoblot con un anticuerpo anti fosfo ErbB-2 Tyr877/927 (*paneles superiores*). Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo anti ErbB-2 (*segundo panel*). Las bandas fueron cuantificadas utilizando *Image J* y se muestra el resultado obtenido dividiendo los niveles de p-Tyr-877/927-ErbB-2 sobre ErbB-2 total. Se muestra un experimento representativo de un total de cuatro con resultados similares.

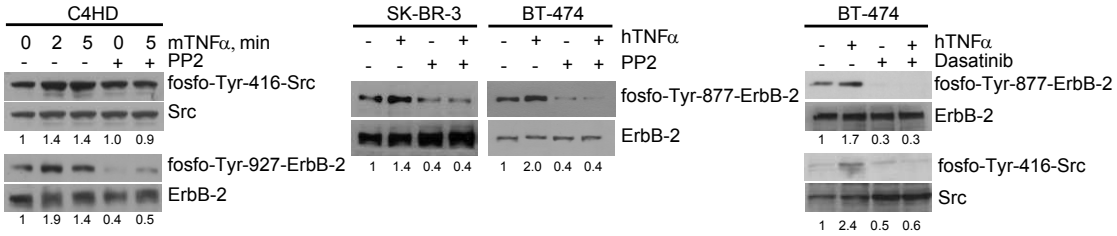


Fig. 36 El TNFα induce la fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr877/927 a través de la activación de c-Src. Las células C4HD y SK-BR-3 fueron pre-incubadas con 10 µM de PP2 durante 60 min y las células BT-474 con 10 µM de PP2 o con 0,5 µM de dasatinib, y luego tratadas o no con TNFα. La actividad de la quinasa c-Src fue determinada en homogenatos proteicos totales mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo que reconoce a c-Src fosforilada en el residuo Tyr416. La c-Src total fue revelada como control. La fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr877/927 fue determinada como se indica en la Fig. 35. Estos experimentos fueron repetidos cuatro veces con resultados similares.

Para determinar si la quinasa c-Src activada por TNFα era capaz de fosforilar a ErbB-2 en el residuo Tyr877 *in vitro*, realizamos un ensayo de fosforilación con ATP no radioactivo. La quinasa c-Src fue inmunoprecipitada de células C4HD tratadas o no con TNFα 5 min, y de células C4HD en las cuales la activación de c-Src había sido bloqueada por PP2. Por otro lado inmunoprecipitamos ErbB-2 a partir de extractos de

células no estimuladas y la utilizamos como una fuente de ErbB-2 no fosforilado en este ensayo. Como se muestra en la Fig. 37, la quinasa c-Src activada por TNFα fue capaz de fosforilar a ErbB-2 en el residuo Tyr877. Ni la quinasa inactiva, ni la inactivada por PP2 indujeron la fosforilación de ErbB-2 (Fig. 37). Además, es conocido que el TNFα es capaz de inducir la fosforilación de c-Src a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Huang et al, 2003b). La presencia de 10 μM de GF109203X, inhibidor de PKC, abolió efectivamente la fosforilación de c-Src inducida por TNFα y la subsiguiente fosforilación del residuo Tyr927 de ErbB-2 (Fig. 38). Estos resultados sugieren fuertemente que el TNFα induce la fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr877/927 y que c-Src es la quinasa involucrada en ese efecto. Por lo tanto, razonamos que la inhibición de c-Src, al conducir la activación de ErbB-2, debería disminuir la proliferación inducida por TNFα. En ensayos de proliferación observamos que dasatinib inhibió completamente el aumento de la incorporación de timidina-[^{3}H] inducido por TNFα (Fig. 39), demostrando que la quinasa c-Src es mediadora de los efectos proliferativos del TNFα en células de cáncer de mama.

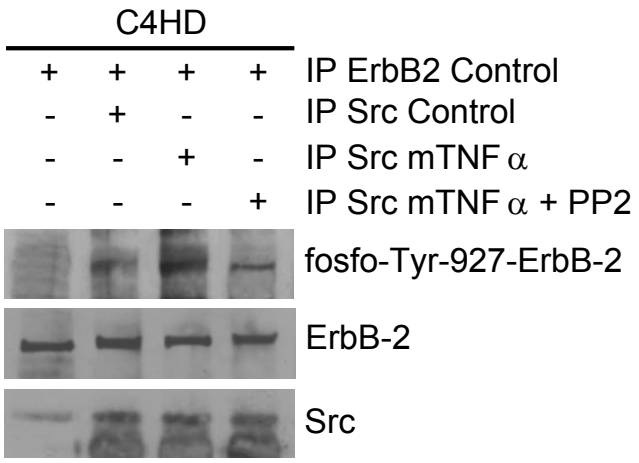


Fig. 37 La quinasa c-Src activada por TNFα fosforila a ErbB-2 en el residuo Tyr 877/927 en células de cáncer de mama. Se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* en el cual la quinasa c-Src fue inmunoprecipitada a partir de células células C4HD pre-incubadas o no con PP2 y luego estimuladas con TNFα durante 5 min. ErbB-2 inmunoprecipitado a partir de células C4HD no estimuladas fue utilizado como sustrato en este ensayo. El ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos. Como control de especificidad, 500 μg de proteínas de células C4HD estimuladas con TNFα durante 5 min fueron inmunoprecipitadas con 2 μg de suero normal de ratón, y sometidas al mismo protocolo de fosforilación *in vitro*. Los *Western blots* de c-Src, fosfo-Tyr 927-ErbB-2 y ErbB-2 fueron realizados como se describe en las Fig. 35 y 36. Este experimento fue repetido dos veces con resultados similares. IP: inmunoprecipitación.

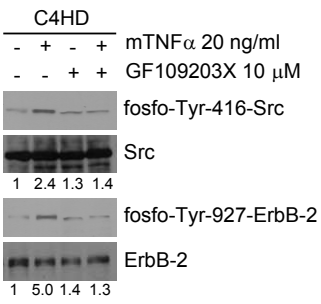


Fig. 38 Participación de PKC en la activación de c-Src inducida por TNFα. Las células C4HD fueron pre-incubadas con 10 μM de GF109203X durante 60 min previo al agregado de TNFα. La fosforilación de ErbB-2 en el residuo Tyr927 y la de c-Src se determinó como se describe en las Fig. 35 y 36. Las bandas fueron cuantificadas utilizando *Image J* y se muestra el resultado obtenido dividiendo los niveles de p-Tyr-877/927-ErbB-2 sobre ErbB-2 total. Se muestra un experimento representativo de un total de tres con resultados similares.

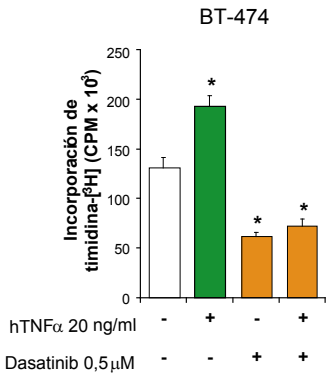


Fig. 39 Participación de la quinasa c-Src en la proliferación inducida por TNFα en células de cáncer de mama humano. Las células BT-474 fueron pre-incubadas con 0,5 μM de dasatinib durante 60 min previo al agregado de 20 ng/ml de hTNFα durante 48 h, en presencia de un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h. El experimento mostrado es representativo de tres realizados (*P<0,01 vs. control).

TNFα induce la fosforilación de ErbB-3, su dimerización con ErbB-2 y el reclutamiento de PI3-K a ErbB-3.

En los últimos años se ha establecido que el heterodímero ErbB-2 y ErbB-3 funcionan como una unidad oncogénica (Holbro et al, 2003) y que c-Src regula positivamente la formación, activación y posterior señalización de heterocomplejos inducidos por ligandos de RTK-I (Ishizawar et al, 2007). Con el objetivo de caracterizar más exhaustivamente la transactivación de ErbB-2 por TNFα, monitoreamos los niveles de fosforilación de ErbB-3 y EGFR, la heterodimerización de ErbB-2 con ErbB-3 y la asociación de la subunidad p85 de la PI3-K con ErbB-3 como intermediario de la activación de Akt. Evaluamos la fosforilación en tirosina de ErbB-3 en células C4HD y SK-BR-3, y la de EGFR en células SK-BR-3. Para ello, ErbB-3 fue inmunoprecipitado utilizando un anticuerpo específico y el contenido de tirosinas fosforiladas totales fue detectado mediante *Western blot*. El TNFα causó un aumento en la fosforilación de ErbB-3 en ambos tipos celulares, pero no afectó sustancialmente la fosforilación en tirosina de EGFR en células SK-BR-3 (Fig. 40). El silenciamiento de la proteína ErbB-2 mediante siRNA, inhibió la fosforilación de ErbB-3 inducida por TNFα (Fig. 40). Mediante co-inmunoprecipitaciones en células C4HD, mostramos que el TNFα indujo la heterodimerización de ErbB-2 con ErbB-3, la cual fue reducida en presencia de PP2 (Fig. 41). El experimento reverso en el cual se muestra la presencia de ErbB-2 en inmunoprecipitados de ErbB-3 se muestra en la Fig. 41 con resultados similares. La asociación de ErbB-3/ErbB-2 inducida por HRG se muestra como control. ErbB-3 es el único integrante de la familia ErbB con la capacidad de unir a la subunidad p85 de PI3-K y activar a Akt. Nuestros resultados muestran que el TNFα indujo la asociación de p85 a ErbB-3 a los 10 minutos de estimulación, similar a lo observado por tratamiento con HRG (Fig. 41).

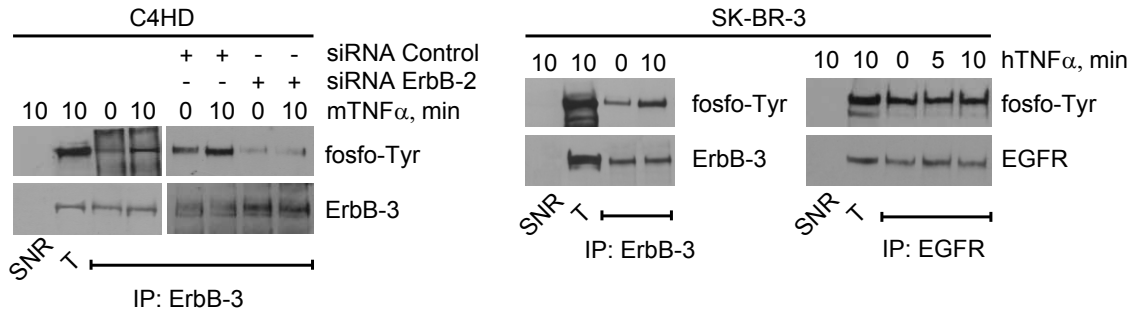


Fig. 40 El TNFα induce la fosforilación de ErbB-3 de manera dependiente de ErbB-2. Las células C4HD y SK-BR-3 fueron incubadas con TNFα durante los tiempos que se indican y se realizó la inmunoprecipitación de ErbB-3 o de EGFR. Los inmunoprecipitados fueron revelados con un anticuerpo anti fosfotirosina (*paneles superiores*) y las membranas fueron sometidas a *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo anti ErbB-3 o EGFR. Las células C4HD fueron también transfectadas con 25 nM de siRNA contra ErbB-2 para silenciar la expresión de ErbB-2 o siRNA control previo al tratamiento con TNFα. SNR suero normal de ratón, T extractos celulares totales, IP inmunoprecipitación. Los experimentos mostrados son representativos de tres realizados.

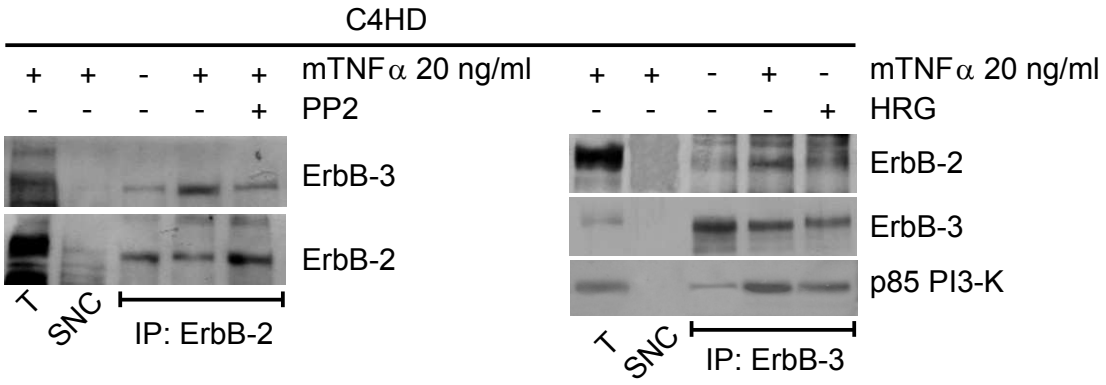


Fig. 41 El TNFα induce la heterodimerización de ErbB-2 con ErbB-3 y el reclutamiento de PI3-K a ErbB-3. La asociación de ErbB-2 con ErbB-3 fue analizada mediante inmunoprecipitación en células C4HD incubadas con TNFα durante 10 min. Las células C4HD fueron pre-incubadas con PP2 durante 60 min previo al agregado de TNFα. ErbB-3 fue analizado mediante *Western blot* y la membrana fue sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo anti ErbB-2 para verificar que cantidades similares de esa proteína habían sido cargadas en el gel. La inmunoprecipitación reversa, usando anticuerpos anti ErbB-3, fue también realizada. Las células fueron incubadas con TNFα o con HRG durante 10 min. El ErbB-2 fue analizado mediante *Western blot* y la membrana fue sometida a *stripping* y revelada con un anticuerpo anti ErbB-3 para verificar que cantidades similares de esa proteína habían sido cargadas en el gel. La parte inferior de la membrana se reveló con un anticuerpo que reconoce la subunidad p85 de la PI3-K. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos realizados. SNC suero normal de conejo, T extractos celulares totales, IP inmunoprecipitación. Los experimentos mostrados son representativos de tres realizados.

El bloqueo de la fosforilación de ErbB-2 inhibe la activación de PI3-K/Akt inducida por TNFα.

En el Capítulo I de esta Tesis se ha demostrado que las vías de transducción de señales de p42/p44 MAPK, PI3-K/Akt y JNK son activadas por TNFα en células C4HD y que son necesarias para la inducción de la proliferación en células de cáncer de mama (Rivas et al, 2008). Dado que observamos que el bloqueo de la fosforilación de ErbB-2 inhibe la proliferación de las células C4HD inducida por TNFα (Fig. 26), luego exploramos de qué manera esta inhibición podría afectar a las vías de transducción de señales arriba mencionadas. La activación de Akt por TNFα fue significativamente inhibida por AG825 o por el silenciamiento de ErbB-2 utilizando siRNA, mientras que la fosforilación de p42/p44 MAPK no fue modificada en las células C4HD y SK-BR-3 (Fig. 42). Por su parte, la presencia de PP2 inhibió completamente la activación de Akt y p42/p44 MAPK inducida por TNFα (Fig. 42), confirmando que c-Src es requerida para ambas vías de señalización. Resultados similares se obtuvieron en la línea celular SK-BR-3 (Fig. 42). Por otro lado, la activación de JNK no fue afectada por la presencia de PP2 (datos no mostrados) ni por la de AG825 (Fig. 42).

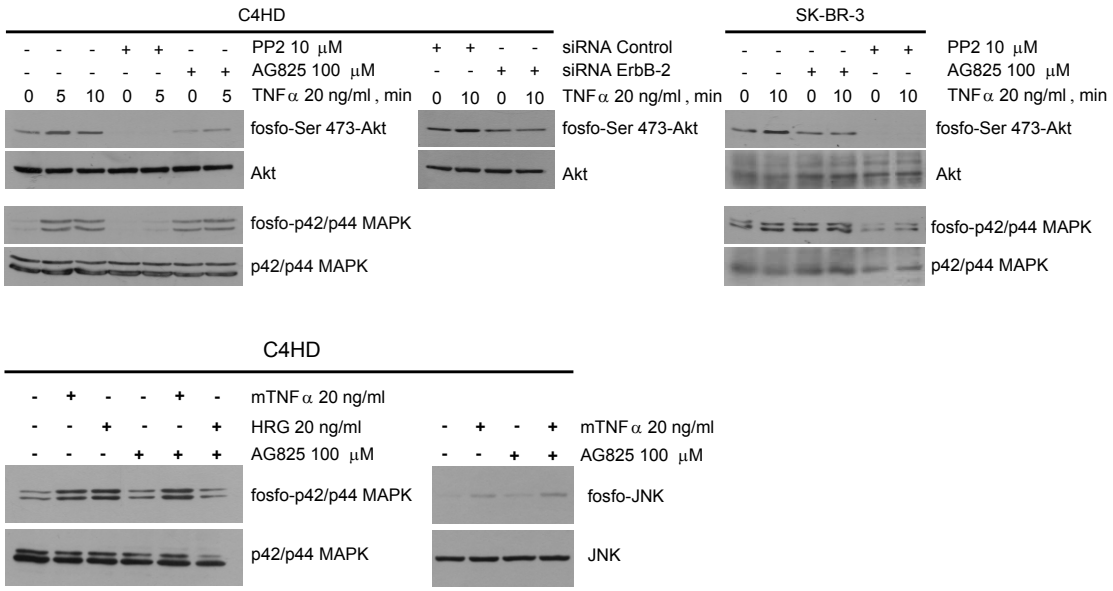


Fig. 42 El TNFα induce la activación de Akt de manera dependiente de la quinasa c-Src y de ErbB-2. Células C4HD y SK-BR-3 fueron pre-incubadas con 100 μM de AG825 o con 10 μM de PP2 previo al agregado de TNFα durante los tiempos que se indican. Las células C4HD fueron transfectadas de manera transitoria con 25 nM de siRNA contra el ErbB-2 murino o con siRNA control previo al tratamiento con TNFα. La activación de Akt fue determinada mediante *Western blot* usando un anticuerpo específico que reconoce a Akt fosforilada en el residuo Tyr 473. Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo anti Akt total como control de carga del gel. La

activación de las quinasas p42/p44 MAPK y JNK de fue también determinada mediante *Western blot*. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos realizados.

En resumen, nuestros resultados muestran que la fosforilación de ErbB-2 inducida por TNFα conduce a la fosforilación de ErbB-3, a la heterodimerización de ErbB-2/ErbB-3 de manera independiente de ligandos de ErbBs, y la asociación de la p85 PI3-K. Además, mostramos que la autofosforilación de ErbB-2 es necesaria para la activación de Akt inducida por TNFα y que la misma no tiene efecto sobre la activación de p42/p44 MAPK o de JNK.

La inhibición de la actividad tirosina quinasa de ErbB-2 bloquea la activación del factor de transcripción NF-κB inducida por TNFα

Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de ErbB-2 se correlaciona con la activación constitutiva de NF-κB en cáncer de mama (Zhou et al, 2000; Biswas et al, 2004). Por otro lado, nosotros hemos demostrado en esta Tesis que la actividad de NF-κB es esencial para la proliferación de las células de cáncer de mama inducida por TNFα (Rivas et al, 2008). En este contexto, examinamos si ErbB-2 estaba involucrado en la activación de NF-κB por TNFα. Para ello, las células SK-BR-3 fueron transfectadas de manera transitoria con la construcción reportera que contiene al elemento de respuesta a NF-κB (κB) río arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga, utilizada previamente en el Capítulo I de esta Tesis. El tratamiento con TNFα o HRG indujo un aumento de 6 o 3 veces en la activación transcripcional de NF-κB, respectivamente (Fig. 43). El TNFα también indujo el aumento de la actividad del gen reportero conteniendo el elemento de respuesta a NF-κB en las células BT-474 (Fig. 43). Otra manera de evaluar la activación de NF-κB fue mediante ensayos de *Western blot* para la proteína IκBα fosforilada (Fig. 44). Para determinar el efecto del bloqueo de ErbB-2 sobre la actividad NF-κB inducida por TNFα, se hicieron uso de las dos alternativas terapéuticas que se encuentran en la clínica actualmente: el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti ErbB-2 (trastuzumab, Herceptin^{MR}) y con inhibidores de la actividad tirosina quinasa de ErbB-2, utilizando en este caso AG825. De esta forma observamos que la adición de AG825 bloqueó la activación transcripcional inducida por TNFα o HRG en SK-BR-3 y en BT-474, en ensayos de gen reportero y *Western blot* de IκBα (Fig. 43 y 44). Por su parte, el tratamiento de las SK-BR-3 y BT-474 con trastuzumab no modificó la actividad transcripcional de NF-

κB inducida por TNFα, mientras que bloqueó por completo la inducida por HRG en SK-BR-3 (Fig. 43 y 44). Como se expuso en la primera parte de esta Tesis, la activación transcripcional de NF-κB mediante la vía canónica implica la fosforilación de la proteína inhibidora de NF-κB (IκBα) en el citoplasma, su ubiquitinación y degradación lo cual permite que el dímero p65/p50 libre pueda translocarse al núcleo, fosforilarse y activar genes blanco. La Fig. 44 muestra que las células SK-BR-3 tienen un alto nivel de fosforilación basal de p65 NF-κB, de acuerdo con su sobreexpresión de ErbB-2 (Zhou et al, 2000). Estudiamos entonces la fosforilación de p65 NF-κB en respuesta a TNFα en presencia de AG825. La presencia de TNFα indujo un aumento en la fosforilación de p65 NF-κB y la presencia de AG825 inhibió completamente dicho aumento, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante ensayos de gen reportero en la Fig.44.

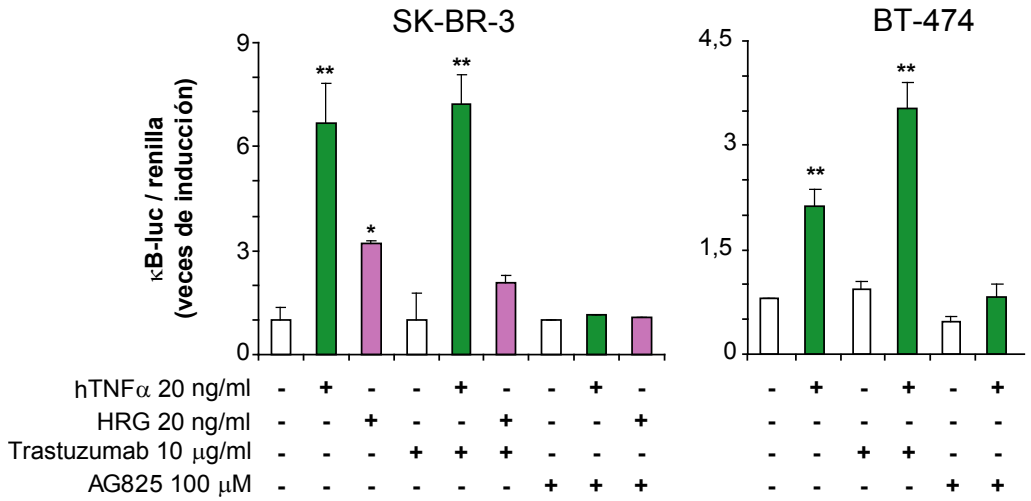


Fig. 43 La transactivación de ErbB-2 es un requisito para la activación transcripcional de NF-κB por TNFα: ensayos de actividad κB-luciferasa. Las células SK-BR-3 y BT-474 fueron transfectadas con un vector conteniendo el elemento de respuesta a NF-κB (sitios κB) río arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga, y posteriormente pre-incubadas con 100 μM de AG825 o con DMSO como control, o con 10 μg/ml de trastuzumab durante 60 minutos previo al agregado de 20 ng/ml hTNFα o con 20 ng/ml de HRG durante 18 h. Las células fueron cosechadas y la actividad luciferasa determinada como se describe en Materiales y Métodos (* P<0,01, **P<0,001 vs. control).

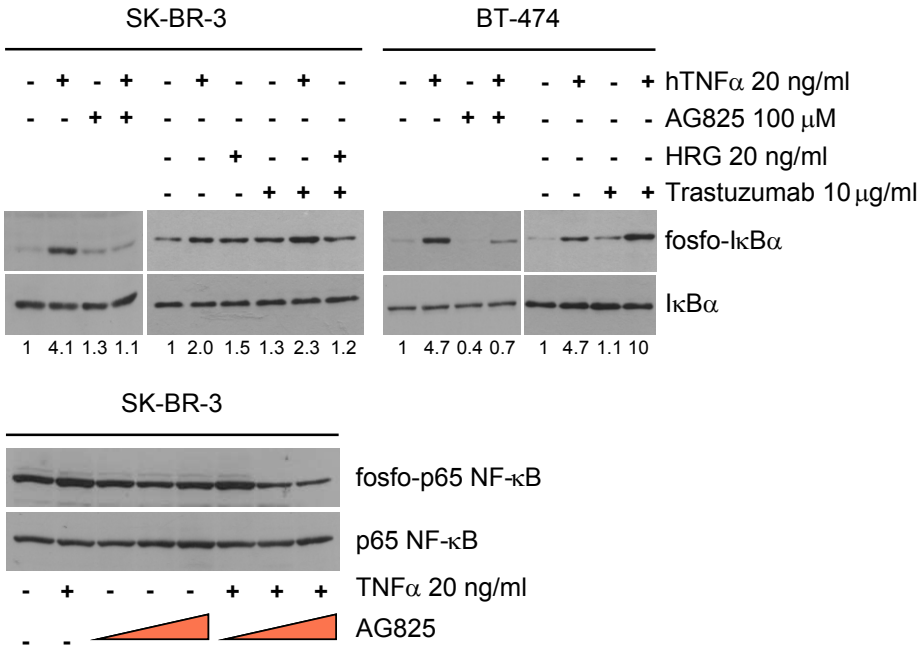


Fig. 44 La transactivación de ErbB-2 es un requisito para la activación transcripcional de NF-κB por TNFα: *Western blot* de IκBα y fosfo-p65. Las células BT-474 fueron pre-incubadas con 100 μM de AG825 y las células SK-BR-3 con 25, 50 o 100 μM (60 min) o con 10 μg/ml de trastuzumab (6 h) previo al agregado de 20 ng/ml hTNFα o con 20 ng/ml HRG durante 10 min. La activación de NF-κB fue determinada mediante *Western blot* de fosfo-IκBα y de fosfo-p65. Como control de carga, las membranas fueron sometidas a stripping y re-incubadas con anticuerpos anti IκBα o p65 total. Las bandas fueron cuantificadas utilizando *Image J* y se muestra el resultado obtenido dividiendo los niveles de p-IκBα sobre IκBα total. Se muestra un experimento representativo de un total de tres con resultados similares.

Por otro lado, utilizamos diferentes mutantes de ErbB-2 humano para explorar el rol de ErbB-2 en la activación de NF-κB. Para ello las células SK-BR-3 fueron transfectadas con un vector de expresión que codifica para un ErbB-2 que carece de actividad quinasa, denominado aquí "quinasa negativa" (KN) por carecer de los aminoácidos 681 a 895 que contiene el sitio de unión a ATP, y por lo tanto es incapaz de fosforilar a otras proteínas (Eisenberg et al, 2004) o con uno que codifica para una mutante puntual no fosforilable en el residuo 877 (cambio de nucleótido tirosina por fenilalanina, Y877F)(Segatto et al, 1990) en ensayos de gen reportero con la construcción κB-luciferasa utilizada previamente. Nuestros resultados muestran que tanto KN-ErbB-2 como ErbB-2-Y877F, pero no el vector vacío pCDNA3.1, impidieron la activación de NF-κB por TNFα (Fig. 45), sugiriendo que la fosforilación de ErbB-2 en Tyr877 inducida por TNFα y la autofosforilación de ErbB-2 son eventos indispensables para que ocurra la activación de NF-κB por TNFα. A la

derecha de la Fig. 45 se muestran *Western blots* que muestran la efectividad de las mutantes de ErbB-2 utilizadas.

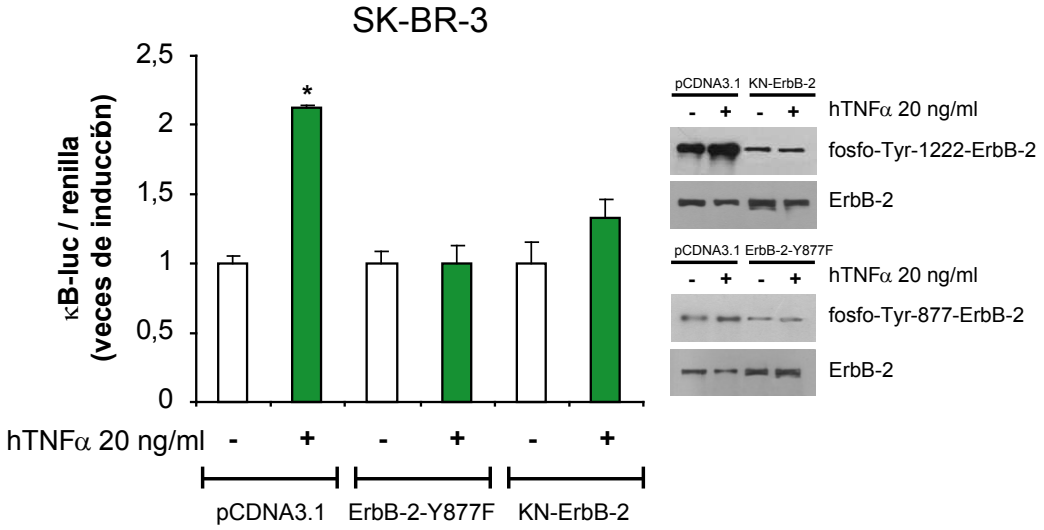


Fig. 45 La transactivación de ErbB-2 es un requisito para la activación transcripcional de NF-κB por TNFα: uso de mutantes dominantes negativas de ErbB-2. Las células SK-BR-3 fueron transfectadas de manera transitoria con los vectores ErbB-2-Y877F, que contiene una mutación de reemplazo de una tirosina por fenilalanina en posición 877, o con el vector KN-ErbB-2, que carece de actividad quinasa, o con el vector vacío correspondiente (pCDNA3.1). Además fueron cotransfectadas con el vector reportero κB-luciferasa. Las células fueron incubadas o no en presencia de TNFα y la actividad luciferasa fue determinada como se indica en Materiales y Métodos. Extractos de células SK-BR-3 transfectadas con 2 μg del vector ErbB-2-Y877F o pCDNA3.1 y tratadas con TNFα durante 10 min se resolvieron por SDS-PAGE y se reveló para determinar la fosforilación del residuo Tyr877 como se describió previamente, para confirmar la efectividad de dicha mutante dominante negativa. Para evaluar la efectividad de KN-ErbB-2, extractos de células SK-BR-3 transfectadas con 2 μg del vector KN-ErbB-2 o pCDNA3.1 y tratadas con TNFα durante 10 min se resolvieron por SDS-PAGE y se reveló para determinar la fosforilación del residuo Tyr1222 como se describió previamente. Se muestra un experimento representativo de un total de tres con resultados similares.

Además, examinamos el efecto del silenciamiento de ErbB-2 mediante el uso de siRNA sobre la actividad de NF-κB inducida por TNFα. La transfección con estos siRNA redujo los niveles de expresión de ErbB-2 en un 80-95%, mientras que un siRNA control negativo no modificó los niveles de ErbB-2 (Fig. 46). El silenciamiento de la expresión de ErbB-2 inhibió completamente la activación transcripcional de NF-κB inducida por TNFα en células C4HD (Fig. 47) en ensayos de gen reportero y *Western blot* de fosfo-IκBα. Luego, utilizamos una estrategia de reconstitución para generar células C4HD que expresaran ErbB-2 humano salvaje (hErbB-2wt). Observamos que la transfección con el vector de expresión hErbB-2wt

recuperó completamente la activación transcripcional inducida por TNFα que se había perdido utilizando un siRNA contra el ErbB-2 murino (Fig. 47).

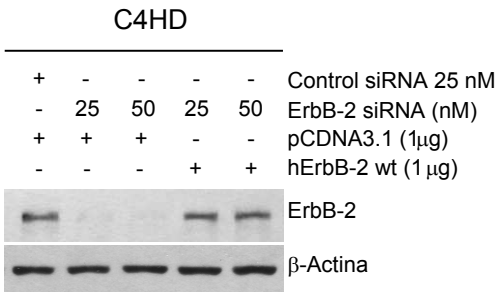


Fig. 46 Efectividad de la reconstitución de la expresión de ErbB-2 en células C4HD a las que se les silenció ErbB-2. Las células C4HD fueron cotransfectadas durante 48 h con 25 o 50 nM de siRNA contra el ErbB-2 murino o con siRNA control y con 1μg del vector de expresión de ErbB-2 humano salvaje (hErbB-2wt) o con el vector vacío (pCDNA3.1). Los niveles de expresión de ErbB-2 se determinaron mediante *Western blot*.

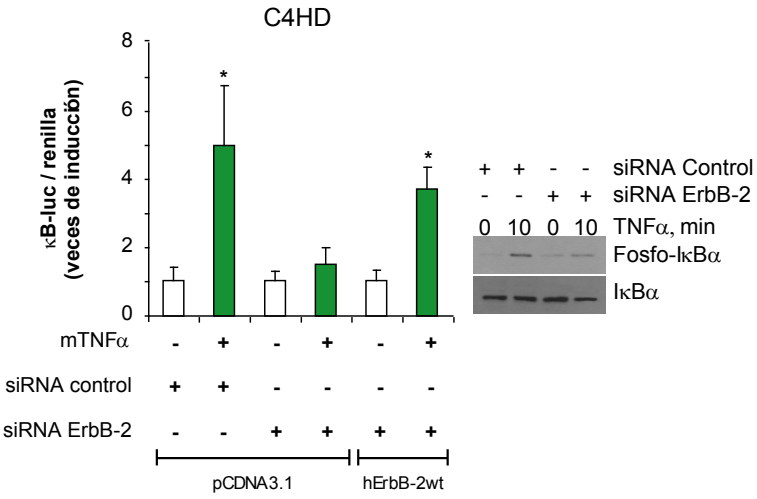


Fig. 47 La transactivación de ErbB-2 es un requisito para la activación transcripcional de NF-κB por TNFα: ensayos de silenciamiento y reconstitución de ErbB-2. Las células C4HD fueron cotransfectadas durante 48 h con 25 nM de siRNA contra el ErbB-2 murino o con siRNA control y con 1μg del vector de expresión de ErbB-2 humano salvaje (hErbB-2wt) o del vector vacío (pCDNA3.1). En el mismo ensayo se cotransfectó con el vector reportero κB-luciferasa. Las células fueron incubadas o no en presencia de TNFα durante 18 h y la actividad luciferasa fue determinada como se indica en Materiales y Métodos. En el panel de la derecha, se muestra el *Western blot* de fosfo-IκBα realizado en extractos de células C4HD a las que se les silenció ErbB-2 mediante tratamiento con siRNA previo al tratamiento con mTNFα durante 10 min. La membrana fue sometida a *stripping* y se reveló IκBα como control de carga del gel. Se muestra un experimento representativo de un total de tres con resultados similares.

Finalmente exploramos la regulación del gen de ciclina D1, dado que es clave en la regulación del ciclo celular y su promotor contiene sitios de respuesta a NF-κB (Fig. 4) (Hinz et al, 1999). El tratamiento con TNFα de células SK-BR-3 transfectadas con un vector reportero conteniendo el promotor de ciclina D1 río arriba del gen de luciferasa estimuló la actividad reportera 3 veces (Fig. 48). La presencia de AG825 bloqueó la activación del promotor de ciclina D1 inducida por TNFα. Notablemente, la presencia de trastuzumab no modificó la capacidad del TNFα de inducir la activación del promotor de ciclina D1 (Fig. 48). Mediante ensayos de *Western blot*

utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína ciclina D1, observamos que el TNFα indujo un aumento en la expresión de dicha proteína de alrededor del 90% a las 24 y las 48 hs de estimulación (Fig. 49) en células BT-474. La presencia del inhibidor farmacológico de ErbB-2, AG825, inhibió completamente el aumento de expresión inducido por TNFα. También utilizamos el compuesto GW2974, análogo estructural del inhibidor de la actividad tirosina quinasa de ErbB-2/EGFR, ditosilato de lapatinib, que se utiliza en la clínica médica para el tratamiento de pacientes con tumores que sobreexpresan ErbB-2. La presencia de GW2974 fue capaz de inhibir el aumento de expresión de la proteína ciclina D1 inducido por TNFα (Fig.49). Sin embargo, el trastuzumab, usado a una concentración de 10 μg/ml, fue incapaz de inhibir el aumento de expresión de ciclina D1 inducido por TNFα (Fig. 49). Cabe destacar que el trastuzumab, a la concentración indicada fue efectivo para inhibir la fosforilación de la quinasa Akt en el residuo Ser473, un marcador de la actividad de trastuzumab, en células SK-BR-3 y BT-474 (Fig. 50). Estos resultados aportan evidencias de que la activación de NF-κB y expresión de la proteína ciclina D1 por TNFα están mediadas por ErbB-2 en células de cáncer de mama.

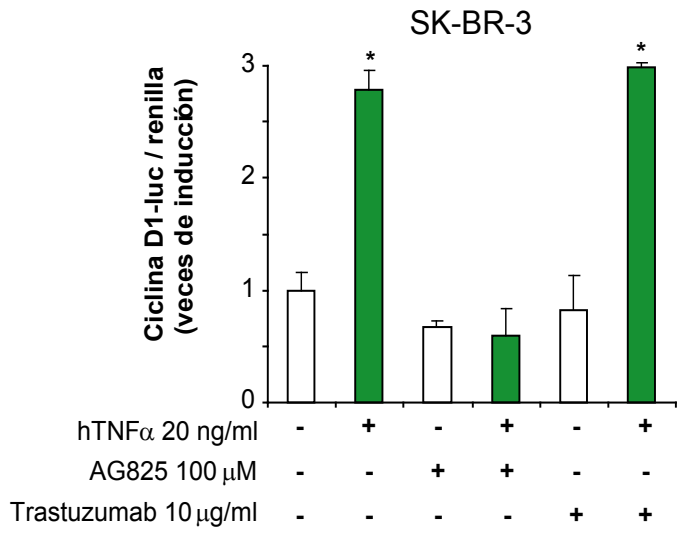


Fig. 48 El aumento de actividad del promotor de ciclina D1 inducido por TNFα es bloqueado por inhibidores farmacológicos de ErbB-2, pero no por trastuzumab en células de cáncer de mama humano. Las células SK-BR-3 fueron transfectadas de manera transitoria con un vector conteniendo al promotor de ciclina D1 río arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga. Las células fueron pre-incubadas con 100 μM de AG825 (60 min) o con 10 μg/ml de trastuzumab (6 h) previo al agregado de 20 ng/ml de TNFα durante 18 h y la actividad luciferasa fue determinada como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de un total de tres con resultados similares (*P<0,001 vs. control).

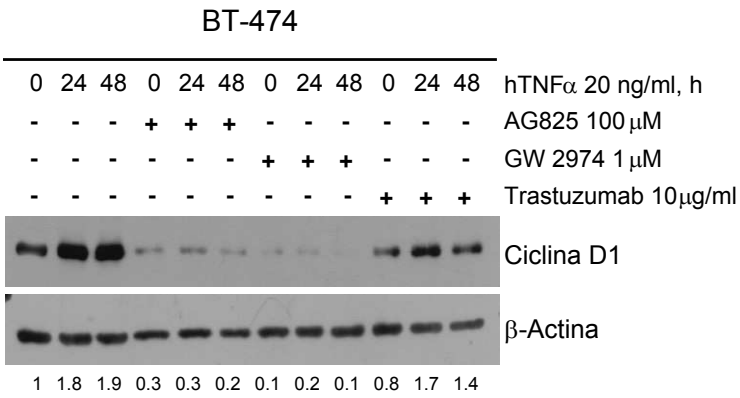


Fig. 49 El aumento de expresión de ciclina D1 inducido por TNFα es bloqueado por inhibidores farmacológicos de ErbB-2, pero no por trastuzumab en células de cáncer de mama humano. Las células BT-474 fueron pre-incubadas con 100 μM de AG825, 1 μM de GW2974 (en ambos casos, 60 min) o con 10 μg/ml de trastuzumab (6 h) previo al agregado de 20 ng/ml de hTNFα durante 24 o 48 h. Los niveles de expresión de ciclina D1 se determinaron por *Western blot* en extractos proteicos totales. La membrana fue sometida a *stripping* y re-incubada con un anticuerpo anti β-actina como control de cargan del gel. Las bandas fueron cuantificadas utilizando *Image J* y se muestra el resultado obtenido dividiendo los niveles de expresión de ciclina D1 sobre β-actina. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

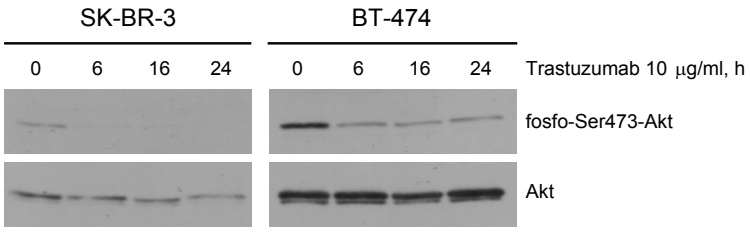


Fig. 50 Efectividad del trastuzumab en células de cáncer de mama humano. Las células SK-BR-3 y BT-474 fueron incubadas en presencia de 10 μg/ml de trastuzumab durante los tiempos que se indican. La inhibición de los niveles basales de activación de Akt se utilizó como un marcador de la efectividad del trastuzumab, y se midió por *Western blot*, como se realizó en la Fig. 42.

El trastuzumab no es efectivo para inhibir la proliferación inducida por TNFα en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2

Dado que el anticuerpo monoclonal trastuzumab no fue efectivo para inhibir la activación de NF-κB, medida por activación de gen reportero o por niveles de fosforilación de IκBα, ni el aumento de expresión de ciclina D1 inducido por TNFα, nos preguntamos si acaso sería efectivo para inhibir la proliferación inducida por TNFα. Con ese objetivo, realizamos recuentos celulares de células BT-474 a las 96 h de tratamiento, ensayos de proliferación por incorporación de timidina-[^{3}H], o análisis de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular a las 48 h de tratamiento, mediante tinción con ioduro de propidio y citometría de flujo. En presencia de TNFα, observamos una mayor incorporación de timidina-[^{3}H] y un mayor número de células vivas en comparación con el control sin TNFα (Fig. 51). La

presencia de AG825 inhibió completamente el aumento del número de células y el de la incorporación de timidina-[^{3}H]. Sin embargo, cuando utilizamos trastuzumab, el TNFα no perdió la capacidad de aumentar el número de células o la incorporación de timidina-[^{3}H] (Fig. 51). En línea con estos resultados, el análisis de la distribución en las distintas fases del ciclo celular reveló que en presencia de TNFα hubo un porcentaje menor de células en fase G0/G1 y mayor en G2/M (Fig. 51, panel central). El AG825, pero no el trastuzumab, inhibió de manera completa los efectos del TNFα sobre la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (Fig. 51).

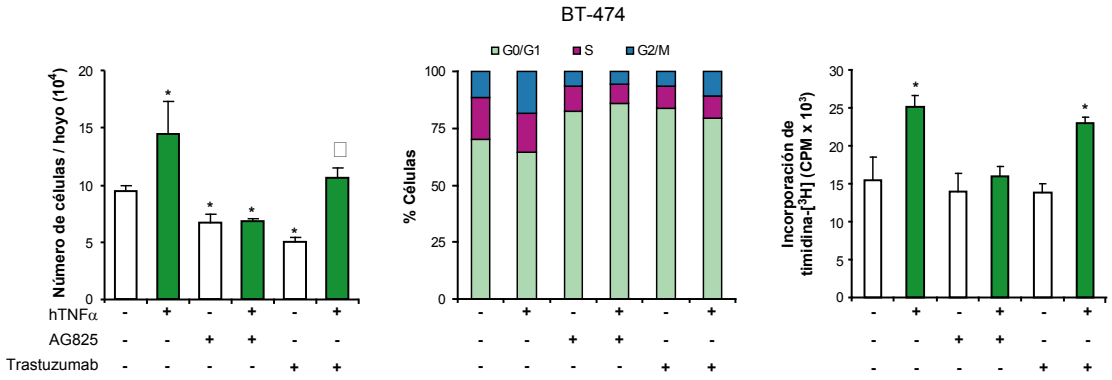


Fig. 51 La proliferación de células de cáncer de mama inducida por TNFα es bloqueada por inhibidores farmacológicos de ErbB-2, pero no por trastuzumab. Las células BT-474 fueron pre-incubadas con 100 µM de AG825 (60 min) o con 10 µg/ml de trastuzumab (6 h) previo al tratamiento con hTNFα. Ensayos de proliferación fueron realizados mediante recuento de células teñidas con el colorante Azul Trypán a las 96 h de cultivo (*P<0,05 vs. control, †P<0,05 vs. trastuzumab), *panel izquierdo*, por análisis de la distribución en las distintas fases del ciclo celular mediante tinción con ioduro de propidio y citometría de flujo a las 48 h de cultivo (fase G_0G_1 P<0,02 TNFα vs. control; fase G_2/M P<0,05 TNFα vs. control; fase G_0G_1 P<0,05 TNFα + trastuzumab vs. trastuzumab; fase G_2/M P<0,05 TNFα + trastuzumab vs. trastuzumab), *panel central*, y por ensayo de incorporación de timidina-[^{3}H] (P<0,01 vs. control), *panel derecho*.

Otra estrategia utilizada para estudiar la posible resistencia al trastuzumab inducida por TNFα, consistió en la utilización de un vector de expresión de TNFα. Las células BT-474, sensibles al tratamiento con trastuzumab, fueron transfectadas de manera transitoria con 1 µg de un vector de expresión de TNFα murino (pS23SMTNF) (Xu et al, 1999) o con el correspondiente vector vacio (pSV2neo), y se realizaron ensayos de proliferación por incorporación de timidina-[^{3}H]. La transfección con TNFα indujo un aumento en la incorporación de timidina-[^{3}H] en comparación con el grupo transfectado con el vector vacío (Fig. 52) y la presencia de trastuzumab inhibió la proliferación de las células transfectadas con el vector vacío,

aunque no fue capaz de disminuir la proliferación de las células que sobreexpresaban TNFα, apoyando la idea de que el TNFα conferiría resistencia a los efectos antiproliferativos del trastuzumab (Fig. 52). Asimismo, se observó que la expresión de TNFα inducía la fosforilación de ErbB-2 (Fig. 52, panel derecho).

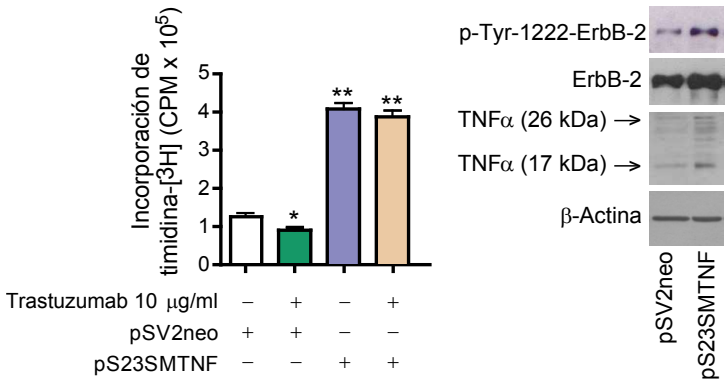


Fig. 52 La expresión de TNFα endógeno en células de cáncer de mama humano confiere resistencia al efecto antiproliferativo del trastuzumab. Las células BT-474 fueron transfectadas con un vector de expresión de TNFα (pS23SMTNF) o con el correspondiente vector vacío (pSV2Sneo). Luego de 48 h, las células fueron incubadas en presencia de 10 μg/ml de trastuzumab y la proliferación fue evaluada a las 48 h de cultivo, en presencia de un pulso de timidina-[^{3}H] durante las últimas 16 h. *P<0.05 y **P<0.001 vs. pSV2Sneo. Panel derecho: *Western blot* de TNFα y de la fosforilación de ErbB2 en el residuo Tyr-1222. Este experimento fue repetido 3 veces con resultados similares.

Efectividad *in vivo* de la proteína de fusión anti-TNFα, etanercept, en el tratamiento de tumores de mama que sobreexpresan ErbB-2

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis sugieren que la presencia de TNFα confiere resistencia a los efectos antiproliferativos del trastuzumab. Por otro lado, hemos detectado mediante *Western blot* que todas las líneas celulares utilizadas en este estudio son capaces de producir, en mayor o menor medida, la citoquina TNFα *in vitro* (Fig. 53). En todas las líneas celulares utilizadas se detectó la expresión de la forma soluble de 17 kDa del TNFα, así como también la del precursor de 26 kDa. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que el tratamiento anti TNFα será útil para la inhibición del crecimiento tumoral en las mencionadas líneas celulares. El etanercept es una proteína de fusión entre el receptor de TNFR2 y el Fc de la IgG humana que se utiliza en la clínica para el tratamiento de la artritis reumatoidea. El mecanismo de acción consiste en el secuestro de las moléculas de TNFα presente en circulación o en los tejidos corporales evitando así los efectos biológicos inducidos por unión a sus receptores.

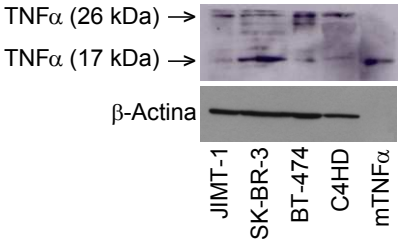


Fig. 53 Expresión de TNFα en las líneas celulares de cáncer de mama humano y murino. Las células fueron cultivadas en el correspondiente medio de cultivo con el agregado de 0,1% SFBCh (C4HD) o 1% SFBCh. Se realizaron homogenatos proteicos y la expresión de TNFα fue evaluada mediante *Western blot*. La membrana fue sometida a *stripping* y re-incubada con anticuerpos anti β-actina. En el *Western blot* se incluyó al mTNFα recombinante como control.

Con este objetivo se implantó un fragmento del tumor C4HD en ratones *nude* y cuando el mismo fue palpable (~50-60 mm^3) se administró etanecept 5 mg/kg i.p. y se estimó el volumen tumoral tres veces por semana. La administración de etanercept disminuyó en un 40% el volumen tumoral y la tasa de crecimiento (Fig. 54, Tabla 2), sugiriendo que terapias anti TNFα serían beneficiosas para el tratamiento de tumores de mama que sobreexpresan ErbB-2 y expresan TNFα. Sin embargo, dado que el trastuzumab no reconoce al ErbB-2 murino, no fue posible utilizarlo en este ensayo.

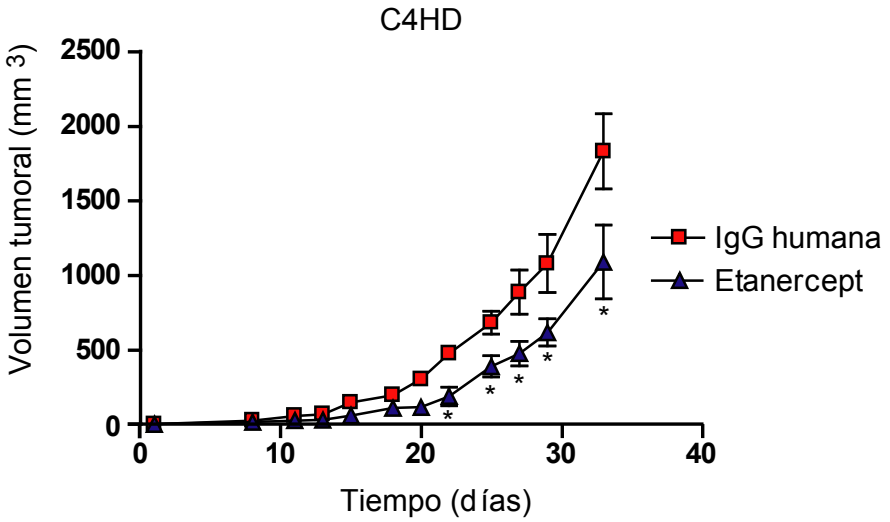


Fig. 54 El tratamiento con etanercept fue efectivo para inhibir el crecimiento del tumor de mama murino C4HD. Ratones hembras vírgenes *nude* fueron inoculados con un fragmento de tumor C4HD de ~1 mm^3 en presencia de un *pellet* de liberación continua de MPA. Cuando los tumores fueron palpables, se comenzó a administrar i.p. 5 mg/kg de IgG humana (grupo control) o 5 mg/kg de etanercept, ambos dos veces por semana por ratón. Se midió regularmente el ancho (A) y largo (L) del tumor, y se estimó el volumen tumoral como (A^2xL)/2. *P<0,05 vs. IgG humana.

Tabla 2 El tratamiento con etanercept es efectivo para inhibir el crecimiento del tumor mamario C4HD

Tratamiento	Día 34		
	Volumen tumoral (mm^3) (media ± SE)	Tasa de crecimiento (mm^3/día)	Inhibición del crecimiento (%)
IgG humana	1830 ± 565[a]	52,8 ± 4,8	
Trastuzumab	1089 ± 605[b]	29,91 ± 3,4	40,5

Los experimentos se realizaron en ratones *nude* como se describió bajo Materiales y Métodos. La totalidad de los ratones desarrolló tumor al cabo de una semana. Al día 14, los animales fueron tratados con etanercept o con una IgG humana como control. El volumen tumoral se estimó usando la fórmula (LxA^2)/2, donde L es la longitud del tumor y A el ancho. La tasa de crecimiento entre los días 14 y 34 fue calculada como la pendiente de la curva de crecimiento. a vs. b $P<0,05$.

Para poder estudiar los efectos de trastuzumab y de etanercept simultáneamente utilizamos como modelo a la línea celular de cáncer de mama humano JIMT-1 (Tanner et al, 2004). Esta línea fue establecida a partir de una paciente con cáncer de mama resistente a trastuzumab y lapatinib, y tiene la particularidad de formar tumores en ratones *nude*. Como se muestra en la Fig. 53, esta línea celular tiene una alta expresión del precursor de TNFα de 26 kDa, aunque la forma madura del TNFα de 17 kDa no fue detectable por *Western blot*. Los tumores establecidos a partir de estas células fueron tratados con trastuzumab 5 mg/kg, etanercept 5 mg/kg o con la combinación de ambos i.p. dos veces por semana. Como control se inyectó a un grupo de ratones portadores del tumor JIMT-1 con IgG humana. Observamos que trastuzumab a la dosis utilizada no modificó el crecimiento tumoral en comparación al grupo control (Fig. 55 y Tabla 3), de acuerdo con la resistencia al trastuzumab que se ha caracterizado para ese modelo (Tanner et al, 2004). La administración conjunta de trastuzumab + etanercept, resultó en una reducción del volumen tumoral del 54% en comparación con los grupos en los cuales cada agente fue usado por separado y del grupo control (Fig. 55 y Tabla 3, $P<0,001$). El análisis histopatológico de estos tumores, mostró que los tumores del grupo tratado con la IgG humana tuvieron un patrón de crecimiento sólido, acordonado, con un alto número de figuras mitóticas por campo (Fig 56, primera columna). Como era

esperable para este tumor, dado su conocida resistencia al trastuzumab, el tratamiento con trastuzumab no modificó notablemente las características histopatológicas del tumor. Sin embargo, el tratamiento con etanercept, se tradujo en un aumento en el porcentaje de necrosis, que presentó un patrón geográfico. Si bien el patrón de crecimiento tumoral continuó siendo columnar, se advirtieron un mayor número de formaciones pseudoductales. El número de figuras mitóticas por campo de alto aumento en la zona viable del tumor, por su parte, fue significativamente menor (4-6 mitosis por campo en el grupo IgG vs. 1-2 por campo en los grupos etanercept o etanercept + trastuzumab) . Una característica que cabe mencionar en los tumores del grupo tratado con trastuzumab + etanercept, fue la presencia de zonas de hialinización, considerado un signo franco de involución del tumor (Fig. 56).

Luego, determinamos la expresión de ErbB-2 mediante inmunohistoquímica en los tumores provenientes de los 4 grupos, utilizando el anticuerpo A0485. Esta marcación es una técnica de rutina en los laboratorios de diagnóstico y los resultados se evalúan asignando un puntaje a la marcación del ErbB-2 comparando con estándares determinados. El puntaje así otorgado puede ser 0 (negativo), o positivo (+) 1, 2 o 3. Al 3+ se lo considera positivo y los pacientes cuyos tumores tienen ese puntaje reciben el tratamiento con trastuzumab. Los tumores calificados como 1+ son considerados como negativos a los fines de administrar el tratamiento y los 2+ son dudosos y la amplificación del gen ERBB-2 debe confirmarse por otros métodos, como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o cromogénica (CISH). Notablemente, el tratamiento con etanercept resultó en un aumento de la marcación para el ErbB-2 en los tumores JIMT-1: observamos que los tumores provenientes del grupo control (IgG), trastuzumab o trastuzumab + herceptina se distribuyeron en 1+ y 2+, y llamativamente los del grupo etanercept fueron en su mayoría 3+ (4 de 5) y 2+ (1 de 5).

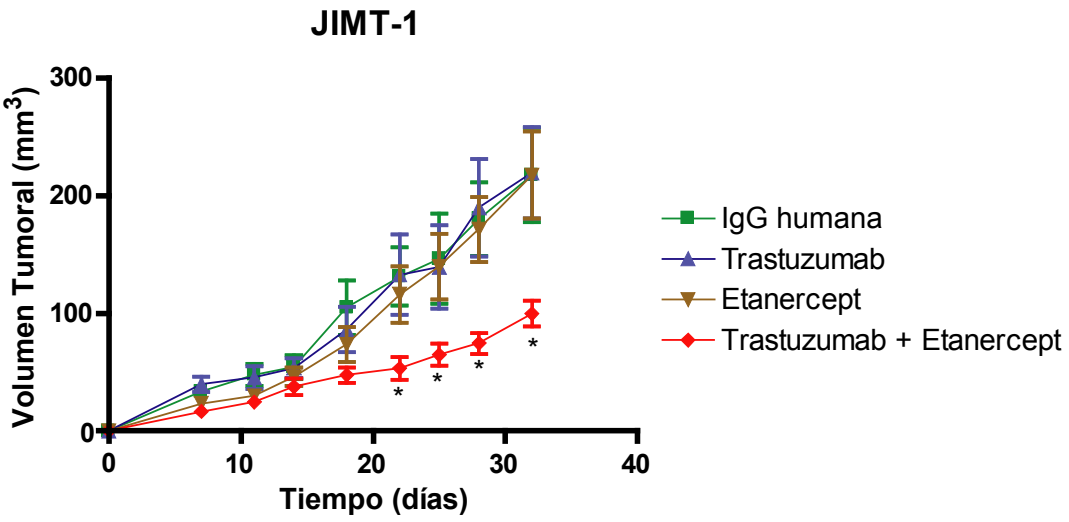


Fig. 55 El tratamiento conjunto con trastuzumab y etanercept fue efectivo para inhibir el crecimiento del tumor de mama resistente a trastuzumab JIMT-1. Tres millones de células JIMT-1 fueron inoculadas en el flanco derecho de 28 ratones hembras *nude* y fueron monitoreados tres veces por semana. El 100 % de los animales desarrollaron tumores al cabo de una semana. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100 mm^3 fueron separados al azar en 4 grupos de 7 animales cada uno y se les comenzó a administrar etanercept (5 mg/kg, dos veces por semana), trastuzumab (5 mg/kg, una vez por semana), ambos en combinación o una dosis equivalente de IgG humana, como control. El ancho y largo del tumor fue medido dos veces por semana y el volumen tumoral estimado como (A^2 X L)/2. Tabla: la tasa de crecimiento fue calculada como la pendiente de la curva de crecimiento, al día 32 del protocolo. *P<0,01 vs IgG humana, trastuzumab, o etanercept.

Tabla 3 El tratamiento combinado con etanercept + trastuzumab es efectivo para inhibir el crecimiento del tumor resistente a trastuzumab JIMT-1

Tratamiento	Día 32			
	Volumen tumoral (mm^3) (media ± SE)	Tasa de crecimiento (mm^3/día)	Inhibición del crecimiento (%)	Figuras mitóticas por HPF Mediana (Rango)
IgG humana	217,6 ± 40,3	6,9 ± 0,8		5 (4-6)
Trastuzumab	219,7 ± 38,8	6,9 ± 0,9		5 (3-6)
Etanercept	217,7 ± 37,0	6,9 ± 0,7		2 (1-4)
Trastuzumab + etanercept	99,9 ± 10,7	2,9 ± 0,2	54,1	1 (0-1)

Los experimentos se realizaron en ratones *nude* como se describió bajo Materiales y Métodos. La totalidad de los ratones desarrolló tumor al cabo de una semana. Al día 12, los animales fueron tratados con trastuzumab, etanercept, o la combinación de ambos, o con una IgG humana como control. El volumen tumoral se estimó usando la fórmula (LxA^2)/2, donde L es la longitud del tumor y A el ancho. La tasa de crecimiento entre los días 12 y 32 fue calculada como la pendiente de la curva de crecimiento.

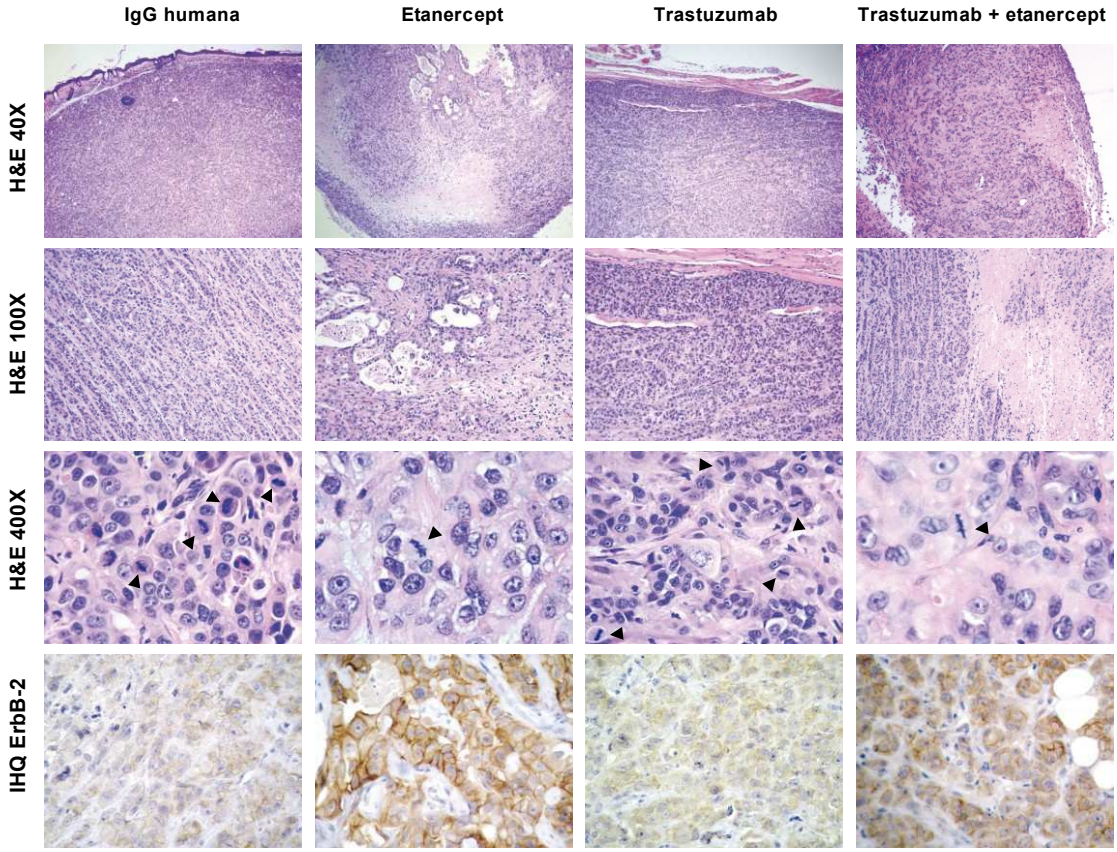


Fig. 56 Cambios histopatológicos en tumores JIMT-1 que recibieron tratamiento con etanercept, trastuzumab o etanercept + trastuzumab. Tumores JIMT-1 extirpados de ratones nude que recibieron tratamiento con IgG humana, etanercept, tastuzumab o ambas drogas en combinación fueron fijados en formaldehído y parafinados. Cortes de 4 µm fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Se muestran secciones representativas de cada grupo de tumores. En la parte inferior de la figura se muestra el resultado de la inmunohistoquímica (IHQ) para ErbB-2 en tumores de los cuatro grupos puntuados como 1+, 3+, 1+ y 2+ respectivamente.

Los *Western blots* realizados con extractos proteicos obtenidos a partir tumores del grupo tratado con trastuzumab o con etanercept mostraron una menor activación de NF-κB, como se comprobó por los niveles de fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB y de la proteína IκBα en comparación con el grupo control tratado con IgG (Fig. 57). Notablemente, los tumores del grupo que fue tratado de manera conjunta con etanercept y trastuzumab, tuvieron una activación aún menor de la vía de NF-κB en comparación con los grupos tratados con las drogas individuales (Fig. 57). Estos resultados sugieren que terapias anti TNFα podrían ser útiles en el tratamiento de tumores que sobreexpresan ErbB-2 y que son resistentes al tratamiento con trastuzumab.

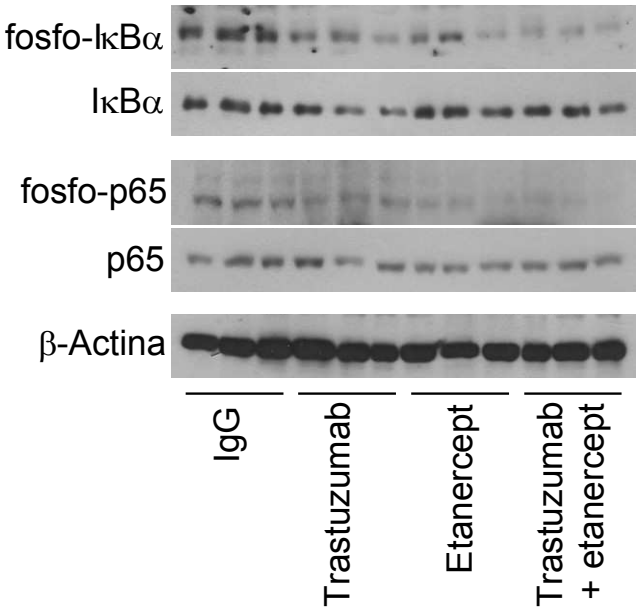


Fig. 57 Activación de la vía de NF-κB en tumores JIMT-1 tratados con trastuzumab, etanercept o ambos compuestos simultáneamente. Se prepararon extractos proteicos a partir de tumores provenientes de 3 ratones de cada grupo y se realizó *Western blot* utilizando los anticuerpos anti fosfo-IκBα o fosfo-p65. Las membranas se sometieron a *stripping* y fueron re-incubadas con anticuerpos que reconocen a IκBα o p65 total. Como control de carga del gel se reveló con un anticuerpo anti β-actina.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El TNFR1 y el TNFR2 inducen la proliferación de células de cáncer de mama convirtiéndolos en posibles blancos terapéuticos

En el presente estudio, analizamos simultáneamente múltiples eventos de señales intracelulares, inducidos por TNFα en células de cáncer de mama, y caracterizamos su rol en la proliferación celular.

Hemos demostrado que las células C4HD expresan constitutivamente TNFR1 y TNFR2, en niveles similares. Estos asemejan los niveles de expresión de ambos receptores en macrófagos, donde el TNFα también induce la proliferación (Mukhopadhyay et al, 2001). También se ha demostrado que las células T47D expresan TNFR1 y TNFR2 (Mathiasen et al, 2001). Aunque existen ciertos reportes sobre el rol de TNFR1 y TNFR2 en la proliferación inducida por TNFα, nuestro trabajo es el primero en investigar la participación de cada TNFR en células de cultivo primario de cáncer de mama que expresan ambos subtipos del receptor en forma endógena, sin la interferencia de estrategias artificiales de sobrexpresión o *knock-out*. La estimulación de cada receptor con muteínas de TNFα o anticuerpos específicos mostraron un grado diferente de respuesta. La muteína R1-TNF fue capaz de activar p42/p44 MAPK, JNK, Akt y NF-κB y de inducir la proliferación al mismo nivel que el TNFα salvaje. Por su parte, la muteína R2-TNF fue capaz de inducir la activación de p42/p44 MAPK de manera similar a su contraparte salvaje, pero no la activación de JNK, Akt, NF-κB y la proliferación celular. Estos hallazgos utilizando muteínas de TNFα demuestran que la unión de ligando por el TNFR1 tanto como por el TNFR2 inducen la activación de caminos de señalización y la proliferación celular, aunque la señal transducida por el TNFR1 es la preponderante. Estos datos apoyan el concepto de que existe redundancia en las funciones de los dos TNFRs. Sin embargo, el cociente exacto entre TNFR1 y TNFR2 necesario para obtener una señalización de la misma magnitud, no está claro. Esto podría deberse a que es necesario un agrupamiento diferencial de los receptores para obtener una señal intracelular.

Otro punto de interés en nuestra investigación, fue explorar las diferentes estrategias de bloqueo de la acción del TNFα en la proliferación del cáncer de mama. El uso de anticuerpos bloqueantes del TNFR1 o del TNFR2 en células murinas C4HD, abolió la fosforilación de p42/p44 MAPK, PI3-K/Akt, JNK y la proliferación

inducida por el TNFα, evidenciando que si bien la estimulación de un solo receptor conduce a esos efectos, es necesario que el otro también sea funcional. En su conjunto, nuestros resultados demuestran que los efectos proliferativos del TNFα pueden ser inhibidos ya sea por el bloqueo independiente de los receptores TNFR1 y TNFR2, o por neutralización de la citoquina misma (Rivas et al, 2008). Pinckard et al. demostraron que el TNFα induce un complejo transitorio con TNFR1 y TNFR2, y que esto ocurre también con los receptores carentes de dominio intracelular (Pinckard et al, 1997). Nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de formación de un heterocomplejo de receptores, la yuxtaposición de sus respectivos dominios intracelulares y la interacción de sus proteínas de señalización respectiva. Es sabido que las proteínas TRADD y TRAF, que se unen a los dominios intracelulares de TNFR1 y TNFR2 respectivamente, son capaces de interactuar entre ellas (Hsu et al, 1995). El reclutamiento de TRAF2 al complejo TNFR1-TRADD sería facilitado cuando TRAF2 puede ser activamente reclutada por TNFR2, durante la formación del heterocomplejo con TNFR1 (Sicinski et al, 1995). La presencia de anticuerpos bloqueantes contra cualquiera de los receptores de TNFα, impediría la formación de este heterocomplejo y su señalización intracelular. En la literatura, la evidencia acumulada sugiere que la proliferación inducida por TNFα sería óptima cuando ambos receptores están presentes. Por ejemplo, en fibroblastos que expresan solo al receptor TNFR1, la proliferación observada es menor a la que se obtiene cuando expresan ambos receptores (Kalb et al, 1996). Adicionalmente, también se sabe que ambos receptores son necesarios para el desarrollo óptimo del cáncer de piel en ratones (Arnott et al, 2004). En macrófagos, que expresan ambos tipos de receptor, la proliferación es aumentada alrededor de cuatro veces por TNFα (Mukhopadhyay et al, 2001), lo cual es comparable a las 2-3 veces de inducción reportadas aquí en células de cáncer de mama C4HD y T47D. En líneas celulares de macrófagos que fueron sujetas a deleción genética de uno u otro receptor, la activación de NF-κB, p42/p44 MAPK, p38 MAPK y la proliferación celular inducida por TNFα fueron abolidas (Mukhopadhyay et al, 2001). Esos resultados están de acuerdo con los obtenidos en este trabajo, usando anticuerpos bloqueantes de los TNFRs: la inactivación de un receptor fue suficiente para impedir la señalización y los efectos biológicos del otro. Nuestros hallazgos revelan que el bloqueo de solo uno de los receptores sería útil para prevenir la proliferación del cáncer de mama mediada por TNFα. El hecho de que el TNFR1 está expresado en casi todos los tipos celulares, pero que el TNFR2 está solo

presente en ciertas células y que se encontraron niveles particularmente altos en carcinomas de mama *in situ*, debería ser tomado en cuenta para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (Garcia-Tunon et al, 2006). En caso de un tumor de mama que exprese los dos receptores de TNFα, el bloqueo de TNFR2 sería más específico hacia el tumor y no tendría los efectos colaterales provenientes del bloqueo sistémico del TNFR1.

NF-κB es un factor de transcripción clave en la proliferación del cáncer de mama inducido por TNFα

NF-κB es uno de los principales factores transcripcionales activados por TNFα. Sin embargo, el mecanismo a través del cual los TNFRs activan al NF-κB, no está completamente dilucidado. En el modelo experimental de cáncer de mama en ratón, C4HD, observamos que la muteína R1-TNF pudo activar al factor de transcripción NF-κB al mismo nivel que el TNFα salvaje, en tanto que la R2-TNF lo activó pobremente. De manera similar, Mc Farlane et al. describieron que la estimulación de NF-κB es principalmente a través de TNFR1 en células de carcinoma cervical humano (McFarlane et al, 2002). Sin embargo, el rol de TNFR2 en la activación de NF-κB inducido por TNFα es controversial. Existen numerosos reportes indicando que TNFR2 solo es insuficiente para activar a NF-κB (Chainy et al, 1996; Kalb et al, 1996) pero que su sobreexpresión puede mediar la activación transcripcional de NF-κB inducida por ligando (Haridas et al, 1998).

En el presente trabajo, hemos también investigado la participación de p42/p44 MAPK, PI3-K/Akt y JNK en la activación de NF-κB inducido por TNFα. El bloqueo de las vías de transducción de señales de JNK o de PI3-K/Akt, abolió la activación transcripcional de NF-κB, así como también la fosforilación de IκBα en respuesta a TNFα, en células murinas C4HD y humanas T47D. Recientemente, dos trabajos han sido publicados al respecto. En uno de ellos, se demuestra que la producción de IL-6 inducida por TNFα está regulada por la activación de NF-κB vía JNK, en células epiteliales de riñón (de Haij et al, 2005). En el otro se demuestra que la activación de JNK es esencial para la expresión de ICAM inducida por IL-1β, a través de la vía de NF-κB en células de carcinoma epitelial de pulmón humano (Lin et al, 2005). En ambos casos, el perfil de activación de JNK es similar al obtenido en células C4HD y T47D. Nuestros resultados sugieren que la activación inicial de JNK juega un rol

importante en la activación de NF-κB, pero que probablemente es desactivado más tarde por genes inducidos por NF-κB, como reportó Tang et al. (Tang et al, 2001). Ozes et al. demostraron que el TNFα induce la activación de NF-κB mediante PI3-K y su quinasa blanco Akt, la cual entonces, induce la fosforilación de IKKα. El inhibidor de PI3-K Wortmanina, una mutante dominante-negativa de la subunidad p85 de PI3-K, y una Akt quinasa deficiente fueron todas capaces de impedir la activación de NF-κB inducida por TNFα en la línea celular 293 (Ozes et al, 1999).

El hecho de que el TNFα sea capaz de activar al NF-κB, ha sido asociado con, al menos, dos aspectos de la tumorigénesis: la promoción de la proliferación celular y la prevención de la apoptosis a través de su capacidad de activar genes involucrados en la proliferación celular y la regulación negativa de la apoptosis, como ciclina D1 y Bcl-X_L entre otros (Karin, 2006). A diferencia de otros tipos celulares que expresan niveles similares de las tres ciclinas en la fase G_1, las células epiteliales mamarias expresan principalmente ciclina D1, y su proliferación es por lo tanto dependiente de esa proteína en particular (Salatino et al, 2001; Sicinski et al, 1995). El promotor del gen de ciclina D1 continen dos sitios κB (Hinz et al, 1999), y hay fuertes evidencias de que la inducción de ciclina D1 dependiente de NF-κB conduce la proliferación de células epiteliales mamarias durante el embarazo (Cao et al, 2001). Recientemente, ha sido demostrado que ciclina D1 es un requerimiento para la carcinogénesis mamaria (Yu et al, 2001) y que el NF-κB promueve la transición de la fase G_1 a S en células de carcinoma mamario humano T47D, a través de la regulación de la expresión de ciclina D1 (Hinz et al, 1999; Rubio et al, 2006). Por otro lado, NF-κB es también un inhibidor de la muerte celular programada. Karin et al. describieron que el modo exacto por el cual el NF-κB inhibe la apoptosis varía entre tipos celulares (Karin y Lin, 2002). Por ejemplo, en una línea celular de carcinoma pulmonar humano, el efecto de supervivencia del NF-κB en respuesta a drogas quimioterápicas está mediado por la expresión de Bcl-X_L y BFL1 (Luo et al, 2000). En el presente trabajo, encontramos que el aumento de expresión de ciclina D1 y Bcl-X_L inducido por TNFα en células C4HD y T47D, fue inhibido por Bay 11-7082 (inhibidor de IκB), demostrando la participación de NF-κB en ese efecto. Estos hallazgos son consistentes con un mecanismo de progresión tumoral por el cual la activación de NF-κB por TNFα conduce tanto a un aumento de proliferación como a la prevención de apoptosis en células de cáncer de mama.

Dado que el TNFα interactúa con dos receptores, TNFR1 y TNFR2, la comprensión del rol específico de cada receptor en la señalización por TNFα, es fundamental para el uso racional del bloqueo de TNFα. Uno de los aportes más importantes de nuestro trabajo, es el hecho de que la proliferación de células de cáncer de mama inducida por TNFα puede ser inhibida mediante anticuerpos bloqueantes dirigidos a uno de los dos receptores o bloqueando la citoquina en sí misma (Rivas et al, 2008). Nuestros resultados demuestran claramente que se requiere que ambos receptores sean funcionales para transducir la señal mitogénica. Estos hallazgos proveen evidencia para que aquellos pacientes cuyas biopsias muestren expresión positiva para TNFR1 o TNFR2, y activación de NF-κB, podrían beneficiarse con una nueva estrategia terapéutica. Ésta podría incluir el tratamiento con anticuerpos dirigidos contra los TNFRs o con antagonistas del TNFα actualmente disponibles en la clínica, discutido en la última parte de esta Discusión.

El TNFα promueve *in vivo* el crecimiento del tumor de mama murino C4HD de manera dependiente de NF-κB.

Uno de los hallazgos más excitantes del presente trabajo es que fuimos capaces de demostrar *in vivo* lo que habíamos observado *in vitro*: la capacidad del TNFα de promover el crecimiento de un tumor mamario. De hecho, nuestros resultados muestran que el TNFα es capaz de inducir la toma del tumor C4HD y de mantener su crecimiento progresivo, eventos que no ocurren en ausencia de TNFα. Aunque muchos trabajos ilustran la capacidad del TNFα de promover *in vivo* la aparición de tumores de piel (Suganuma et al, 1999; Scott et al, 2003), pocos describen esta actividad en cáncer de mama. En este sentido, Scott y otros describieron que la administración de un anticuerpo neutralizante del TNFα, el día anterior a la inoculación de células de tumor de mama 410.4, fue capaz de inhibir el crecimiento *in vivo* del mismo (Scott et al, 2003). Nuestros hallazgos indican que el bloqueo de NF-κB a través de la administración *in vivo* de Bay 11-7082 inhibe el crecimiento del tumor C4HD inducido por TNFα, y previene el aumento de expresión de Bcl-X_L y ciclina D1. El tratamiento *in vitro* de células C4HD con Bay 11-7082 + TNFα resultó en el arresto de las células en fase G_0/G_1 del ciclo celular a las 48 h e indujo la apoptosis a las 96 h. La evaluación histológica de tumores del grupo de animales tratados con mTNFα + Bay 11-7082 reveló una disminución en el índice mitótico y un alto porcentaje de necrosis tumoral y apoptosis. La efectividad de la

inhibición de Bay 11-7082 en este grupo de animales fue confirmada mediante inmunohistoquímica, mostrando que p65 no pudo translocar al núcleo de las células tumorales. Este experimento indica que el bloqueo de NF-κB en células de cáncer de mama lleva al arresto de las células tumorales y luego a la muerte celular. Aunque la regresión tumoral no fue completa luego del tratamiento con Bay 11-7082, la mayoría del tejido tumoral remanente mostraba necrosis, apoptosis y hialinización, y las células tumorales remanentes estaban arrestadas. Los datos *in vitro* mostraron que la activación de p42/p44 MAPK es esencial para la proliferación inducida por TNFα, pero podría involucrar la participación de otro factor de transcripción, diferente de NF-κB. Por lo tanto, la vía de p42/p44 MAPK podría ser la responsable de la supervivencia celular en el tumor marginal.

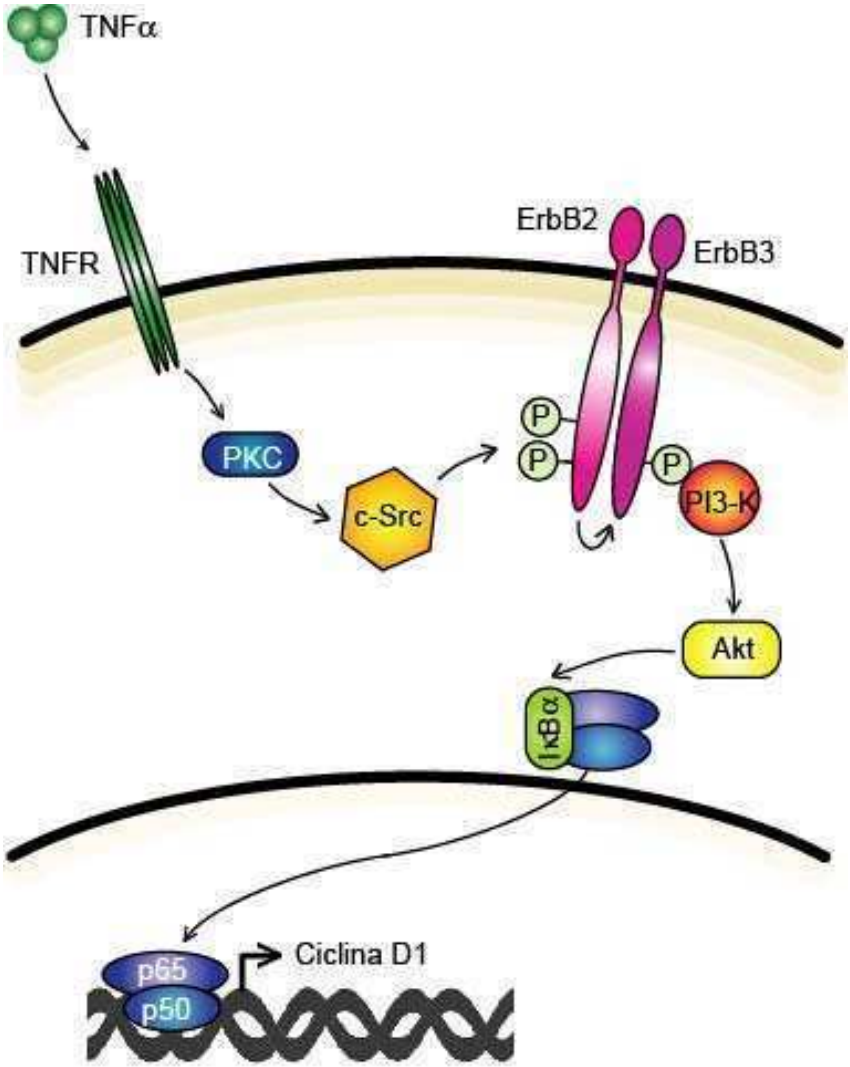
Otro hallazgo novedoso de nuestro trabajo es que demostramos que el TNFα es capaz de promover y mantener el crecimiento de un tumor previamente reportado como dependiente de progestágenos (Kordon et al, 1990). Éstos son conocidos por estar involucrados en la tumorigénesis mamaria (Clarke y Sutherland, 1990). Nuestros resultados podrían ser útiles para dilucidar posibles entrecruzamientos entre los caminos de señalización del TNFα y de los progestágenos. Experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio, en los cuales hemos estudiado la expresión del receptor de progesterona mediante un ensayo de unión a una dosis saturante simple del agonista del RP, R5020-[^{3}H], revelaron que el TNFα aumenta el número de sitios de unión de R5020 en células C4HD y T47D a las 48 de tratamiento (datos no mostrados). Esto sugiere que el TNFα podría sensibilizar a las células de tumor de mama a los efectos de los progestágenos, mediante un aumento del receptor de progesterona. De manera recíproca, el tratamiento con MPA indujo un aumento de la secreción de mTNFα al medio condicionado de cultivos primarios del tumor C4HD, medido por la técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a la enzima (ELISA). Otra evidencia de la secreción de TNFα al medio de cultivo la obtuvimos al estimular a las células C4HD con hTNFα. Mediante la utilización de un *array* de citoquinas por *Western blot* comprobamos que el tratamiento con hTNFα indujo un aumento de 8 veces en la secreción de mTNFα en comparación con el control (datos no mostrados). Estos resultados ponen en evidencia la importancia que tendría el TNFα en el desarrollo del tumor *in vivo*, dado que los progestágenos inducirían la producción de TNFα, y éste a su vez generaría un *loop* autocrino como el que fue reportado que existe en células de cáncer de ovario (Wu et al, 1993; Kulbe et al, 2007).

Adicionalmente, de acuerdo con nuestros resultados obtenidos en el mencionado *array* de citoquinas, el TNFα induce la regulación de varias citoquinas y quimioquinas, entre las cuales se puede mencionar a RANTES (2 veces de inducción vs. control), al interferón-γ (6 veces de inducción), a la IL-6 (2 – 3 veces de inducción), y al factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, 2,5 veces de inducción). El aumento de las mencionadas citoquinas y quimioquinas generaría un ambiente inflamatorio, propicio para el crecimiento del cáncer de mama.

En conclusión, en este trabajo hemos caracterizado, por primera vez, las vías de señalización involucradas en el efecto mitogénico del TNFα en células de cáncer de mama murino y humano, y la regulación de genes responsables de ese efecto. Demostramos que el TNFα actúa como un factor promotor del crecimiento a través de la activación de JNK, p42/p44 MAPK y PI3-K/Akt, los cuales fueron activados tanto por TNFR1 como por TNFR2. También mostramos que el NF-κB es un factor transcripcional clave para la proliferación inducida por TNFα, y que el mismo es activado por JNK y Akt principalmente y parcialmente por p42/p44 MAPK. Remarcablemente, hemos mostrado por primera vez que un tumor sólido establecido puede ser inhibido mediante el bloqueo de NF-κB a través de la administración de un inhibidor farmacológico específico. Estudios previos sobre la inhibición de NF-κB *in vivo* han usado células transfectadas con una mutante no-degradable de IκBα, que previene la translocación al núcleo de NF-κB (Luo et al, 2004). Otra estrategia ampliamente utilizada ha sido la administración de inhibidores selectivos de NF-κB al mismo tiempo, o incluso varios días antes del desafío con el tumor (Park et al, 2007; Matsumoto et al, 2005). Es oportuno mencionar que en el modelo descripto aquí, hemos tratado un tumor de mama establecido, de manera similar a lo que ocurre en la clínica y que la administración de drogas inhibidoras de NF-κB es más simple y eficiente que la transferencia génica *in vivo*. Teniendo en cuenta que la actividad constitutiva de NF-κB correlaciona con una alta probabilidad de mestástasis y mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Biswas et al, 2004), la administración de inhibidores farmacológicos de NF-κB podrían ser útiles como adyuvantes para terapias existentes, para destruir a las células tumorales de manera más eficiente y selectiva.

El TNFα induce la transactivación del RTK-I ErbB-2 mediante la activación de la quinasa c-Src.

En el Capítulo II de esta Tesis Doctoral se demostró por primera vez que el TNFα es capaz de transactivar a ErbB-2 en células de cáncer de mama, por lo tanto se convierte en otro actor en el escenario de la actividad oncogénica de ErbB-2. Hemos desglosado los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación de las células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2 inducida por TNFα demostrando que el TNFα activa a c-Src de manera dependiente de PKC e induce la autofosforilación de ErbB-2 y la fosforilación en el residuo Tyr 877. Esta activación desencadena la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3, la activación de PI3-K/Akt y la activación transcripcional de NF-κB llevando a la proliferación de las células de cáncer de mama (Fig. 58).



◄ **Fig. 58 Modelo de transactivación de ErbB-2 e inducción de la proliferación por TNFα en células de cáncer de mama.** El TNFα se une a su receptor, TNFR, y activa a la proteína quinasa C (PKC), la cual activa a c-Src. Esta quinasa es capaz de fosforilar a ErbB-2 en el residuo Tyr877. ErbB-2 se autofosforila en el residuo Tyr1222 induciendo la heterodimerización de ErbB-2 y ErbB-3, la fosforilación de ErbB-3 y el subsiguiente reclutamiento de la subunidad p85 de PI3-K. Este evento permite la activación de Akt que lleva a la activación del factor de transcripción NF-κB y al consecuente aumento de expresión de ciclina D1 y de la proliferación celular. La cascada de las MAPKs depende de la activación de c-Src pero no de la activación de ErbB-2.

Trabajos previos referidos a la transactivación de ErbB-2 mediante ligandos no clásicos han mostrado que la misma puede proceder a través de dos mecanismos alternativos: uno involucra la activación indirecta de la quinasa a través de la fosforilación intracelular de dominios de ErbBs en residuos tirosina, y el otro involucra la activación de MMPs que clivan ligandos de ErbB unidos a membrana (como el factor semejante al EGF unido a heparina) liberándolos para la unión de ErbBs (Eisenberg et al, 2004; Grant et al, 2002). De acuerdo con el primer mecanismo, existen reportes que muestran que la prolactina produce la transactivación de ErbB-2 a través de la activación de Jak2 y que el factor SDF-1α lo hace a través de la activación de Src (Cabioglu et al, 2005; Yamauchi et al, 2000). Como se describió previamente (Kim et al, 2005), la activación de c-Src es dependiente de ErbB-2, pero también ha sido mostrado recientemente que c-Src en si misma tiene un rol como activador de ErbB-2. c-Src puede interaccionar directamente con el dominio catalítico de ErbB-2 (Kim et al, 2005; Belsches-Jablonski et al, 2001) y fosforilar a ErbB-2 en el residuo Tyr877/927 perteneciente al *loop* de activación del dominio quinasa, estabilizándolo en una conformación abierta y extendida que aumenta la actividad quinasa intrínseca (Xu et al, 2007). En el presente trabajo mostramos que el TNFα induce un aumento de la fosforilación del residuo Tyr877/927 de ErbB-2 en células humanas BT-474 y SK-BR-3 y murinas C4HD, efecto que fue completamente bloqueado por PP2, inhibidor de la familia de quinasas Src. La inhibición farmacológica de c-Src, la fosforilación de c-Src en Tyr416 por tratamiento con TNFα y la fosforilación *in vitro* de ErbB-2 en presencia de c-Src estimulada por TNFα sugieren fuertemente que c-Src es la proteína quinasa mediadora de la transactivación de ErbB-2 inducida por TNFα. Por otro lado, hemos mostrado evidencias de que PKC es un activador jerárquico de c-Src, dado que el tratamiento con GF109203X bloqueó la activación de c-Src y la fosforilación de ErbB-2 en Tyr877/927 inducidas por TNFα. Existen ciertos reportes que indican que

el TNFα es capaz de activar a c-Src. Por ejemplo, la inducción del promotor de ICAM-1 en células epiteliales A549 (Huang et al, 2003a) y la expresión de MMP-9 en células musculares lisas traqueales humanas son ambas dependientes de la activación de c-Src por estimulación con TNFα (Lee et al, 2007). Recientemente fue demostrado que el TNFR1 está constitutivamente asociado con c-Src y que el TNFα induce el reclutamiento de c-Src adicional y aumento de su actividad en células HEK293 y MCF-7 (Pincheira et al, 2008). Todas estas evidencias están de acuerdo con nuestros resultados, lo que implica que caminos de señalización similares serían activados en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2. Por otro lado, la transactivación de EGFR por TNFα es un mecanismo bien documentado que involucra la activación de MMPs, en particular de la enzima convertidora de TNFα, que libera ligandos de EGFR (Lee et al, 2007; Chokki et al, 2006; Chen et al, 2004). Este mecanismo también puede proceder a través de receptores acoplados a proteína G mediante miembros de la familia de proteasas ADAM (Fischer et al, 2003). Sin embargo, en este trabajo no hemos detectado ninguna evidencia que apoye que la transactivación de ErbB-2 inducida por TNFα proceda mediante el clivaje de ligandos de ErbB unidos a membrana. No detectamos tampoco fosforilación de EGFR en células SK-BR-3 tratadas con TNFα. El pre-tratamiento con GM6001, un inhibidor de amplio espectro de MMPs, no modificó la fosforilación de ErbB-2 inducida por TNFα en células C4HD ni SK-BR-3. Además, el bloqueo de la unión de ligandos a ErbB-3 y ErbB-4 mediante el uso de anticuerpos no previno la proliferación inducida por TNFα. Estos resultados muestran que no solo SDF-1α y leptinas (Cabioglu et al, 2005; Eisenberg et al, 2004) sino también el TNFα puede transactivar a ErbB-2 a través de un mecanismo que involucra la activación de c-Src a través del cual el potencial oncogénico de ErbB-2 es aumentado de manera independiente de ligandos de la familia ErbB.

Además nos preguntamos si el TNFα estaría promoviendo una interacción física entre el ErbB-2 y TNFRs. Nuestros intentos de detectar una asociación entre ErbB-2 y TNFR en inmunoprecipitados o mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal no fueron exitosos, sugiriendo que la transactivación de ErbB-2 es un proceso indirecto. En el futuro, sería interesante identificar los componentes de este camino de señalización mediante estudios de proteómica. En línea con estos resultados también ha sido reportada la ausencia de asociación entre ErbB-2 y otros receptores para ligandos como CXCR4, receptores de leptinas y el receptor de

prolactina, que inducen su transactivación (Cabioglu et al, 2005; Eisenberg et al, 2004).

La activación del factor de transcripción NF-κB por TNFα requiere de la presencia de un ErbB-2 funcional.

Uno de los hallazgos más excitantes del presente estudio ha sido la demostración de que el TNFα es capaz de utilizar a ErbB-2 como un componente de su señalización en la generación de señales mitogénicas. De hecho, la activación de PI3-K/Akt y NF-κB y la proliferación celular inducida por TNFα requieren un ErbB-2 funcional. Esta conclusión está basada en la observación de que la inhibición farmacológica de ErbB-2 por AG825, la transfección con ErbB-2-KN o ErbB-2-Y877F o la disminución de la proteína ErbB-2 mediante la estrategia de siRNA inhibieron la capacidad de TNFα de activar a NF-κB. Además, la reconstitución de ErbB-2 mediante transfección recuperó la activación de NF-κB inducida por TNFα que había sido perdida mediante el uso de siRNA ErbB-2, mostrando que este receptor tirosina quinasa es esencial para la activación de NF-κB por TNFα.

En este trabajo también mostramos que el TNFα es capaz de aumentar la actividad tirosina quinasa intrínseca de ErbB-2 que lleva a la activación de ErbB-3, a la formación del heterocomplejo ErbB-2/ErbB-3 y al reclutamiento de PI3-K al ErbB-3. Aunque es ampliamente reconocido que la sobreexpresión de ErbB-2 confiere resistencia a los efectos apoptóticos del TNFα (Hudziak et al, 1988), los mecanismos que promueven estos efectos han sido escasamente caracterizados. En ese sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de ErbB-2 activa de manera constitutiva a la vía antiapotótica Akt/NF-κB, confiriendo resistencia al TNFα en líneas celulares de cáncer de mama (Zhou et al, 2000). Por lo tanto, el bloqueo de la vía de señalización de Akt o la disminución de ErbB-2 mediante tratamiento con doxorrubicinia por ejemplo sensibiliza a las células tumorales a los efectos citotóxicos del TNFα (Sleijfer et al, 1998). Biswas y col. demostraron que la activación de NF-κB se encuentra predominantemente en el subgrupo de pacientes RE negativo/ErbB-2 positivo en comparación con RE positivos en tumores de mama humanos (Biswas et al, 2004). Recientemente, este grupo demostró que la activación de NF-κB en ese subgrupo de cáncer de mama es esencial para la tumorigénesis y la progresión tumoral (Singh et al, 2007). En este trabajo, nosotros demostramos que el TNFα puede activar a ErbB-2 y usarlo como un intermediario para promover la activación de NF-κB sobre el nivel de

activación constitutiva, adicionando un nuevo estrato de complejidad a la señalización de tumores que sobreexpresan ErbB-2.

Una vasta evidencia ha establecido que ErbB-2 es un mediador clave de supervivencia y crecimiento celular y la sobreexpresión del mismo se encuentra en un 16,8 – 25 % de pacientes con cáncer de mama siendo un parámetro de mal pronóstico y curso agresivo de la enfermedad (Frahm et al, 2007; Slamon et al, 1987). El primer agente anti ErbB-2 usado en la práctica clínica es el anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab (Herceptin^{MR}) (Carter et al, 1992). Administrado solo como primera línea de tratamiento en pacientes con cáncer de mama metastásico, el trastuzumab muestra una respuesta global de 38% (Vogel et al, 2002) y ha sido sugerido que un mecanismo posible de resistencia adquirida a trastuzumab podría estar mediado por amplificación de la señalización inducida por ligandos de ErbBs (Ritter et al, 2007). En consecuencia, inhibidores de EGFR/ErbB-2 de bajo peso molecular han avanzado a pruebas clínicas (Johnston et al, 2008). Estos compuestos están diseñados para inhibir el sitio de unión a ATP de estos receptores, bloqueando por lo tanto la actividad quinasa. Aquí nosotros reportamos que el TNFα es una molécula, previamente inexplorada, con capacidad de transactivar a ErbB-2 y demostramos que el tratamiento de células de cáncer de mama humano con trastuzumab no fue efectivo para inhibir la activación transcripcional de NF-κB inducida por TNFα. Sin embargo, tanto la transactivación de ErbB-2 por TNFα que conduce a la activación de NF-κB como la proliferación celular, pudieron ser bloqueadas mediante el uso de inhibidores de la fosforilación de ErbB-2 como el AG825.

Agentes anti TNFα, como el etanercept, podrían ser útiles en el tratamiento de tumores de mama resistentes a los efectos de trastuzumab.

Notablemente, en esta Tesis se demostró que el tratamiento con agentes anti TNFα, como la proteína de fusión etanercept, podrían ser opciones válidas para el tratamiento del cáncer de mama que sobreexpresa ErbB-2. Resulta aún más notorio que el tratamiento combinado de trastuzumab + etanercept disminuyó el crecimiento del tumor de mama humano JIMT-1, creciendo en ratones *nude*, que es resistente al tratamiento con trastuzumab o lapatinib (Koninki et al, 2010). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el TNFα induciría resistencia a los efectos antiproliferativos del trastuzumab, dado que los ratones que recibieron etanercept

recobraron la sensibilidad al trastuzumab. Aunque no hemos caracterizado en profundidad el mecanismo mediante el cual el etanercept podría recuperar la sensibilidad al trastuzumab, es llamativo que la presencia de etanercept indujo un aumento en la marcación de ErbB-2 en membrana plasmática determinada por inmunohistoquímica. Ese hallazgo sugiere la posibilidad de que la presencia de etanercept aumente la biodisponibilidad de ErbB-2, incluso sin inducir un aumento en la proteína *per se*, que genere que más trastuzumab pueda unirse al ErbB-2.

Estos hallazgos en conjunto sugieren fuertemente que los pacientes que ya han sido tratados con trastuzumab, y no muestran respuesta clínica, podrían beneficiarse de una terapia combinada agregando etanercept al esquema de tratamiento. Una de las ventajas que tendría el uso del etanercept para el tratamiento del cáncer de mama, es que se trata de una droga que se encuentra actualmente en el mercado y que ya ha pasado por las fases clínicas para su administración en pacientes. El etanercept es utilizado en la clínica médica para el tratamiento de la artritis reumatoidea, dado que el TNFα es un mediador de los procesos inflamatorios que se producen en los cartílagos de esos pacientes, y presenta, en general una buena tolerancia: el efecto secundario más común que se ha observado en pacientes que recibieron etanercept durante largos períodos de tiempo es una mayor propensión a contraer infecciones, siendo las más comunes las infecciones de las vías respiratorias superiores y las sinusitis. Si bien nosotros no hemos observado ningún cambio apreciable en hígado, pulmón, bazo y riñon mediante análisis histopatológico, quedarían por determinar los efectos adversos de la administración conjunta del etanercept y el trastuzumab en mayor detalle.

En resumen, nuestros hallazgos muestran por primera vez que el TNFα, independientemente de ligandos de ErbBs, es capaz de transactivar a ErbB-2, un requisito obligatorio para la activación transcripcional de NF-κB y la proliferación de células de cáncer de mama inducida por TNFα. Aún cuando se ha demostrado que el TNFα está presente en un alto porcentaje de tumores de mama (Garcia-Tunon et al, 2006), el valor eventual pronóstico del mecanismo descripto en este trabajo en una terapia anti ErbB-2 aún no ha sido establecido. Nuestros hallazgos pueden contribuir a explicar el mecanismo molecular de la resistencia al tratamiento con trastuzumab observado en la clínica, e hipotetizamos que la falta de repuesta a la terapia con anticuerpos monoclonales en pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-

2, podría deberse a que dichos tumores tienen aumentada la vía de señalización del TNFα.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ameloot, P., Fiers W., De Bleser P., Ware C. F., Vandenabeele P., y Brouckaert P. Identification of tumor necrosis factor (TNF) amino acids crucial for binding to the murine p75 TNF receptor and construction of receptor-selective mutants. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**:37426-37430.

Argast, G. M., Campbell J. S., Brooling J. T., y Fausto N. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J. Biol. Chem.* (2004) **279**:34530-34536.

Arnott, C. H., Scott K. A., Moore R. J., Robinson S. C., Thompson R. G., y Balkwill F. R. Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* (2004) **23**:1902-1910.

Baeuerle, P. A. y Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* (1996) **87**:13-20.

Baeuerle, P. A. y Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* (1994) **12**:141-179.

Balana, M. E., Labriola L., Salatino M., Movsichoff F., Peters G., Charreau E. H., y Elizalde P. V. Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene* (2001) **20**:34-47.

Balana, M. E., Lupu R., Labriola L., Charreau E. H., y Elizalde P. V. Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* (1999) **18**:6370-6379.

Balkwill, F. y Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* (2001) **357**:539-545.

Baselga, J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann. Oncol.* (2010) **21 Suppl 7**:vii36-vii40.

Beguelin, W., Diaz Flaque M. C., Proietti C. J., Cayrol F., Rivas M. A., Tkach M., Rosemblit C., Tocci J. M., Charreau E. H., Schillaci R., y Elizalde P. V. Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3. *Mol. Cell Biol.* (2010) **30**:5456-5472.

Beissert, S., Bergholz M., Waase I., Lepsien G., Schauer A., Pfizenmaier K., y Kronke M. Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: in vivo analysis by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (1989) **86**:5064-5068.

Belsches-Jablonski, A. P., Biscardi J. S., Peavy D. R., Tice D. A., Romney D. A., y Parsons S. J. Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene* (2001) **20**:1465-1475.

Biswas, D. K., Shi Q., Baily S., Strickland I., Ghosh S., Pardee A. B., y Iglehart J. D. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2004) **101**:10137-10142.

Brandt-Rauf, P. W., Monaco R., y Pincus M. R. Conformation of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *J. Protein Chem.* (1994a) **13**:227-231.

Brandt-Rauf, P. W., Pincus M. R., y Carney W. P. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. *Crit Rev. Oncog.* (1994b) **5**:313-329.

Brennan, P. J., Kumagai T., Berezov A., Murali R., y Greene M. I. HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene* (2000) **19**:6093-6101.

Burow, M. E., Weldon C. B., Tang Y., Navar G. L., Krajewski S., Reed J. C., Hammond T. G., Clejan S., y Beckman B. S. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res.* (1998) **58**:4940-4946.

Cabioglu, N., Summy J., Miller C., Parikh N. U., Sahin A. A., Tuzlali S., Pumiglia K., Gallick G. E., y Price J. E. CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer Res.* (2005) **65**:6493-6497.

Cao, Y., Bonizzi G., Seagroves T. N., Greten F. R., Johnson R., Schmidt E. V., y Karin M. IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* (2001) **107**:763-775.

Carter, P., Presta L., Gorman C. M., Ridgway J. B., Henner D., Wong W. L., Rowland A. M., Kotts C., Carver M. E., y Shepard H. M. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (1992) **89**:4285-4289.

Chainy, G. B., Singh S., Raju U., y Aggarwal B. B. Differential activation of the nuclear factor-kappa B by TNF muteins specific for the p60 and p80 TNF receptors. *J. Immunol.* (1996) **157**:2410-2417.

Chen, Q. Q., Chen X. Y., Jiang Y. Y., y Liu J. Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein. *Cell Res.* (2005) **15**:504-510.

Chen, W. N., Woodbury R. L., Kathmann L. E., Opresko L. K., Zangar R. C., Wiley H. S., y Thrall B. D. Induced autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor contributes to the response of mammary epithelial cells to tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* (2004) **279**:18488-18496.

Chokki, M., Mitsuhashi H., y Kamimura T. Metalloprotease-dependent amphiregulin release mediates tumor necrosis factor-alpha-induced IL-8 secretion in the human airway epithelial cell line NCI-H292. *Life Sci.* (2006) **78**:3051-3057.

Chuang, M. J., Sun K. H., Tang S. J., Deng M. W., Wu Y. H., Sung J. S., Cha T. L., y Sun G. H. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* (2008) **99**:905-913.

Clarke, C. L. y Sutherland R. L. Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocr. Rev.* (1990) **11**:266-301.

Coussens, L. M. y Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* (2002) **420**:860-867.

de Haij, S., Bakker A. C., van der Geest R. N., Haegeman G., Vanden Berghe W., Aarbiou J., Daha M. R., y van Kooten C. NF-kappaB mediated IL-6 production by renal epithelial cells is regulated by c-jun NH2-terminal kinase. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2005) **16**:1603-1611.

Dentener, M. A., Smit F. T., Francot G. J., y Buurman W. A. Characterization of two monoclonal antibodies directed against bactericidal/permeability-increasing protein. *J. Infect. Dis.* (1994) **170**:1483-1489.

Dran, G., Luthy I. A., Molinolo A. A., Montecchia F., Charreau E. H., Pasqualini C. D., y Lanari C. Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* (1995) **35**:173-186.

Drouet, C., Shakhov A. N., y Jongeneel C. V. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *J. Immunol.* (1991) **147**:1694-1700.

Egberts, J. H., Cloosters V., Noack A., Schniewind B., Thon L., Klose S., Kettler B., von Forstner C., Kneitz C., Tepel J., Adam D., Wajant H., Kalthoff H., y Trauzold A. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* (2008) **68**:1443-1450.

Eisenberg, A., Biener E., Charlier M., Krishnan R. V., Djiane J., Herman B., y Gertler A. Transactivation of erbB2 by short and long isoforms of leptin receptors. *FEBS Lett.* (2004) **565**:139-142.

Elizalde, P. V., Lanari C., Molinolo A. A., Guerra F. K., Balana M. E., Simian M., Iribarren A. M., y Charreau E. H. Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (1998) **67**:305-317.

Esteva, F. J., Guo H., Zhang S., Santa-Maria C., Stone S., Lanchbury J. S., Sahin A. A., Hortobagyi G. N., y Yu D. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am. J. Pathol.* (2010) **177**:1647-1656.

Falls, D. L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell Res.* (2003) **284**:14-30.

Fedi, P., Pierce J. H., di Fiore P. P., y Kraus M. H. Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol. Cell Biol.* (1994) **14**:492-500.

Fischer, O. M., Hart S., Gschwind A., y Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* (2003) **31**:1203-1208.

Frahm, I., Acosta G., Sarancone S., Bravo I., Martins D., Upez Presas A., Marraco G., Lagos N., Calafat I., Paradelo M., Arra A., Mosto J., Gluztein T., Urbano Martinez M., Zoppi J., y Cáceres K. Programa nacional de diagnóstico de la sobre-expresión de HER2 en pacientes con cáncer de mama en Argentina: correlación de la sobre-expresión de HER2 con los factores histológicos pronósticos convencionales. Grupo Cooperativo de HER2. *Oncología Clínica* (2007) **12**:1462-1467.

Garcia-Tunon, I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B., Paniagua R., y Royuela M. Role of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in situ and infiltrative). *Cancer Sci.* (2006) **97**:1044-1049.

Geyer, C. E., Forster J., Lindquist D., Chan S., Romieu C. G., Pienkowski T., Jagiello-Gruszfeld A., Crown J., Chan A., Kaufman B., Skarlos D., Campone M., Davidson N., Berger M., Oliva C., Rubin S. D., Stein S., y Cameron D. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* (2006) **355**:2733-2743.

Ghosh, S. y Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* (2002) **109 Suppl**:S81-S96.

Grant, S. L., Hammacher A., Douglas A. M., Goss G. A., Mansfield R. K., Heath J. K., y Begley C. G. An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells. *Oncogene* (2002) **21**:460-474.

Graus-Porta, D., Beerli R. R., Daly J. M., y Hynes N. E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* (1997) **16**:1647-1655.

Haefner, B. NF-kappa B: arresting a major culprit in cancer. *Drug Discov. Today* (2002) **7**:653-663.

Hanahan, D. y Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* (2000) **100**:57-70.

Haridas, V., Darnay B. G., Natarajan K., Heller R., y Aggarwal B. B. Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, and c-Jun kinase activation. *J. Immunol.* (1998) **160**:3152-3162.

Harris, R. C., Chung E., y Coffey R. J. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* (2003) **284**:2-13.

Hinz, M., Krappmann D., Eichten A., Heder A., Scheidereit C., y Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell Biol.* (1999) **19**:2690-2698.

Holbro, T., Beerli R. R., Maurer F., Koziczak M., Barbas C. F., III, y Hynes N. E. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2003) **100**:8933-8938.

Hou, C. H., Yang R. S., Hou S. M., y Tang C. H. TNF-alpha increases alphavbeta3 integrin expression and migration in human chondrosarcoma cells. *J. Cell Physiol* (2010) .

Hsu, H., Xiong J., y Goeddel D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* (1995) **81**:495-504.

Huang, W. C., Chen J. J., y Chen C. C. c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKKbeta is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Biol. Chem.* (2003a) **278**:9944-9952.

Huang, W. C., Chen J. J., Inoue H., y Chen C. C. Tyrosine phosphorylation of I-kappa B kinase alpha/beta by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression. *J. Immunol.* (2003b) **170**:4767-4775.

Hudziak, R. M., Lewis G. D., Shalaby M. R., Eessalu T. E., Aggarwal B. B., Ullrich A., y Shepard H. M. Amplified expression of the HER2/ERBB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor alpha in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (1988) **85**:5102-5106.

Hynes, N. E. y Lane H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* (2005) **5**:341-354.

Instituto Nacional del Cáncer. http://www.msal.gov.ar/inc/equipos_analisis.asp. *Website del Instituto Nacional del Cáncer de Argentina* (2010) .

Ishizawar, R. C., Miyake T., y Parsons S. J. c-Src modulates ErbB2 and ErbB3 heterocomplex formation and function. *Oncogene* (2007) **26**:3503-3510.

Johnston, S., Trudeau M., Kaufman B., Boussen H., Blackwell K., LoRusso P., Lombardi D. P., Ben Ahmed S., Citrin D. L., DeSilvio M. L., Harris J., Westlund R. E., Salazar V., Zaks T. Z., y Spector N. L. Phase II study of predictive biomarker profiles for response targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) in advanced inflammatory breast cancer with lapatinib monotherapy. *J. Clin. Oncol.* (2008) **26**:1066-1072.

Kalb, A., Bluethmann H., Moore M. W., y Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors (Tnfr) in mouse fibroblasts deficient in Tnfr1 or Tnfr2 are signaling competent and activate the mitogen-activated protein kinase pathway with differential kinetics. *J. Biol. Chem.* (1996) **271**:28097-28104.

Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* (2006) **441**:431-436.

Karin, M., Cao Y., Greten F. R., y Li Z. W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* (2002) **2**:301-310.

Karin, M. y Greten F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* (2005) **5**:749-759.

Karin, M. y Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* (2002) **3**:221-227.

Kim, H., Chan R., Dankort D. L., Zuo D., Najoukas M., Park M., y Muller W. J. The c-Src tyrosine kinase associates with the catalytic domain of ErbB-2: implications for ErbB-2 mediated signaling and transformation. *Oncogene* (2005) **24**:7599-7607.

Kim, S., Takahashi H., Lin W. W., Descargues P., Grivennikov S., Kim Y., Luo J. L., y Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* (2009) **457**:102-106.

Koninki, K., Barok M., Tanner M., Staff S., Pitkanen J., Hemmila P., Ilvesaro J., y Isola J. Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells. *Cancer Lett.* (2010) **294**:211-219.

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

Kriegler, M., Perez C., DeFay K., Albert I., y Lu S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* (1988) **53**:45-53.

Kulbe, H., Hagemann T., Szlosarek P. W., Balkwill F. R., y Wilson J. L. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res.* (2005) **65**:10355-10362.

Kulbe, H., Thompson R., Wilson J. L., Robinson S., Hagemann T., Fatah R., Gould D., Ayhan A., y Balkwill F. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* (2007) **67**:585-592.

Labriola, L., Salatino M., Proietti C. J., Pecci A., Coso O. A., Kornblihtt A. R., Charreau E. H., y Elizalde P. V. Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.* (2003) **23**:1095-1111.

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

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

Lee, C. W., Lin C. C., Lin W. N., Liang K. C., Luo S. F., Wu C. B., Wang S. W., y Yang C. M. TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* (2007) **292**:L799-L812.

Lee, P. P., Hwang J. J., Murphy G., y Ip M. M. Functional significance of MMP-9 in tumor necrosis factor-induced proliferation and branching morphogenesis of mammary epithelial cells. *Endocrinology* (2000) **141**:3764-3773.

Leibovich, S. J., Polverini P. J., Shepard H. M., Wiseman D. M., Shively V., y Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* (1987) **329**:630-632.

Liang, C., Zhang M., y Sun S. C. beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell Signal.* (2006) **18**:1309-1317.

Liao, G., Zhang M., Harhaj E. W., y Sun S. C. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J. Biol. Chem.* (2004) **279**:26243-26250.

Lin, F. S., Lin C. C., Chien C. S., Luo S. F., y Yang C. M. Involvement of p42/p44 MAPK, JNK, and NF-kappaB in IL-1beta-induced ICAM-1 expression in human pulmonary epithelial cells. *J. Cell Physiol* (2005) **202**:464-473.

Liu, Z. G., Hsu H., Goeddel D. V., y Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* (1996) **87**:565-576.

Luo, D., Cheng S. C., Xie H., y Xie Y. Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochem. Cell Biol.* (2000) **78**:119-126.

Luo, J. L., Maeda S., Hsu L. C., Yagita H., y Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* (2004) **6**:297-305.

Macfarlane, R. J. y Gelmon K. A. Lapatinib for breast cancer: a review of the current literature. *Expert. Opin. Drug Saf* (2010) .

Maeda, S., Kamata H., Luo J. L., Leffert H., y Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* (2005) **121**:977-990.

Mahoney, D. J., Cheung H. H., Mrad R. L., Plenchette S., Simard C., Enwere E., Arora V., Mak T. W., LaCasse E. C., Waring J., y Korneluk R. G. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2008) **105**:11778-11783.

Mathiasen, I. S., Hansen C. M., Foghsgaard L., y Jaattela M. Sensitization to TNF-induced apoptosis by 1,25-dihydroxy vitamin D(3) involves up-regulation of the TNF receptor 1 and cathepsin B. *Int. J. Cancer* (2001) **93**:224-231.

Matos, E. L., Loria D. I., y Vilensky M. Cancer mortality and poverty in Argentina: a geographical correlation study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (1994) **3**:213-218.

Matos, E. L., Parkin D. M., Loria D. I., y Vilensky M. Geographical patterns of cancer mortality in Argentina. *Int. J. Epidemiol.* (1990) **19**:860-870.

Matsumoto, G., Namekawa J., Muta M., Nakamura T., Bando H., Tohyama K., Toi M., y Umezawa K. Targeting of nuclear factor kappaB Pathways by dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo. *Clin. Cancer Res.* (2005) **11**:1287-1293.

McFarlane, S. M., Pashmi G., Connell M. C., Littlejohn A. F., Tucker S. J., Vandenabeele P., y MacEwan D. J. Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett.* (2002) **515**:119-126.

Morrison, M. D., Reiley W., Zhang M., y Sun S. C. An atypical tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-binding motif of B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) receptor mediates induction of the noncanonical NF-kappaB signaling pathway. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**:10018-10024.

Mukhopadhyay, A., Suttles J., Stout R. D., y Aggarwal B. B. Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 abrogates ligand-mediated activation of nuclear factor-kappa B and of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**:31906-31912.

National Cancer Institute. http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast. *Website del National Cancer Institute de los EEUU* (2010) .

Naylor, M. S., Malik S. T., Stamp G. W., Jobling T., y Balkwill F. R. In situ detection of tumour necrosis factor in human ovarian cancer specimens. *Eur. J. Cancer* (1990) **26**:1027-1030.

Naylor, M. S., Stamp G. W., Foulkes W. D., Eccles D., y Balkwill F. R. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J. Clin. Invest* (1993) **91**:2194-2206.

O'Brien, N. A., Browne B. C., Chow L., Wang Y., Ginther C., Arboleda J., Duffy M. J., Crown J., O'Donovan N., y Slamon D. J. Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. *Mol. Cancer Ther.* (2010) **9**:1489-1502.

Ozes, O. N., Mayo L. D., Gustin J. A., Pfeffer S. R., Pfeffer L. M., y Donner D. B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* (1999) **401**:82-85.

Park, B. K., Zhang H., Zeng Q., Dai J., Keller E. T., Giordano T., Gu K., Shah V., Pei L., Zarbo R. J., McCauley L., Shi S., Chen S., y Wang C. Y. NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat. Med.* (2007) **13**:62-69.

Pierce, J. W., Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore S. A., Collins T., y Gerritsen M. E. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J. Biol. Chem.* (1997) **272**:21096-21103.

Pikarsky, E., Porat R. M., Stein I., Abramovitch R., Amit S., Kasem S., Gutkovich-Pyest E., Urieli-Shoval S., Galun E., y Ben Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* (2004) **431**:461-466.

Pincheira, R., Castro A. F., Ozes O. N., Idumalla P. S., y Donner D. B. Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *J. Immunol.* (2008) **181**:1288-1298.

Pinckard, J. K., Sheehan K. C., y Schreiber R. D. Ligand-induced formation of p55 and p75 tumor necrosis factor receptor heterocomplexes on intact cells. *J. Biol. Chem.* (1997) **272**:10784-10789.

Pirianov, G. y Colston K. W. Interactions of vitamin D analogue CB1093, TNFalpha and ceramide on breast cancer cell apoptosis. *Mol. Cell Endocrinol.* (2001) **172**:69-78.

Plowman, G. D., Culouscou J. M., Whitney G. S., Green J. M., Carlton G. W., Foy L., Neubauer M. G., y Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (1993) **90**:1746-1750.

Proietti, C., Salatino M., Rosemblit C., Carnevale R., Pecci A., Kornblihtt A. R., Molinolo A. A., Frahm I., Charreau E. H., Schillaci R., y Elizalde P. V. Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.* (2005) **25**:4826-4840.

Qiu, Y., Ravi L., y Kung H. J. Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature* (1998) **393**:83-85.

Ritter, C. A., Perez-Torres M., Rinehart C., Guix M., Dugger T., Engelman J. A., y Arteaga C. L. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin. Cancer Res.* (2007) **13**:4909-4919.

Rivas, M. A., Carnevale R. P., Proietti C. J., Rosemblit C., Beguelin W., Salatino M., Charreau E. H., Frahm I., Sapia S., Brouckaert P., Elizalde P. V., y Schillaci R. TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* (2008) **314**:509-529.

Robles, S. C. y Galanis E. Breast cancer in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud Publica* (2002) **11**:178-185.

Rothe, J., Gehr G., Loetscher H., y Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors--structure and function. *Immunol. Res.* (1992) **11**:81-90.

Rothe, M., Wong S. C., Henzel W. J., y Goeddel D. V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* (1994) **78**:681-692.

Rubio, M. F., Werbajh S., Cafferata E. G., Quaglino A., Colo G. P., Nojek I. M., Kordon E. C., Nahmod V. E., y Costas M. A. TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-

dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B. *Oncogene* (2006) **25**:1367-1377.

Rusnak, D. W., Affleck K., Cockerill S. G., Stubberfield C., Harris R., Page M., Smith K. J., Guntrip S. B., Carter M. C., Shaw R. J., Jowett A., Stables J., Topley P., Wood E. R., Brignola P. S., Kadwell S. H., Reep B. R., Mullin R. J., Alligood K. J., Keith B. R., Crosby R. M., Murray D. M., Knight W. B., Gilmer T. M., y Lackey K. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res.* (2001) **61**:7196-7203.

Salatino, M., Beguelin W., Peters M. G., Carnevale R., Proietti C. J., Galigniana M. D., Vedoy C. G., Schillaci R., Charreau E. H., Sogayar M. C., y Elizalde P. V. Progestin-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation. *Oncogene* (2006) **25**:7723-7739.

Salatino, M., Labriola L., Schillaci R., Charreau E. H., y Elizalde P. V. Mechanisms of cell cycle arrest in response to TGF-beta in progestin-dependent and -independent growth of mammary tumors. *Exp. Cell Res.* (2001) **265**:152-166.

Salatino, M., Schillaci R., Proietti C. J., Carnevale R., Frahm I., Molinolo A. A., Iribarren A., Charreau E. H., y Elizalde P. V. Inhibition of in vivo breast cancer growth by antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor mRNA involves inactivation of ErbBs, PI-3K/Akt and p42/p44 MAPK signaling pathways but not modulation of progesterone receptor activity. *Oncogene* (2004) **23**:5161-5174.

Scott, K. A., Moore R. J., Arnott C. H., East N., Thompson R. G., Scallon B. J., Shealy D. J., y Balkwill F. R. An anti-tumor necrosis factor-alpha antibody inhibits the development of experimental skin tumors. *Mol. Cancer Ther.* (2003) **2**:445-451.

Segatto, O., Lonardo F., Pierce J. H., Bottaro D. P., y di Fiore P. P. The role of autophosphorylation in modulation of erbB-2 transforming function. *New Biol.* (1990) **2**:187-195.

Senftleben, U., Cao Y., Xiao G., Greten F. R., Krahn G., Bonizzi G., Chen Y., Hu Y., Fong A., Sun S. C., y Karin M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* (2001) **293**:1495-1499.

Sheehan, K. C., Pinckard J. K., Arthur C. D., Dehner L. P., Goeddel D. V., y Schreiber R. D. Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *The Journal of Experimental Medicine* (1995) **181**:607-617.

Sicinski, P., Donaher J. L., Parker S. B., Li T., Fazeli A., Gardner H., Haslam S. Z., Bronson R. T., Elledge S. J., y Weinberg R. A. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* (1995) **82**:621-630.

Singh, S., Shi Q., Bailey S. T., Palczewski M. J., Pardee A. B., Iglehart J. D., y Biswas D. K. Nuclear factor-kappaB activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth factor receptor family receptor-positive human breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* (2007) **6**:1973-1982.

Slamon, D. J., Clark G. M., Wong S. G., Levin W. J., Ullrich A., y McGuire W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (1987) **235**:177-182.

Sleijfer, S., Asschert J. G., Timmer-Bosscha H., y Mulder N. H. Enhanced sensitivity to tumor necrosis factor-alpha in doxorubicin-resistant tumor cell lines due to down-regulated c-erbB2. *Int. J. Cancer* (1998) **77**:101-106.

Spriggs, D., Imamura K., Rodriguez C., Horiguchi J., y Kufe D. W. Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (1987) **84**:6563-6566.

Steinberg, M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Ther.* (2007) **29**:2289-2308.

Suganuma, M., Okabe S., Marino M. W., Sakai A., Sueoka E., y Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res.* (1999) **59**:4516-4518.

Tang, G., Minemoto Y., Dibling B., Purcell N. H., Li Z., Karin M., y Lin A. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* (2001) **414**:313-317.

Tanner, M., Kapanen A. I., Junttila T., Raheem O., Grenman S., Elo J., Elenius K., y Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* (2004) **3**:1585-1592.

Tartaglia, L. A., Rothe M., Hu Y. F., y Goeddel D. V. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* (1993) **73**:213-216.

Tzahar, E., Waterman H., Chen X., Levkowitz G., Karunagaran D., Lavi S., Ratzkin B. J., y Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* (1996) **16**:5276-5287.

Varela, L. M. y Ip M. M. Tumor necrosis factor-alpha: a multifunctional regulator of mammary gland development. *Endocrinology* (1996) **137**:4915-4924.

Varela, L. M., Stangle-Castor N. C., Shoemaker S. F., Shea-Eaton W. K., y Ip M. M. TNFalpha induces NFkappaB/p50 in association with the growth and morphogenesis of normal and transformed rat mammary epithelial cells. *J. Cell Physiol* (2001) **188**:120-131.

Vogel, C. L., Cobleigh M. A., Tripathy D., Gutheil J. C., Harris L. N., Fehrenbacher L., Slamon D. J., Murphy M., Novotny W. F., Burchmore M., Shak S., Stewart S. J., y Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* (2002) **20**:719-726.

Wang, C. Y., Mayo M. W., Korneluk R. G., Goeddel D. V., y Baldwin A. S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* (1998) **281**:1680-1683.

Wilken, J. A. y Maihle N. J. Primary trastuzumab resistance: new tricks for an old drug. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2010) **1210**:53-65.

Wolff, A. C., Hammond M. E., Schwartz J. N., Hagerty K. L., Allred D. C., Cote R. J., Dowsett M., Fitzgibbons P. L., Hanna W. M., Langer A., McShane L. M., Paik S., Pegram M. D., Perez E. A., Press M. F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S. E., Tubbs R., Vance G. H., van d., V, Wheeler T. M., y Hayes D. F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* (2007) **25**:118-145.

Wu, S., Boyer C. M., Whitaker R. S., Berchuck A., Wiener J. R., Weinberg J. B., y Bast R. C., Jr. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Res.* (1993) **53**:1939-1944.

Wu, Y. y Zhou B. P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* (2010) **102**:639-644.

Xia, Z. P. y Chen Z. J. TRAF2: a double-edged sword? *Sci. STKE.* (2005) **2005**:e7.

Xiao, G., Cvijic M. E., Fong A., Harhaj E. W., Uhlik M. T., Waterfield M., y Sun S. C. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J.* (2001a) **20**:6805-6815.

Xiao, G., Fong A., y Sun S. C. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* (2004) **279**:30099-30105.

Xiao, G., Harhaj E. W., y Sun S. C. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol. Cell* (2001b) **7**:401-409.

Xu, H., Sethi J. K., y Hotamisligil G. S. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J. Biol. Chem.* (1999) **274**:26287-26295.

Xu, W., Yuan X., Beebe K., Xiang Z., y Neckers L. Loss of Hsp90 association up-regulates Src-dependent ErbB2 activity. *Mol. Cell Biol.* (2007) **27**:220-228.

Yamauchi, T., Yamauchi N., Ueki K., Sugiyama T., Waki H., Miki H., Tobe K., Matsuda S., Tsushima T., Yamamoto T., Fujita T., Taketani Y., Fukayama M., Kimura S., Yazaki Y., Nagai R., y Kadowaki T. Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**:33937-33944.

Yang, J., Lin Y., Guo Z., Cheng J., Huang J., Deng L., Liao W., Chen Z., Liu Z., y Su B. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat. Immunol.* (2001) **2**:620-624.

Yarden, Y. y Sliwkowski M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2001) **2**:127-137.

Yu, Q., Geng Y., y Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* (2001) **411**:1017-1021.

Zhou, B. P., Hu M. C., Miller S. A., Yu Z., Xia W., Lin S. Y., y Hung M. C. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**:8027-8031.