

Tesis Doctoral

# Rol de la ciclooxygenasa-2 en la progresión de tumores de pulmón y mama

Peluffo, Guillermo D.

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

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

Cita tipo APA:

Peluffo, Guillermo D.. (2010). Rol de la ciclooxygenasa-2 en la progresión de tumores de pulmón y mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Peluffo, Guillermo D.. "Rol de la ciclooxygenasa-2 en la progresión de tumores de pulmón y mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**ROL DE LA CICLOOXIGENASA-2 EN LA  
PROGRESIÓN DE TUMORES DE  
PULMÓN Y MAMA**

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

**Guillermo D. Peluffo**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Director de Tesis     | <b>Lic. Slobodanka M. A. Klein</b>  |
| Consejero de Estudios | <b>Dr. Gerardo Glikin</b>   |
| Lugar de trabajo      | <b>Departamento Bioterio y Cáncer Experimental<br/>Área Investigación<br/>Instituto de Oncología Ángel H. Roffo</b> |

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2010

*“Luego reflexionó que la realidad no suele coincidir con las previsiones; con lógica perversa infirió que prever un detalle circunstancial es impedir que éste suceda. Fiel a esa débil magia, inventaba, para que no sucedieran, rasgos atroces; naturalmente, acabó por temer que esos rasgos fueran proféticos.”*

EL milagro secreto, Jorge L. Borges

# ÍNDICE

|  |          |
|--|----------|
| ÍNDICE .....   | i        |
| ABREVIATURAS .....   | 1        |
| <b>PARTE I</b> .....   | <b>2</b> |
| RESUMEN .....  | 3        |
| ABSTRACT .....   | 4        |
| INTRODUCCIÓN .....   | 5        |
| El cáncer de pulmón .....  | 5        |
| El cáncer de mama.....   | 6        |
| Inflamación y cáncer .....   | 7        |
| La ciclooxigenasa-2 .....  | 11       |
| La ciclooxigenasa-2 y el cáncer.....   | 16       |
| OBJETIVOS .....  | 19       |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 20       |
| Drogas .....   | 20       |
| Líneas celulares LP07, LM3 y LMM3 .....  | 20       |
| Experimentos <i>in vivo</i> .....  | 20       |
| Animales.....  | 20       |
| Crecimiento subcutáneo de los tumores.....   | 20       |
| Angiogénesis <i>in vivo</i> .....  | 21       |
| Metástasis experimentales .....  | 21       |
| Producción de retrovirus .....   | 21       |
| Transfecciones transitorias .....  | 22       |
| Ensayos de gen reportero .....   | 22       |
| Viabilidad celular .....   | 22       |
| Determinación de citoquinas y PGE <sub>2</sub> .....   | 23       |
| Migración e invasión .....   | 23       |
| Western Blot.....  | 23       |
| Zimografías y detección de la actividad del uPA .....  | 24       |
| Citometría de flujo .....  | 24       |
| Inmunohistoquímica .....   | 25       |
| Análisis estadístico.....  | 25       |
| RESULTADOS.....  | 26       |
| TUMOR DE PULMÓN LP07 .....   | 26       |
| Reducción de la progresión tumoral y los síndromes paraneoplásicos asociados mediante el uso de inhibidores de la COX-2..... | 26       |
| Reducción de la viabilidad celular y la capacidad invasiva de las células LP07 tratadas con inhibidores de la COX-2.....     | 28       |
| Disminución de la capacidad angiogénica mediante el tratamiento con inhibidores de la COX-2 ...                              | 28       |
| Efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la supervivencia de las células LP07 .....   | 28       |

---

|   |           |
|---|-----------|
| Inhibición de la expresión de COX-2 y reducción de la progresión tumoral .....      | 30        |
| Efecto de la expresión de la COX-2 sobre la supervivencia de las células LP07 ..... | 33        |
| <b>TUMORES DE MAMA LM3 Y LMM3.....</b>  | <b>35</b> |
| Expresión de la COX-2 en las células LM3 y LMM3 .....                               | 35        |
| Efecto antitumoral del celecoxib.....   | 35        |
| Independencia de la COX-2 de los efectos antitumorales del celecoxib.....           | 35        |
| <b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>PARTE II .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>64</b> |
| El carcinoma ductal <i>in situ</i> de mama .....                                    | 64        |
| El estroma tumoral .....  | 64        |
| La COX-2 y el CDIS.....   | 66        |
| <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>68</b> |
| Cultivos celulares .....  | 68        |
| Drogas .....  | 69        |
| Purificación del ARN, retrotranscripción y qPCR.....                                | 69        |
| Ensayos de gen reportero .....  | 69        |
| Zimografías .....   | 69        |
| Invasión y migración .....  | 70        |
| <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>71</b> |
| Interacciones entre el epitelio y el estroma en modelos de cultivos celulares.....  | 71        |
| El factor NF-κB y las interacciones entre epitelio y estroma en el CDIS.....        | 71        |
| Inhibición de la COX-2 y el NF-κB .....   | 73        |
| <b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>79</b> |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>  | <b>83</b> |

---

# ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| AINE             | antiinflamatorio no esteroide (una buena parte de la bibliografía incluye en esta categoría a los inhibidores clásicos de la ciclooxigenasas, como la aspirina, la indometacina, el ibuprofeno, etc., mientras que dejan el celecoxib y demás inhibidores selectivos de la COX-2 fuera de ella; en este trabajo utilizamos la sigla en forma general incluyendo todos los inhibidores de las ciclooxigenasas) |
| AP-1             | proteína activadora 1   |
| AR               | artritis reumática  |
| ARNhc            | ARN horquillado corto ( <i>shRNA</i> , <i>short hairpin RNA</i> en inglés)  |
| CDIS             | carcinoma ductal <i>in situ</i>   |
| COX              | sitio con actividad de ciclooxigenasa de la PGHS  |
| COX-1/-2         | ciclooxigenasa-1 /-2  |
| Cxb              | celecoxib   |
| DMC              | dimetilcelecoxib  |
| EGF              | factor de crecimiento epidérmico  |
| EP               | receptor de prostaglandina E  |
| IL               | interleuquina (IL-1, IL-6)  |
| LPS              | lipopolisacárido  |
| MAPK             | quinasa activada por mitógenos  |
| MMP              | Metaloproteasa (MMP-2, MMP-9, MMP-14)   |
| NF-κB            | factor nuclear del gen de la cadena kappa liviana en linfocitos B   |
| pAkt             | Akt fosforilado   |
| PG               | prostaglandina  |
| PGES             | sintasa de prostaglandina E   |
| PGHS             | sintasa de hidroperóxidos de prostaglandinas  |
| PLA <sub>2</sub> | fosfolipasa A <sub>2</sub>  |
| POX              | sitio con actividad peroxidasa de la  |
| p-p38            | p38 fosforilado   |
| PTGS             | sintasa de endoperóxidos de prostaglandinas, nombre oficial de los genes de las ciclooxigenasas   |
| RASF             | fibroblastos del sinovio de artritis reumática, según sus siglas en inglés  |
| ROS/RNS          | especies reactivas del oxígeno/nitrógeno  |
| SFB              | Suero fetal bovino  |
| TNF-α            | factor de necrosis tumoral alfa   |
| uPA              | activador del plasminógeno tipo uroquinasa  |

# PARTE I

# RESUMEN

## ROL DE LA CICLOOXIGENASA-2 EN LA PROGRESIÓN DE TUMORES DE PULMÓN Y MAMA

Diversos tipos de tumores poseen elevados niveles de expresión de la ciclooxigenasa-2 y de producción de prostaglandinas. El uso de los antiinflamatorios no esteroideos resultó beneficioso en el tratamiento de distintos modelos tumorales, a veces independientemente de la expresión de las ciclooxigenasas, sus blancos primarios. Nuestro objetivo en este trabajo de tesis fue estudiar el papel de la COX-2 en la progresión de distintos modelos tumorales. Utilizamos el adenocarcinoma de pulmón murino LP07 y hallamos que la COX-2 es un componente importante del comportamiento maligno de estas células. En este modelo, la inhibición de la COX-2 redujo el crecimiento del tumor primario y el desarrollo metastásico así como también los síndromes paraneoplásicos provocados por el tumor. La COX-2 y la PGE<sub>2</sub> tienen un papel clave en la modulación de la supervivencia de las células LP07, que ejerce modulando las actividades de las quinasas Akt y p38, así como también la actividad del factor de transcripción NF-κB. En los adenocarcinomas de mama murinos LM3 y LMM3 la importancia de la COX-2 es menos relevante, ya que si bien el uso de un inhibidor selectivo de esta enzima, el celecoxib, produjo esencialmente los mismos resultados que en las células LP07, un análogo carente de actividad inhibitoria se comportó de manera similar. La PGE<sub>2</sub> exógena no revirtió ninguno de los efectos del celecoxib. En estas células, la modulación de la biología tumoral involucró también un aumento de la apoptosis y el arresto del ciclo celular posiblemente mediado por p21 y p27. Finalmente, utilizamos un modelo más complejo, con el cocultivo de células de un carcinoma ductal *in situ* de mama humano y fibroblastos inflamatorios de artritis reumática. Las células del CDIS MCF10DCIS.com no expresan COX-2, la cual es inducida cuando son cocultivadas con los fibroblastos de AR. Encontramos que los fibroblastos inducen la progresión hacia el carcinoma invasivo, en parte modulada por la COX-2, cuya inhibición disminuyó los niveles de la MMP-14 y la actividad de la MMP-9. La inhibición de la COX-2, el NF-κB y la MMP-9 redujo la capacidad invasiva de las células MCF10DCIS.com inducida por las interacciones con los fibroblastos inflamatorios. En conjunto, este trabajo sugiere la utilidad de los inhibidores de la COX-2 para el tratamiento de la progresión tumoral y la participación de esta enzima en la modulación del comportamiento de algunos tumores ya sea mediante su expresión constitutiva o inducida por un microambiente inflamatorio.

Palabras clave: ciclooxigenasa-2, adenocarcinomas de mama, adenocarcinoma de pulmón, antiinflamatorios no esteroideos, supervivencia, Akt, p38, fibroblastos inflamatorios, carcinoma ductal *in situ* de mama, microambiente tumoral

# ABSTRACT

## ROLE OF CYCLOOXYGENASE-2 IN THE PROGRESSION OF TUMORS OF THE LUNG AND THE MAMMARY GLAND

COX-2 expression is increased in a number of tumors along with elevated PG production. NSAID treatment was found to have antitumor properties in different types of cancers, although the dependency of COX-2 inhibition remains controversial, in spite of being their primary target. We aimed to study the role of COX-2 in tumor progression using different cancer models. We found that COX-2 is a key player for the malignant behavior of the LP07 murine lung adenocarcinoma. COX-2 inhibition delayed not only tumor growth but also the metastatic outcome and the development of paraneoplastic syndromes. COX-2 and PGE<sub>2</sub> were found to have an important role for LP07 cell survival by modulating the Akt and p38 kinase activities and the transcription factor NF-κB. The relevance of COX-2 activity in the murine mammary adenocarcinomas LM3 and LMM3 was somewhat less important. The COX-2 specific inhibitor celecoxib renders nearly the same outcome in these cells than in LP07 cells. However the closely related analogue dimethyl-celecoxib, devoid of COX-2 inhibitory activity, was found to be equally effective. Moreover, exogenously added PGE<sub>2</sub> did not revert the effect of celecoxib. The antitumor properties also involved an increased apoptosis and the cell cycle arrest possibly modulated by p21 and p27. Finally, we studied the role of COX-2 in mediating the interaction between breast cancer epithelial cells and inflammatory fibroblasts leading to the transition between DCIS and invasive carcinoma. The MCF10DCIS.com cells express COX-2 upon coculture with rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. We found that RASF-induced progression to invasive carcinoma involved in part the induction of COX-2 expression, and that MMP-14 levels and MMP-9 activity were reduced by COX-2 inhibition. The increased invasiveness of MCF10DCIS.com cells acquired through the interaction with the inflammatory fibroblasts were lowered by COX-2, MMP-9 or NF-κB inhibition. Taken together, these results suggest COX-2 inhibitors are useful antitumor drugs and the key role for COX-2 in modulating the behavior of some tumors by being either constitutively expressed or induced by an inflammatory stroma.

Keywords: cyclooxygenase-2, mammary adenocarcinomas, lung adenocarcinoma, non-steroidal anti-inflammatory drugs, survival, Akt, p38, inflammatory fibroblasts, ductal carcinoma *in situ* of the breast, tumor microenvironment

# INTRODUCCIÓN

## El cáncer de pulmón

A pesar de los avances en la terapia del cáncer de pulmón, sólo un 15% de los pacientes tienen una supervivencia mayor de cinco años luego del diagnóstico<sup>1</sup>. El hábito tabáquico es un factor de riesgo predominante para el desarrollo de cáncer de pulmón, con un riesgo relativo de 10-30 en comparación con individuos no fumadores. Está directamente asociado al cáncer de pulmón en el 90% de las mujeres y el 79% de los hombres<sup>2</sup>. Los fumadores pasivos, ahora llamados fumadores ambientales o de segunda mano, también tienen un riesgo incrementado<sup>3</sup>. Dado que el número de fumadores es todavía considerable<sup>4</sup>, no se prevé un descenso importante de su incidencia durante varios años. En Argentina, la tasa anual de mortalidad por cáncer de pulmón en el periodo 1990-2005 fue de 31,9 hombres y 7,5 mujeres por cada 100.000 habitantes<sup>5</sup>. El factor de riesgo ocupacional más común es la exposición al asbesto<sup>3</sup>. Otras enfermedades pulmonares preexistentes, como la enfermedad obstructiva pulmonar crónica, la fibrosis pulmonar idiopática y la tuberculosis se asocian a un incremento del riesgo de padecer cáncer de pulmón.

Existen dos tipos principales de cáncer de pulmón: microcítico (14%) y no microcítico (85%). A pesar de los avances en la detección precoz y en el tratamiento, el carcinoma de pulmón no microcítico es frecuentemente diagnosticado en estadios avanzados y tiene un pronóstico malo. El cáncer de pulmón no microcítico puede ser dividido en tres tipos histológicos principales: carcinoma epidermoide (que incluye al de células escamosas), adenocarcinoma (incluyendo al bronquioloalveolar) y cáncer de pulmón de células grandes. El hábito tabáquico puede ser el agente etiológico de todos los tipos de cáncer pulmonar, pero está ligado principalmente al carcinoma microcítico y al carcinoma escamoso. El adenocarcinoma es el tipo más común en pacientes que nunca han fumado.

Los tumores de pulmón se presentan, a veces, con síntomas y signos que no están relacionados con un efecto físico del tumor primario o sus metástasis, y que por tal, son llamados síndromes paraneoplásicos<sup>6</sup>. En ocasiones, la existencia de estos síndromes se detecta antes que la presencia del tumor que los origina, y por lo tanto contribuyen a su diagnóstico. La caquexia es uno de esos síndromes paraneoplásicos y se caracteriza por un marcado descenso de peso, anorexia, astenia, y anemia. Es el resultado de una respuesta inflamatoria sistémica que tiene entre sus mediadores moleculares y factores catabólicos a las citoquinas proinflamatorias interleuquina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina-6 (IL-6)<sup>7,8</sup>.

Los tumores de pulmón clínicamente detectables tienen múltiples alteraciones tanto genéticas como epigenéticas (más de 20 por tumor)<sup>9,10</sup>. Un cierto número de factores de

crecimiento y sus receptores se expresan anormalmente en los tumores de pulmón, ya sea en las propias células tumorales o en las estromales adyacentes, y producen, de manera autócrina o parácrina, señales que estimulan el crecimiento celular, y son por lo tanto, sistemas autónomos. Varios de estos factores son codificados por protooncogenes que se activan durante el desarrollo de la neoplasia pulmonar<sup>11</sup>. La familia de ErbB comprende un grupo de receptores transmembranarios con actividad de quinasa de tirosinas, que junto con sus ligandos constituye uno de estos potenciales sistemas de regulación autónomos, en particular para el cáncer de pulmón no microcítico. Dos miembros de esta familia son importantes en el cáncer de pulmón: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1) y el receptor HER2/neu (ErbB2), que se expresan independientemente uno de otro en el cáncer de pulmón no microcítico<sup>12</sup>. Luego de la unión de su ligando, los receptores ErbB homodimerizan o heterodimerizan, e inducen la actividad de quinasa intrínseca que inicia la cascada de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). El EGFR regula la proliferación epitelial y la diferenciación. El HER2/neu se expresa de manera aumentada en el 30% de los tumores no microcíticos<sup>9</sup>, especialmente en los adenocarcinomas. Los altos niveles de expresión de HER2/neu se asocian con el fenotipo de resistencia múltiple a las drogas quimioterapéuticas y a un potencial metastásico mayor en el cáncer no microcítico<sup>9,13</sup>.

Otras mutaciones comunes en el carcinoma no microcítico, pero prácticamente indetectables en el microcítico, se encontraron en el protooncogén RAS (10-15% de los tumores), especialmente en los adenocarcinomas (20-30%)<sup>10</sup>. La familia RAS codifica una proteína G asociada a la membrana plasmática que regula vías de señalización de diferenciación, proliferación y supervivencia. El 90% de las mutaciones halladas en este oncogén, en cáncer de pulmón, se dan en la variante *KRAS*.

En cuanto a los genes supresores de tumor, las mutaciones en *p53* son las más comunes en el cáncer de pulmón (80% de los tumores microcíticos, 50% de los no microcíticos)<sup>14</sup>. La proteína p53 se estabiliza en respuesta a estímulos como la activación de oncogenes, la hipoxia o el daño al ADN. Su actividad como factor de transcripción es necesaria para la expresión de genes involucrados en el arresto del ciclo celular, con el fin de permitir la reparación del daño al ADN o el inicio de la apoptosis.

## El cáncer de mama

A nivel mundial, el cáncer de mama es una de las principales causas de muerte debidas a neoplasias malignas en mujeres<sup>15</sup>. A pesar de haberse realizado grandes avances en el diagnóstico y el tratamiento, todavía existen problemas de índole clínica y científica por resolver. Estos están relacionados con la detección de potenciales pacientes susceptibles de tratamientos preventivos, la determinación de las causas de la progresión y la recurrencia, la selección del tratamiento adecuado y la prevención de la resistencia a la

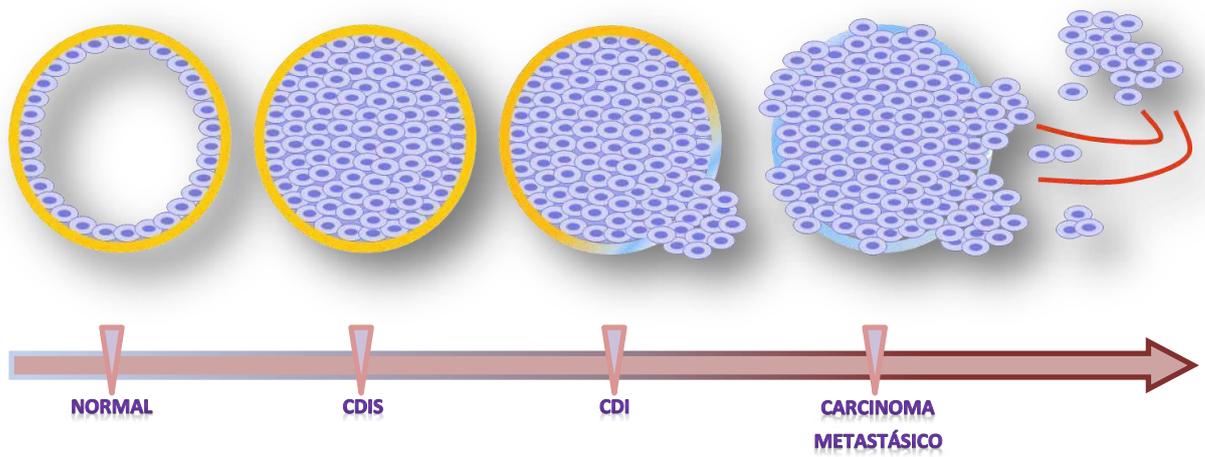
terapia. Cada uno de estos problemas es difícil de resolver por el hecho de que el cáncer de mama no es una enfermedad única sino heterogénea tanto a nivel molecular como clínico<sup>16,17</sup>. El estudio de la expresión génica de un gran número de tumores por diversos grupos de investigación y de manera independiente, permitió la clasificación del cáncer de mama en cinco subtipos diferentes a nivel molecular: 1) de tipo basal, 2) luminal A, 3) luminal B, 4) positivo para HER2 pero negativo para el receptor de estrógeno y 5) tipo mama normal<sup>16</sup>. Estos subtipos son evidentes en etapas tempranas de la carcinogénesis mamaria, lo que sugiere distintas vías para la progresión de cada uno de ellos.

La historia natural del cáncer de mama involucra la progresión a través de etapas definidas tanto clínica como patológicamente. El modelo lineal de la carcinogénesis mamaria comienza con la hiperproliferación ductal, evolución hacia carcinoma *in situ* (DCIS), carcinoma invasivo y finalmente metastásico<sup>18</sup> (Fig. 1). Uno de los eventos críticos y menos comprendidos en la progresión del cáncer de mama es la transición entre el DCIS y el invasivo y la diseminación metastásica. Hasta ahora no se encontraron evidencias de componentes genéticos subyacentes en dicha transición, lo que sugiere modificaciones epigenéticas y/o factores paracrinos aportados por el estroma.

Se desconoce la etiología exacta del cáncer de mama, pero la historia familiar es un factor de riesgo muy importante, que implica factores hereditarios. Se conocen mutaciones germinales que incrementan la susceptibilidad en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53* (p53)<sup>19, 20</sup>, pero sólo dan cuenta de un porcentaje menor de casos. Es amplio el número de diferentes mutaciones encontradas en distintos genes de tumores de mama, pero excepto para los casos de las vías de la PI3K/Akt/PTEN, p53 y el NF- $\kappa$ B, la frecuencia de cada una de ellas es muy baja<sup>21</sup>.

## Inflamación y cáncer

La inflamación es la principal reacción de la inmunidad innata para defender al organismo frente a los patógenos. Además de las infecciones bacterianas y virales, las injurias físicas como la radiación UV y las químicas como las producidas por las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), pueden inducir la inflamación de los tejidos<sup>22</sup>. Tales estímulos activan señales intracelulares que regulan la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina-6 (IL-6), junto con quimioquinas y moléculas de adhesión celular, para promover el reclutamiento y la activación de células del sistema inmune<sup>22</sup>. Los procesos de inflamación aguda son normalmente autolimitantes, dado que la producción de citoquinas proinflamatorias promueve la liberación de otras citoquinas antiinflamatorias a medida que la causa de la inflamación desaparece. Si el estímulo causante de la reacción no es eliminado o falla su autolimitación, la inflamación se transforma en crónica<sup>23</sup>. Diversas enfermedades están asociadas a la persistencia de la



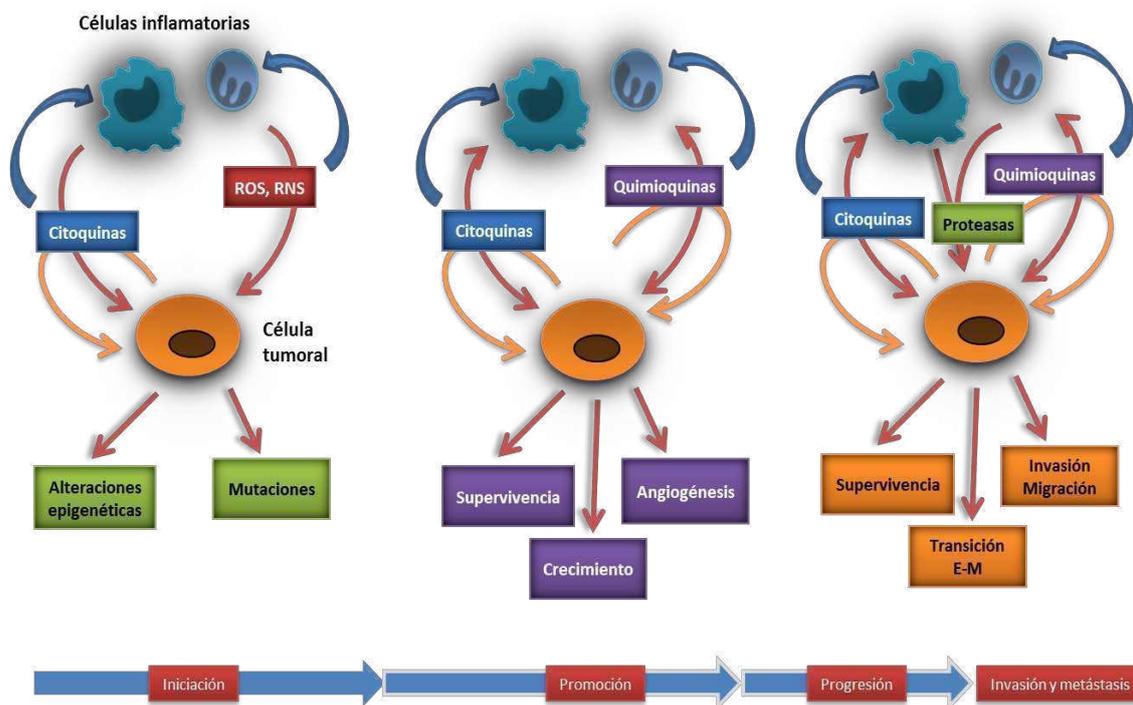
**Fig. 1.** Modelo de carcinogénesis mamaria. CDIS: carcinoma ductal in situ; CDI: carcinoma ductal invasivo.

respuesta inflamatoria, entre ellas el cáncer<sup>24-28</sup>. La inflamación crónica se caracteriza por un daño tisular sostenido, proliferación celular inducida por ese daño, y reparación tisular. En este contexto, la proliferación celular correlaciona con la metaplasia, un cambio reversible del tipo celular<sup>29, 30</sup>, al que sucede cronológicamente la displasia, un desorden de la proliferación celular que lleva a la producción de células atípicas. Las displasias son el estadio previo al carcinoma, dado que normalmente se encuentran adyacentes a éstos<sup>31</sup>.

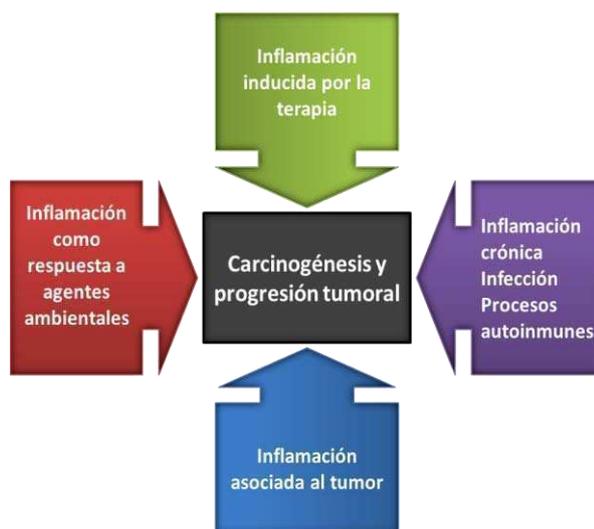
Las primeras evidencias de la conexión entre la inflamación crónica y el cáncer datan de 1863 con las observaciones de Rudolf Virchow acerca de la ocurrencia frecuente de tumores en sitios de irritación crónica<sup>32</sup>. Sin embargo, el estudio de esta relación no fue retomado hasta hace unas décadas, con el hallazgo de asociaciones estrechas entre la incidencia de distintos tumores y la inflamación subyacente<sup>33-35</sup>. Por ejemplo, el desarrollo de carcinomas de estómago, hígado, próstata y páncreas se ha vinculado a la inflamación inducida por la presencia de *Helicobacter pylori*, la hepatitis crónica, la atrofia inflamatoria de la próstata y la pancreatitis crónica, respectivamente<sup>30, 36, 37</sup>. Los pacientes que sufren de desórdenes inflamatorios del colon, como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer de colon<sup>31</sup>, mientras que el tratamiento de la colitis con drogas antiinflamatorias reduce ese riesgo<sup>38</sup>.

Distintas hipótesis no excluyentes indican que la inflamación podría modular diferentes etapas de la progresión tumoral<sup>39</sup>. Diferentes células de la inmunidad innata (mastocitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, etc.) son reclutados a los sitios de infección e inflamación. En respuesta a los estímulos proinflamatorios, estas células activadas generan ROS y RNS, que pueden iniciar el proceso de la carcinogénesis promoviendo el daño del ADN y aumentando, de esta manera, la tasa de mutaciones<sup>40</sup> (Fig. 2). La exposición a radicales libres puede modificar proteínas de manera postraducciona l y alterar la funcionalidad de los productos proteicos de genes supresores de tumor como *p53* y *Rb*<sup>41, 42</sup>. Dado que se requieren de más eventos genéticos y epigenéticos que una única mutación para convertir células iniciadas en células transformadas malignamente, en la etapa de la promoción tumoral, estos mismos mecanismos continúan estimulando el proceso de la carcinogénesis (Fig. 2). Pero además, la inflamación contribuye con la producción de factores de crecimiento, como el epidérmico (EGF) y el fibroblástico (FGF), que provocan un desbalance entre señales proliferativas y de muerte celular, debido a la activación de vías de supervivencia<sup>33, 43</sup>. Las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) activan tales vías de supervivencia, favoreciendo la evasión de la muerte celular<sup>44-46</sup>.

El microambiente tumoral está caracterizado por la infiltración de diferentes tipos de células del sistema inmune (células dendríticas, linfocitos, macrófagos, etc.) responsables de la liberación de citoquinas y otros factores que cumplen un papel favorecedor de la progresión tumoral, por ejemplo, estimulando la angiogénesis o la ruptura de la



**Fig. 2.** La inflamación actúa en distintas etapas de la carcinogénesis. Contribuye a la iniciación tumoral induciendo el daño al ADN a través de intermediarios como las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (ROS/RNS) y por activación de mecanismos epigenéticos con el silenciamiento de genes supresores de tumor. Durante la promoción tumoral, las células inflamatorias producen citoquinas y citoquinas que favorecen el crecimiento tumoral, la supervivencia celular y la capacidad angiogénica. Las citoquinas producidas por las células inflamatorias o tumorales, reclutan nuevas células del sistema inmune hacia el microambiente tumoral. En las etapas de progresión y metastásica, las células inflamatorias contribuyen a la degradación de la matriz extracelular con la liberación de enzimas proteolíticas. Las citoquinas y quimioquinas favorecen la transición epitelio-mesenquémica de las células tumorales. En todo momento, las células tumorales pueden contribuir a crear el microambiente inflamatorio mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas, que a su vez pueden actuar de manera autócrina.



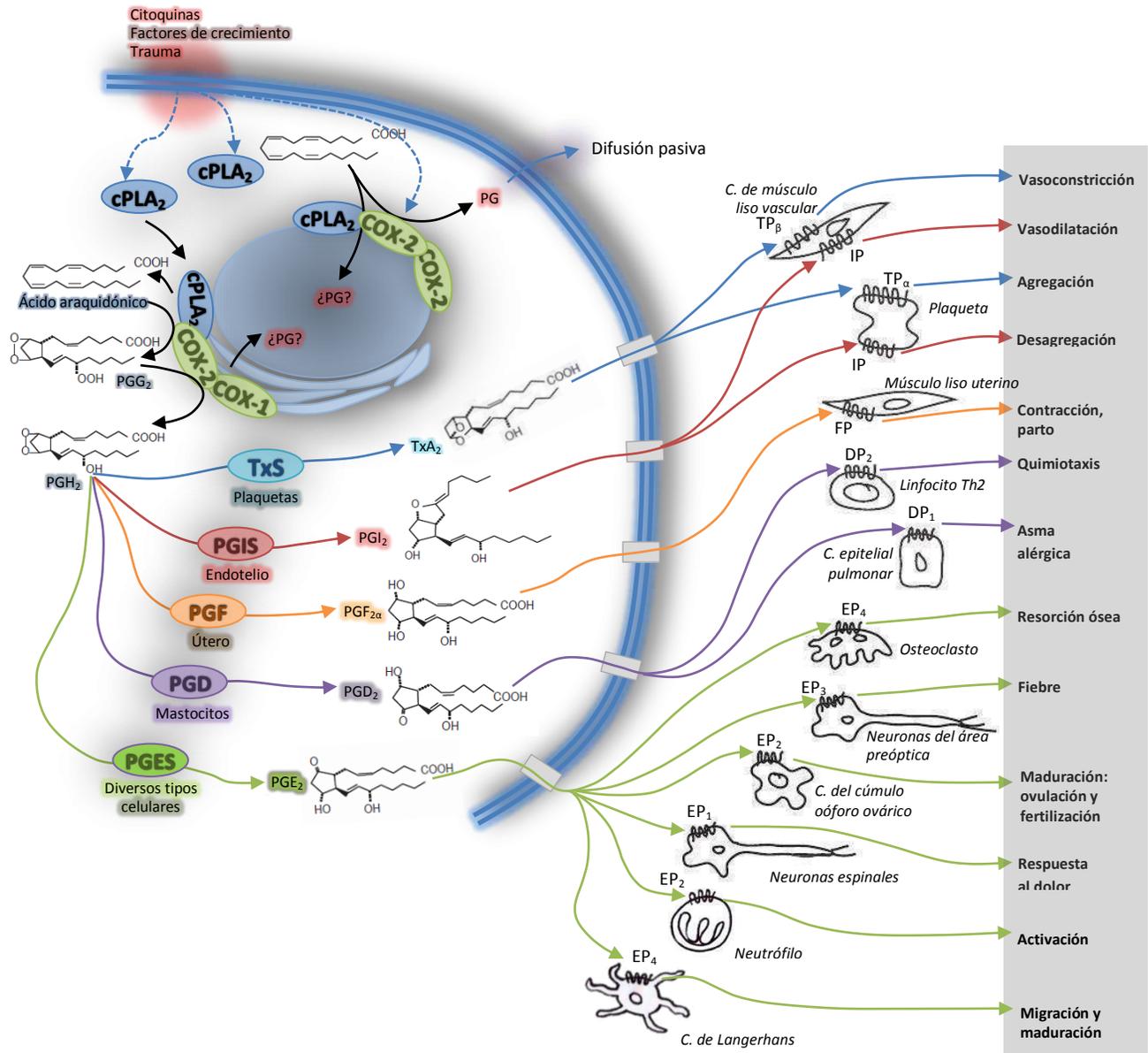
**Fig. 3.** La inflamación que contribuye al desarrollo y la progresión neoplásica tiene distintos orígenes. Puede provenir por la persistencia de estados inflamatorios preexistentes debido a la no resolución de infecciones y a procesos autoinmunes. Asimismo, la inflamación puede deberse a la exposición crónica a agentes ambientales (por ej. el asbesto) o ser inducida por la terapia debido por ej. a la producción de una abundante necrosis. Por último, el tumor puede reclutar células del sistema inmune para crear un microambiente inflamatorio y secretar mediadores como citoquinas y quimioquinas para condicionarlo.

membrana basal y la invasión de los tejidos circundantes<sup>33</sup>. El hecho de la existencia de un microambiente inflamatorio en tumores que no están epidemiológicamente relacionados con la inflamación como agente etiológico, sugiere que puede haber eventos genéticos causales de la neoplasia que son responsables de la construcción de tal medio inflamatorio<sup>47</sup> (Fig. 3). Existen diversas vías de señalización presentes en los tumores entre los potenciales candidatos, como las del factor inducible por hipoxia (HIF)<sup>24, 48</sup>, la del factor de transcripción NF-κB<sup>49-51</sup>, y otras a partir de oncogenes como Ras<sup>52-55</sup>. Además de esta adecuación de un microambiente inflamatorio que fomenta la progresión tumoral, las células tumorales pueden cooptar moléculas típicamente inflamatorias para incrementar su proliferación, evadir la apoptosis, migrar e invadir (Fig. 3). Entre estas moléculas se encuentran citoquinas, quimioquinas y las prostaglandinas<sup>33, 56-60</sup>.

## La ciclooxigenasa-2

Las sintetas de endoperóxidos de prostaglandinas (PTGS), de hidroperóxido de prostaglandina (PGHS), o más comúnmente ciclooxigenasas (COX) son enzimas que catalizan la síntesis de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico. El producto de las ciclooxigenasas se detectó por primera vez en el líquido seminal humano y debido a que se pensó que era originado por la próstata, se las denominó prostaglandinas<sup>61</sup>. El primer paso de la síntesis de las PG es la hidrólisis de los fosfolípidos para liberar ácido araquidónico, reacción que es catalizada por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Luego, la actividad ciclooxigenasa (o bis-dioxigenasa, COX) de la PGHS cataliza la reacción del oxígeno molecular con el ácido araquidónico para formar un intermediario inestable, la PGG<sub>2</sub>, que es rápidamente convertida a PGH<sub>2</sub> por la actividad peroxidasa (POX) de la misma enzima<sup>61</sup> (Fig. 4). Diversas isomerasas específicas convierten la PGH<sub>2</sub> en las distintas PG bioactivas y en tromboxano A<sub>2</sub><sup>62-64</sup>. Existen dos isoformas ampliamente caracterizadas de la PGHS, COX-1 y COX-2. Ambas isoformas están localizadas en la superficie luminal del retículo endoplasmático y en la membrana nuclear, tanto interna como externa<sup>65</sup>.

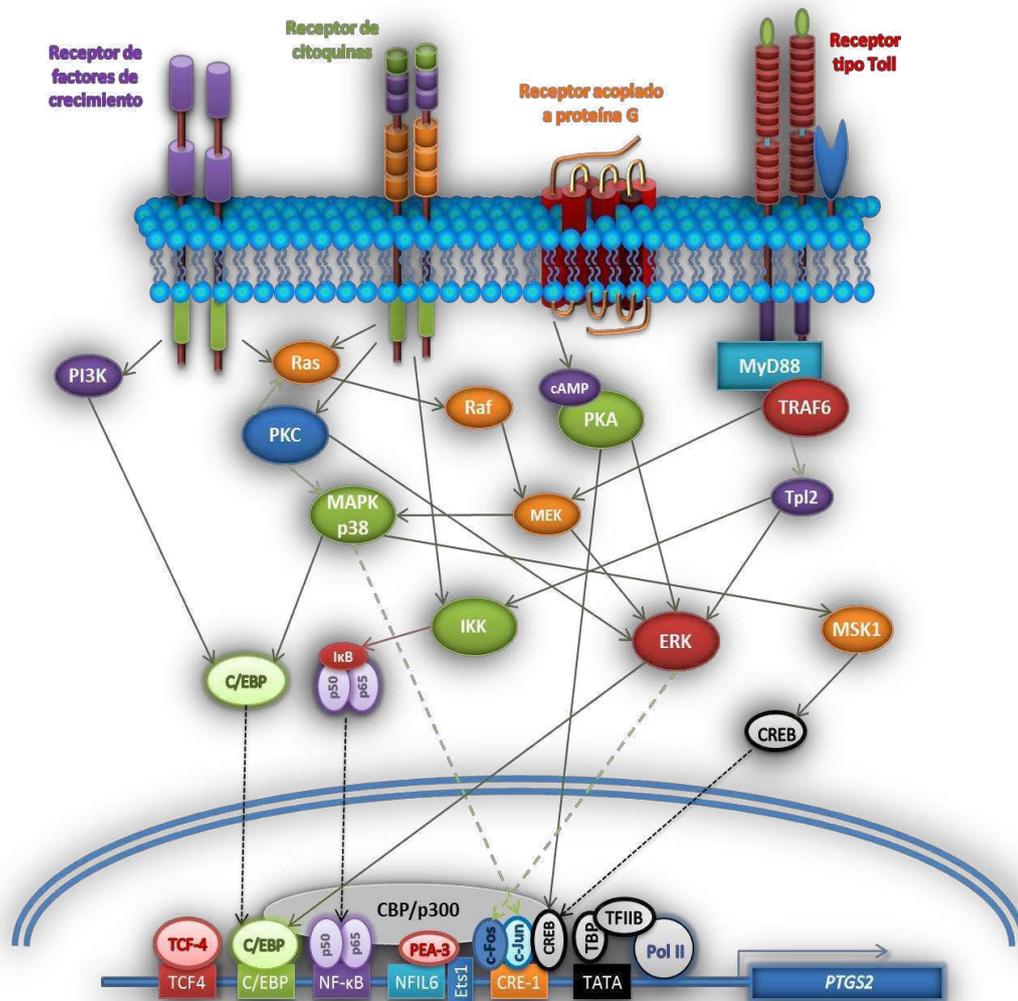
La estructura cristalográfica de ambas enzimas, ya sean humanas o murinas, es muy similar<sup>66, 67</sup>. Luego del péptido señal, el extremo amino terminal de la proteína contiene un módulo único similar al del factor de crecimiento epidérmico (EGF), con uniones disulfuro conservadas, que funciona como un dominio de dimerización. A continuación se disponen una serie de cuatro hélices anfipáticas que anclan la enzima a una de las capas de la membrana fosfolipídica. La forma de inserción en la membrana es típica de la COX-2. Lo que resta de la proteína hacia el extremo carboxilo terminal es el dominio catalítico, que contiene dos sitios activos diferentes, para las actividades de ciclooxigenasa y de peroxidasa, funcionalmente interconectados. El dominio catalítico contiene hélices alfa conservadas entre las distintas especies, y un motivo que une al grupo hemo, de manera similar a otras peroxidasas<sup>67</sup>. La entrada al sitio con actividad



**Fig. 4.** Síntesis y efectos de las prostaglandinas. Una célula genérica se activa por trauma mecánico, citoquinas, factores de crecimiento u otros estímulos inflamatorios. En tales condiciones aumenta la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que libera al ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana. Las ciclooxigenasas convierten este ácido araquidónico libre en prostaglandina H<sub>2</sub>. De manera dependiente del tipo celular, distintas enzimas metabolizan la PGH<sub>2</sub> para producir PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> y el tromboxano A<sub>2</sub>. Estos prostanoides pueden abandonar la célula por medio de transportadores y presumiblemente por difusión. Los prostanoides ejercen sus funciones de manera autócrina o paracrina a través de sus receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub>, DP<sub>1</sub>, DP<sub>2</sub>, FP, IP, TP<sub>α</sub> y TP<sub>β</sub>. En el gráfico se muestran sólo algunos de los muchos efectos de los prostanoides. Las prostaglandinas, además, podrían ejercer efectos intracrinicos dentro del núcleo Adaptado de la referencia 88..

COX se abre en la base del dominio de unión a la membrana y se prolonga como un largo canal de aminoácidos mayormente hidrófobos<sup>68</sup>, que se interna profundamente dentro del dominio catalítico<sup>67</sup>, estrechándose en la interfaz entre ambos dominios y limitando el acceso al sitio activo. Este sitio COX acepta el ácido araquidónico que se libera de la membrana. Las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINE) inhiben competitivamente el sitio de la actividad de COX, con excepción de la aspirina, que la modifica covalentemente. Aunque los sitios con actividad de ciclooxigenasa de la COX-1 y la COX-2 son estructuralmente similares (85% de homología en contraste con el 65% para la proteína total), difieren en cuanto a su tamaño, más grande en la COX-2, que posee un bolsillo lateral sobre el estrechamiento mencionado. Este bolsillo está bordeado por una valina (V523) y posee una arginina (R513) en su base, en lugar de los más voluminosos histidina 513 (H513) e isoleucina 523 (I523) en la COX-1<sup>69</sup>. La existencia de este bolsillo lateral permite la recepción de moléculas inhibitorias con una estructura más grande. Una tercera sustitución, de una isoleucina (I434) de la COX-1 por una valina (V434)<sup>70</sup> en el canal central, distal al sitio COX, contribuye aún más a este incremento espacial. Esta diferencia de tamaño permitió el desarrollo de inhibidores selectivos de la COX-2<sup>71</sup>. Contrariamente al sitio COX, la actividad de peroxidasa está ubicada del lado opuesto a la membrana, en la superficie de la enzima y contiene al grupo hemo en su base.

En general, la COX-1 se expresa constitutivamente, mientras que la expresión de COX-2 es inducible en diferentes tipos de células<sup>72</sup> y no es detectable en la mayoría de los tejidos en condiciones basales. Independientemente de la especie animal, el promotor del gen de la COX-2 contiene una caja TATA canónica y varios elementos regulatorios de la transcripción, que responden a los factores NF- $\kappa$ B, NF-IL6/C/EBP, PEA3, NFAT y AP-1<sup>73</sup> (Fig. 5). Desde una perspectiva histórica, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas fue el primer inductor identificado de la expresión de COX-2 en macrófagos<sup>74</sup>. Actualmente se conoce que muchos mediadores proinflamatorios inducen su expresión. Específicamente, el LPS y otros ligandos de receptores tipo Toll (TLR) se unen a receptores asociados a MyD88 e inducen al factor de transcripción AP-1 mediado por la vía MEK/ERK. AP-1 se une al sitio CRE en el promotor de COX-2<sup>75</sup> (Fig. 5). El LPS también activa la vía TRAF6/NIK/Tpl2/IKK/NF- $\kappa$ B, que induce la transcripción de la COX-2. La señal de Tpl2 activa la ERK1/2, que hace lo propio con MSK1, con la fosforilación consiguiente de CREB, un regulador fundamental de la transcripción de COX-2<sup>76</sup>. El LPS activa C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  por medio de la MAPK p38 y la ERK1/2. Tanto C/EBP $\beta$  como CREB actúan principalmente durante la activación inicial de la transcripción de COX-2, mientras que C/EBP $\delta$  mantiene la transcripción ya inducida<sup>77</sup>. La maquinaria de transcripción en el promotor de COX-2 requiere de la presencia del coactivador p300, que se une a CREB, AP-1, C/EBP y NF- $\kappa$ B para controlar el inicio de la transcripción<sup>78</sup> (Fig. 5). Diversas citoquinas proinflamatorias como la IL-1 o el interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) inducen también la expresión de COX-2. La vía de señalización involucrada es la del AMPc y la PKA, con la



**Fig. 5.** Vías de señalización que llevan a la expresión del gen de la COX-2 (*PTGS2*), a partir de los estímulos provenientes del extracelular que actúan sobre los receptores de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1), factores de crecimiento (EGF), receptores acoplados a proteínas G, y receptores tipo Toll (LPS bacteriano).

activación de CREB. Mientras que la activación de la transcripción de COX-2 por el TNF- $\alpha$  depende de la activación de la ERK1/2 y el NF- $\kappa$ B, la IL-1 y el IFN- $\gamma$  requieren de la MAPK p38<sup>79, 80</sup>.

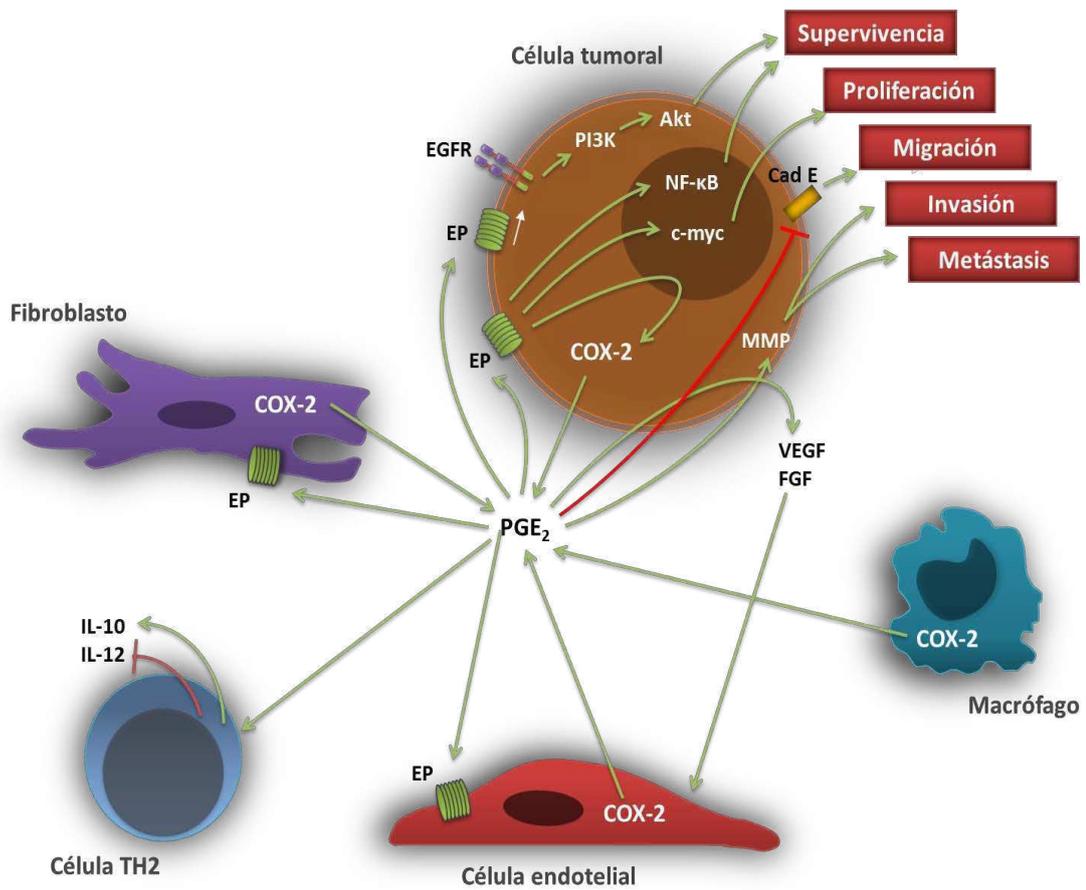
Los metabolitos de la COX se liberan en altas concentraciones localmente en los sitios de inflamación o de manera sistémica luego de una infección. Este incremento se debe a un aumento en la expresión de la COX-2<sup>81, 82</sup>. La exposición de distintos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales y monocitos a endotoxinas bacterianas, citoquinas, hormonas o factores de crecimiento induce la expresión de COX-2 luego de 2-6 h. Los glucocorticoides, por el contrario, son supresores de la síntesis de COX-2 a nivel transcripcional y postranscripcional<sup>83</sup>. El óxido nítrico, que exhibe una alta afinidad por enzimas que contienen hierro, es un modulador directo de la actividad enzimática de la COX-2, que posee un grupo hemo en el dominio catalítico<sup>84</sup>. La COX-2 es aproximadamente diez veces más sensible a la activación por peróxido de hidrógeno comparada con la COX-1, por lo cual, bajos niveles de peróxido pueden inducir la actividad de la COX-2 sin alterar la de COX-1<sup>85</sup>.

La PGH<sub>2</sub> no tiene un papel significativo propio como mediador de la inflamación, sino que sirve como sustrato para la formación de productos más estables, las distintas formas isoméricas de los prostanoideos (PGD<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2 $\alpha$</sub> , prostaciclina I<sub>2</sub> y tromboxano A<sub>2</sub>) que participan en numerosos procesos fisiológicos y patofisiológicos, como en la piresis, la algia, la inflamación, la trombosis, el parto, la ovulación, la función renal, la vasoconstricción y la vasodilatación (Fig. 4). Las distintas enzimas que catalizan la formación de estos mediadores, que en general son productos finales activos, son llamadas, por esta razón, sintasas terminales. Los distintos isómeros actúan a través de receptores acoplados a proteína G<sup>86, 87</sup>, de los cuales existe más de uno para una determinada isoforma (tal es el caso para la PGE<sub>2</sub>). Las PG, que no se acumulan dentro de las células, tienen una semivida corta *in vivo* (segundos a minutos), y por lo tanto actúan de manera autócrina o paracrina principalmente. El prostanoide más abundante en humanos es la PGE<sub>2</sub>. Dependiendo del contexto, la PGE<sub>2</sub> tiene efectos homeostáticos<sup>88</sup>, inflamatorios<sup>89, 90</sup>, y en algunos casos antiinflamatorios<sup>91</sup>. Existe evidencia que sugiere que las dos COX y las distintas sintasas de PG están funcionalmente acopladas de manera preferencial. En el caso de la PGE<sub>2</sub>, existen tres proteínas encargadas de su síntesis: dos de ellas están asociadas a las membranas, mPGES-1 y mPGES-2, mientras que la tercera, cPGES, es citosólica. La COX-2 y la mPGES-1 son inducidas por IL-1 $\beta$ , es decir que son reguladas de manera conjunta y que la síntesis de PGE<sub>2</sub> depende del aumento en la expresión de ambas enzimas<sup>92, 93</sup>. Tanto la COX-2 como la mPGES-1 colocalizan en la membrana perinuclear, lo que favorece su acoplamiento funcional<sup>94</sup>.

## La ciclooxigenasa-2 y el cáncer

Existen numerosas evidencias acumuladas a partir de estudios poblacionales, de casos y controles y de ensayos clínicos que indican que el uso regular de los AINE en periodos de 10-15 años reduce entre 40 y 50% el riesgo relativo de desarrollar cáncer colorrectal<sup>95</sup>. Confirmando esos estudios, el uso de los AINE promovió la regresión de adenomas preexistentes en pacientes que padecen de poliposis adenomatosa familiar<sup>96</sup>. Dado que el blanco primario de los AINE son las ciclooxigenasas, resultó inmediata la hipótesis de que su inhibición sería beneficiosa para el tratamiento de este tipo de cáncer. Muchos otros tipos de tumores, además del colorrectal, incluyendo los de pulmón y mama, poseen elevados niveles de expresión de COX-2 y de producción de PG<sup>97-105</sup>. Además de factores intrínsecos como mutaciones de los protooncogenes *Wnt* y *Ras*<sup>106</sup>, con la consiguiente alteración de sus vías de señalización, existen otros precedentes del microambiente tumoral que pueden aumentar la expresión de COX-2, entre ellos la hipoxia y los estímulos inflamatorios<sup>107, 108</sup>. Diversos estudios en modelos animales han documentado el papel de la COX-2 en la carcinogénesis. Por ejemplo, en un modelo de poliposis intestinal, la expresión de COX-2 correlaciona con la delección de APC, un gen supresor de tumores crítico durante la carcinogénesis<sup>109</sup> y en modelos de cáncer de colon y mama se encontró que la COX-2 induce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2<sup>110, 111</sup> (Fig. 6). En otro trabajo, ratones hembras transgénicos con la expresión de COX-2 incrementada en las glándulas mamarias, desarrollaron hiperplasia focal, displasia y posterior transformación en tumores metastásicos<sup>112</sup>. Otra asociación causal provino nuevamente de ratones transgénicos, con expresión aumentada de COX-2 en queratinocitos basales, que desarrollaron hiperplasia y luego displasia epidérmica<sup>113</sup>. Consistentemente con estos datos, se encontró una marcada reducción en el desarrollo de tumores intestinales y papilomas epidérmicos en ratones COX-2<sup>-/-</sup><sup>114</sup>. La correlación existente entre el desarrollo tumoral y la expresión de COX-2 revelaría su potencial como blanco de terapias quimiopreventivas, apoyado por la reducción en la formación de distintos tumores, en modelos animales, mediante el tratamiento con inhibidores selectivos de la COX-2<sup>115-118</sup>.

La PGE<sub>2</sub> es el prostanoide más abundante detectado en la mayoría de los carcinomas. Según distintos trabajos, en diferentes modelos, la PGE<sub>2</sub> promueve la supervivencia, estimula la proliferación celular y la motilidad, induce la angiogénesis y suprime la respuesta inmune antitumoral<sup>119-126</sup>. La PGE<sub>2</sub> actúa predominantemente a través de la activación de sus receptores EP, ubicados en la membrana plasmática. Estos receptores han sido asociados al desarrollo y crecimiento de diversos tumores. La estimulación de los receptores EP2 y EP4 activa la transcripción de la ciclina D1 y *c-myc* mediada por el complejo TCF-catenina  $\beta$ <sup>127</sup> (Fig. 6). La unión de la PGE<sub>2</sub> a sus receptores también incrementa la biosíntesis de estrógenos y con ello la proliferación de células tumorales



**Fig. 6.** Efectos protumorigénicos de la expresión de la COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub>. La COX-2 puede expresarse en las células tumorales así como también en otras células pertenecientes al microambiente tumoral. La PGE<sub>2</sub> ejerce sus efectos a través de sus receptores EP, cuyas vías de transducción de señales pueden interactuar con las de receptores de factores de crecimiento como el EGF.

mamarias<sup>128, 129</sup>. En un modelo de cáncer de pulmón, la PGE<sub>2</sub> activó la quinasa Src mediante la unión al receptor EP3, promoviendo el crecimiento celular<sup>130</sup>. La PGE<sub>2</sub> aumentó la proliferación de las células de adenocarcinoma de pulmón A549 mediante la activación de Ras a través de la señal de su receptor EP4<sup>131</sup>. Además, se demostró el efecto proangiogénico de la PGE<sub>2</sub> en diversos modelos<sup>125, 132-134</sup>, así como también su capacidad de modular la invasividad de las células tumorales mediante la reducción de la expresión de la cadherina E<sup>135, 136</sup>, y el aumento de la motilidad celular<sup>123, 137</sup> y de la expresión y actividad de distintas metaloproteasas<sup>138, 139</sup> (Fig. 6). Estos y otros datos sugieren que la PGE<sub>2</sub>, y por lo tanto la COX-2, tienen un papel importante en la carcinogénesis y la progresión neoplásica. La diversidad de receptores y sus diferentes vías de señalización sugieren que los efectos protumorigénicos de la PGE<sub>2</sub> dependen del tipo celular y del tipo de receptor que se expresa.

# OBJETIVOS

Este trabajo tuvo como objetivo principal investigar el papel de la COX-2 en la biología de los adenocarcinomas de pulmón LP07 y de mama LM3 y LMM3.

La línea tumoral LP07 produce mediadores de la inflamación<sup>140</sup> y tiene una elevada expresión de COX-2 mientras que las células de tumor de mama murino LM3 y LMM3 la expresión de esta enzima es menor. Entonces, resultaba interesante la comparación de la importancia de la COX-2 en estos modelos.

Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar la capacidad de la inhibición farmacológica de la COX-2 de reducir la progresión de los adenocarcinomas de pulmón LP07 y de mama LM3 y LMM3. Para ello se utilizaron el inhibidor no selectivo indometacina y el selectivo celecoxib.
- Estudiar en estos modelos, la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales y el efecto de la inhibición de la COX-2 sobre estos procesos.
- Determinar las vías moleculares alteradas por el tratamiento con inhibidores de la COX-2
- Dada la posibilidad de la existencia de blancos alternativos cuando se inhibe farmacológicamente la COX-2, evaluar el papel real de esta enzima en la biología de los tumores mencionados. Para ello se utilizaron diferentes estrategias: se inhibió la expresión de la COX-2 en las células LP07 mediante distintos ARNhc y se empleó un análogo de celecoxib sin actividad inhibitoria de la COX-2 en los modelos de mama. Para todos los tipos de tumores y en determinados experimentos, se empleó la PGE<sub>2</sub> para evaluar la dependencia de la actividad de la COX-2 de los parámetros estudiados.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Drogas

La indometacina (Sigma-Aldrich), el celecoxib (Microsules&Bernabó) y el dimetilcelecoxib (provisto por el Dr. Axel H. Schönthal, University of Southern California, EE.UU.) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), cuya concentración en los cultivos se mantuvo siempre en 0,1%. Para los experimentos *in vivo*, la indometacina se disolvió en 100% de etanol (5 mg/ml) y luego se suministró a los ratones en el agua de bebida, en una concentración de 10 µg/ml. El celecoxib se administró mezclado con la formulación del alimento. La 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> se separó de su solvente original (acetato de metilo) bajo una corriente de nitrógeno, y se solubilizó nuevamente en DMSO para su uso *in vitro*.

## Líneas celulares LP07, LM3 y LMM3

La línea celular LP07 se obtuvo a partir de un pasaje sc del tumor espontáneo P07. El tumor parental y la línea celular derivada comparten prácticamente las mismas características con respecto a la incidencia metastásica y el desarrollo de síndromes paraneoplásicos<sup>140</sup>. La línea LM3 se obtuvo a partir de un adenocarcinoma mamario murino espontáneo. La línea celular LMM3 se obtuvo a partir del tumor MM3, originado por el trasplante sc sucesivo de metástasis pulmonares del tumor M3<sup>141</sup>.

Todas las líneas celulares se cultivaron en MEM suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 2mM y 80 µg/ml de gentamicina, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

## Experimentos *in vivo*

### Animales

Se utilizaron ratones singénicos para nuestros modelos tumorales, de la cepa BALB/c, hembras o machos según el experimento, de 3 a 4 meses de edad, suministrados por nuestro bioterio. Los animales tuvieron libre acceso a la bebida y el alimento (*ad libitum*), y se mantuvieron en un régimen de 12 h de luz y oscuridad.

### Crecimiento subcutáneo de los tumores

Las células LP07 se inocularon sc en el flanco derecho de ratones hembra BALB/c. El crecimiento tumoral se evaluó dos veces por semana midiendo dos de sus dimensiones perpendiculares con un calibre de Vernier. El volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>) se calculó según:  $(A \times B^2)/2$ , donde A y B fueron los diámetros mayor y menor respectivamente. Las metástasis superficiales se contaron inmediatamente luego de la autopsia bajo lupa.

Para los experimentos con células LP07, se registró el peso de los ratones antes de la inoculación e inmediatamente antes de la autopsia. Los tumores escindidos en el momento de la autopsia también se pesaron, y se calculó la pérdida de peso corporal según:  $[(\text{peso corporal final} - \text{peso tumoral})/\text{peso corporal inicial}] \times 100$ . Los recuentos leucocitarios se hicieron en plasma de periférica obtenida de los senos retro-orbitales de ratones anestesiados, luego de 30 días de portación tumoral. Luego de lisar los glóbulos rojos, los leucocitos se contaron en cámaras de Neubauer.

### Angiogénesis in vivo

Para los ensayos de angiogénesis, se inocularon intradérmicamente, en ambos flancos de ratones BALB/c machos (n=5 por grupo),  $5 \times 10^4$  células LP07, previamente tratadas o no en cultivo durante 24 h. Los controles recibieron medio de cultivo solamente. Luego de 5 días, se sacrificaron los animales y se tomaron fotografías de la zona del inóculo con una cámara digital acoplada a una lupa bajo un aumento x64. La vascularización se cuantificó determinando la densidad de vasos (vasos/mm<sup>2</sup> de piel).

### Metástasis experimentales

Los ensayos de metástasis experimentales se hicieron mediante la inoculación de  $10^5$  células en las venas laterales de la cola de ratones BALB/c hembra. Luego de 21 días, se sacrificaron los ratones y se contaron las metástasis superficiales.

### Producción de retrovirus

Se utilizaron las células PT67 (Clontech) para la producción de retrovirus. Brevemente, se transfectaron las células PT67 con el reactivo Lipofectamine™2000 (Invitrogen) y los plásmidos que correspondiese, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en placas de 35 mm. Se seleccionaron las células productoras de virus con el antibiótico correspondiente durante una semana. Luego se prepararon medios condicionados en placas de 100 mm, utilizando el medio de cultivo habitual, sin antibióticos. Se recolectaron los sobrenadantes en forma seriada, cada 24 h, y se centrifugaron a 500 g durante 5 min a 4°C. Se infectaron las células LP07 con estos sobrenadantes, 3 veces consecutivas, con el agregado de 8 µg/ml de bromuro de hexadimetrina (Polybrene, Sigma-Aldrich) y dejando 12 h de reposo entre cada infección.

Los vectores retrovirales expresaban los ARNhc contra la COX-2 que se detallan en la Tabla 1 (OriGene Technologies).

| ARNhc    | Secuencia 5'→3'               |
|----------|-------------------------------|
| hcCOX2-1 | TGCCTCAATTCAGTCTCTCATCTGCAATA |
| hcCOX2-2 | CTGGTGCCTGGTCTGATGATGATGCCAC  |
| hcCOX2-3 | GGAGCACAACAGAGTGTGCGACATACTCA |
| hcCOX2-4 | CATCTGTTCTCTCAATACTGGAAGCCGA  |

**Tabla 1.** Secuencias de nucleótidos de los ARNhc utilizados para silenciar la expresión de la COX-2 en las células LP07.

Como controles se utilizaron el mismo vector sin codificar ningún ARNhc (Vector) y otro que codificaba para un ARNhc contra la proteína GFP (hcGFP), ausente en células de mamífero a menos que sea introducida artificialmente. Para la selección de las células que expresaran las construcciones se utilizó puromicina (Invivogen) en dosis crecientes (2 a 5 µg/ml). Para el mantenimiento de los cultivos se usaron 2 µg/ml de puromicina.

Para la generación de células LP07 productoras de una variante constitutivamente activa de Akt (Akt mir), se utilizó un plásmido generosamente aportado por el Dr. Hongbing Zhang (Peking Union Medical College, Pekín, China). La selección de las células que expresaran el Akt mir se realizó con dosis crecientes (100 a 500 µg/ml) de higromicina B (HygroGold™, Invivogen). Para el mantenimiento de los cultivos se utilizó la concentración de 100 µg/ml.

### Transfecciones transitorias

Las células LP07, LM3 y LMM3 se transfectaron de manera transitoria con los plásmidos pCG-p110\*, gentilmente cedido por la Dra. Vera Krymskaya (Pulmonary, Allergy and Critical Care Division, University of Pennsylvania Medical Center, EE.UU.) y DN-p38. Se utilizó el reactivo Lipofectamine™2000 (Invitrogen), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

### Ensayos de gen reportero

Se transfectaron las células tumorales como se ha mencionado con los plásmidos que portaban el gen de la luciferasa de *P. pyralis* bajo el control de un promotor que contenía elementos repetidos de respuesta al factor NF-κB o al AP-1 y otro plásmido con el gen de la luciferasa de *Renilla*. Luego de 8 h,  $20 \times 10^3$  de estas células transfectadas se sembraron en cada pocillo de una placa de 24. Cuando el protocolo involucró el tratamiento con drogas, estas se agregaron luego de permitir la adhesión de las células. Se incubaron las placas durante 24 h y se procedió a determinar la actividad de ambas luciferasas mediante el uso de los reactivos del kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega).

### Viabilidad celular

Se sembraron  $5 \times 10^3$  células LP07 ó  $10^4$  células LM3 o LMM3 en placas de 96 pocillos, permitiéndose su adhesión durante 12 h. Luego se incubaron en presencia de los distintos tratamientos en las condiciones estándar o en ausencia de SFB, según sea el caso. La viabilidad celular fue determinada con los reactivos del kit *Cell Titer 96™ Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega) y confirmados por la tinción con cristal violeta.

## Determinación de citoquinas y PGE<sub>2</sub>

Los niveles séricos de IL-1 $\beta$  e IL-6 se midieron en muestras de suero de ratones por medio de kits comerciales de ELISA (Endogen), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los niveles de PGE<sub>2</sub> secretada se midieron en medios condicionados utilizando el kit *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA* (Cayman Chemical).

## Migración e invasión

La migración celular se ensayó en heridas de aproximadamente 0,3 mm realizadas sobre monocapas celulares ligeramente sub-confluentes, en placas de 6 pocillos. Los cultivos se lavaron para eliminar las células desprendidas y se cultivaron en el medio habitual sin SFB y con los distintos tratamientos. Se permitió la migración de las células sobre este área desnuda durante 24 h. La migración se cuantificó calculando el porcentaje del área libre original ocupada por las células migratorias. Se hicieron 3 heridas por pocillo, y 3 pocillos por tratamiento.

Para los ensayos de invasión, se utilizaron cámaras de cultivo Transwell (Corning) de 6,5 mm de diámetro con filtros de 8 $\mu$ m de poro, recubiertos con 0,1% de gelatina en el lado inferior y con Matrigel (250  $\mu$ g/ml, Becton Dickinson) sobre el lado superior. Se sembraron, dentro de los insertos,  $2 \times 10^5$  células tumorales en 0,1 ml de MEM con 1% de SFB y 0,1% de seroalbúmina. Como quimioattractante se utilizó medio condicionado de pulmón de ratones en la cámara inferior, que también contenía los distintos tratamientos dado el caso. Los cultivos se incubaron durante 24h en las condiciones estándar. Finalizada la incubación, los filtros se limpiaron con un hisopo húmedo para remover las células no invasoras del lado superior. Las membranas se fijaron en solución de Carnoy y se tiñeron con Hoescht 33258 (Sigma-Aldrich) y se contaron los núcleos en el lado inferior de los filtros (10 campos de 400x) con un microscopio de fluorescencia. Los datos se expresaron como porcentaje de los controles. Los ensayos se realizaron en duplicado.

## Western Blot

Las monocapas celulares se lisaron con búfer RIPA (20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de deoxicolato de sodio, 1 mM de EDTA y 0,1% de SDS) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich) y según el caso, de fosfatasas (*Phosphatase Inhibitor Cocktail 2*, Sigma-Aldrich). Los lisados se mezclaron con búfer de siembra con 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, se calentaron a 70°C durante 10 min y se sembraron en geles de poliacrilamida del porcentaje adecuado. La electroforesis se desarrolló en un búfer Tris-Glicina. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. La detección inmunológica se realizó con los anticuerpos primarios detallados en la Tabla 2.

| Antígeno/Epítipo                            | Especie | Dilución | Catálogo                            |
|---|---------|----------|-------------------------------------|
| COX-2                                       | Conejo  | 1:1.000  | 160106, Cayman Chemical             |
| pAkt 1/2/3 (Ser 473)                        | Conejo  |          | sc-7985-R, Santa Cruz Biotechnology |
| Akt 1/2/3 (H-136)                           | Conejo  |          | sc-8312, Santa Cruz Biotechnology   |
| p-p38 MAPK (Thr 180/Tyr 182) (D3F9)         | Conejo  |          | 4511, Cell Signaling                |
| p38 MAPK- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ | Conejo  |          | 9212, Cell Signaling                |
| p21 (F-5)                                   | Ratón   |          | sc-6246, Santa Cruz Biotechnology   |
| p27 (C-19)                                  | Conejo  |          | sc-528, Santa Cruz Biotechnology    |
| Actina $\beta$ (AC-74)                      | Ratón   | 1:5.000  | A5316, Sigma-Aldrich                |

**Tabla 2.** Lista de los anticuerpos primarios utilizados.

Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se detectaron las bandas específicas mediante el reactivo ECL.

### Zimografías y detección de la actividad del uPA

La actividad de las metaloproteasas se determinó en geles de 9% de poliacrilamida con 1 mg/ml de gelatina (Sigma-Aldrich), en condiciones no reductoras. Luego de la electroforesis, los geles se lavaron durante 15 min, 2 veces, con 2,5% de Tritón X-100, en agitación suave, y luego 30 min en una solución de Tris-HCl (pH 7,4), 0,2 M de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,02% de Tritón X-100. Según correspondiera a medios condicionados de células LM3 y LMM3 o LP07, los geles se incubaron durante 24 o 48 h, respectivamente, en esta última solución, a 37°C. Luego se fijaron con una solución de 0,1% de azul de Coomassie (G-250, Bio-Rad), 30% de metanol y 10% de ácido acético, y se destiñeron con 30% de metanol y 10% de ácido acético en agua destilada. Se cuantificaron las bandas claras con actividad gelatinolítica.

La actividad del uPA se determinó en ensayos de caseinólisis radial sembrando 10  $\mu$ l de medio condicionado en pocillos de 4 mm de diámetro excavados en geles de 2,5% de agarosa, 0,2 M de Tris-HCl pH 8, con 33 mg/ml de leche descremada como fuente de caseína y 2  $\mu$ g/ml de plasminógeno (Chromogenix). Luego de 24 o 48 h de incubación en una cámara húmeda a 37°C se midieron los diámetros de los halos de degradación de la caseína. La actividad del uPA se refirió a una curva estándar de uroquinasa y se normalizó según el contenido proteico de las monocapas productoras de los medios condicionados. Los datos se expresaron como porcentaje del control.

### Citometría de flujo

Las células LM3 se trataron con la droga correspondiente durante 72 h, luego se tripsinizaron, se lavaron con PBS, y se fijaron con 70% de etanol a -4°C. La tinción se realizó con 50  $\mu$ g/ml de ioduro de propidio con el agregado de 100  $\mu$ g/ml de RNasa A libre de DNasas y 0,1% de Tritón X-100, durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de la citometría los datos se analizaron con el programa WinMDI v2.9.

## Inmunohistoquímica

Se empleó el método indirecto de la estreptavidina y biotina conjugadas con peroxidasa. Los cortes histológicos de los tumores (5  $\mu$ m) obtenidos en portaobjetos cargados positivamente se desparafinaron con xilol, se hidrataron con alcoholes de graduación decreciente y finalmente con agua destilada. La recuperación antigénica se indujo con búfer de citrato (10 mM de ácido cítrico en agua destilada, pH 6) y en ebullición durante 2 min en horno de microondas. Para bloquear la actividad de las peroxidases endógenas se utilizó peróxido de hidrógeno 3% en agua destilada durante 30 min y para bloquear las uniones inespecíficas se utilizó un reactivo bloqueante universal (Power Block, Biogenex) durante 8 min. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (anti COX-2, 160106, Cayman Chemical) diluido en PBS (1:500) en cámara húmeda durante toda una noche. Se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo secundario biotinilado se realizó durante 30 min a temperatura ambiente, seguida de la incubación con estreptavidina-biotina conjugada con peroxidada durante 30 min a temperatura ambiente (LSAB + System-HRP, Dako). Entre cada paso se hicieron lavados con 0,1% Tween en PBS. La detección se realizó con el sustrato cromogénico diaminobencidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako), se monitoreó la reacción hasta observar el desarrollo de color y se frenó en agua destilada. Los cortes se colorearon con hematoxilina de Mayer (4 min), se incubaron en agua corriente durante 5 min, se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente, se aclararon con xilol y se montaron con bálsamo de Canadá sintético.

## Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media y su desvío estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de ANOVA de una vía y contrastes de Bonferroni. Se realizaron ANOVA de dos vías y ANOVA de mediciones repetidas, seguidos por contrastes de Bonferroni, en los experimentos que se indican en el texto.

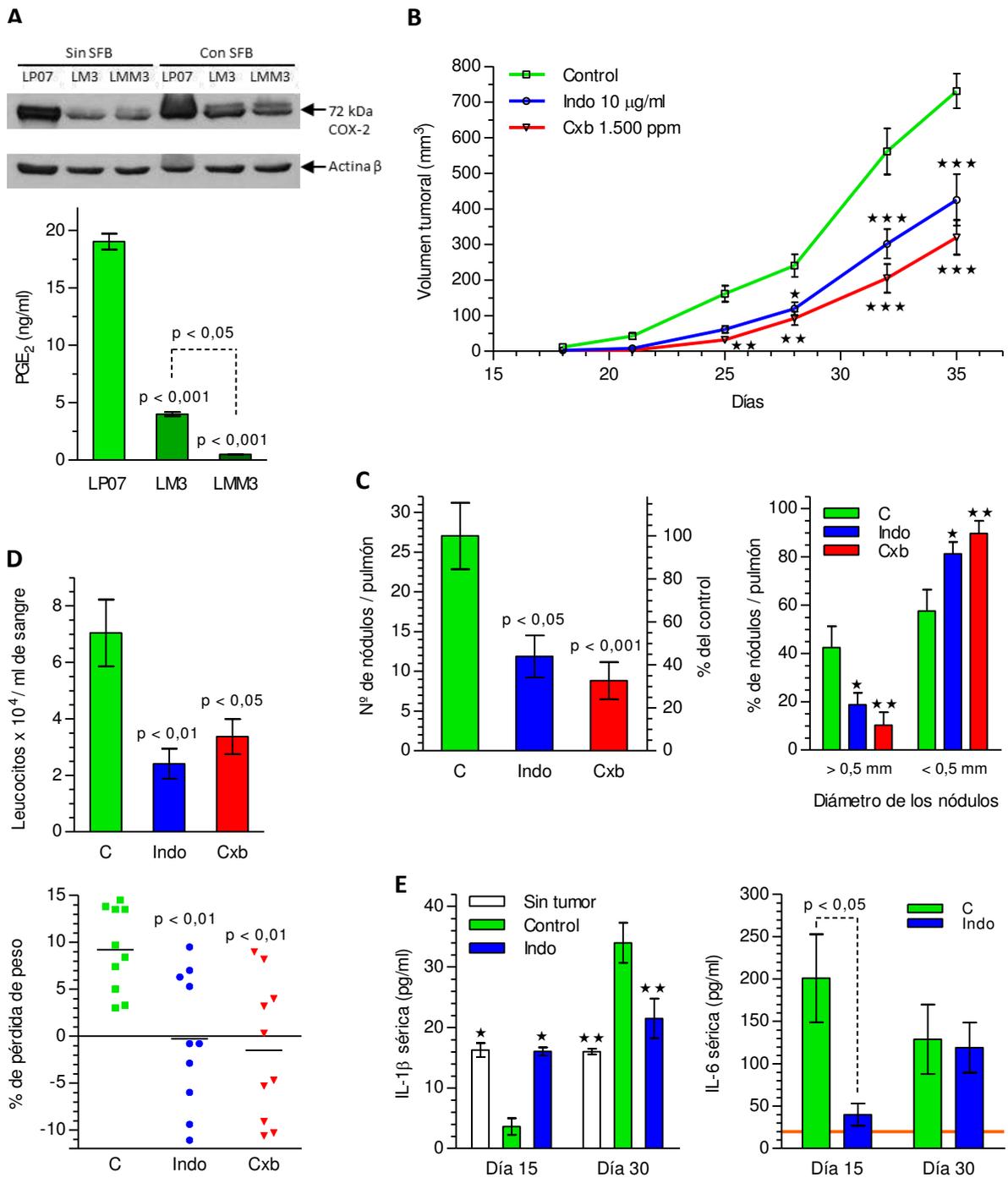
# RESULTADOS

## TUMOR DE PULMÓN LP07

### Reducción de la progresión tumoral y los síndromes paraneoplásicos asociados mediante el uso de inhibidores de la COX-2

Las células del adenocarcinoma de pulmón murino LP07 expresan la COX-2 aún en ausencia de estímulos exógenos, en el medio de cultivo mínimo y sin SFB (Fig. 7A). Si bien el agregado de SFB incrementa su expresión, este aumento es mucho menos notorio que el obtenido en otras líneas celulares tumorales disponibles en nuestro laboratorio. Consecuentemente con la elevada expresión de la COX-2, las células LP07 producen altos niveles de PGE<sub>2</sub> (Fig. 7A). Dado que la COX-2 es una enzima de expresión inducible, decidimos investigar el rol de su presencia constitutiva en la biología de las células LP07. Para estudiar el efecto de la inhibición de la COX-2 en la progresión tumoral, se trataron con indometacina y celecoxib, inhibidores no selectivo y selectivo de la enzima, respectivamente, animales portadores del tumor LP07. Ambos tratamientos redujeron el crecimiento sc y las metástasis pulmonares, tanto en número como en tamaño (Fig. 7B y 7C).

En cuanto al desarrollo de los síndromes paraneoplásicos, ambas drogas redujeron el número de leucocitos en sangre periférica (Fig. 7D), así como también el peso de los bazo de los ratones portadores de tumor (datos no mostrados). La caquexia, evaluada como pérdida de peso corporal, también disminuyó con el tratamiento con ambos antiinflamatorios (Fig. 7D). Mientras que los ratones del grupo control perdieron alrededor del 10% de su peso, los animales tratados lo mantuvieron o incluso mostraron un leve aumento. Las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-6 están asociadas con el establecimiento de una respuesta inflamatoria sistémica, crucial en el desarrollo de la caquexia. Los niveles de estas dos citoquinas se determinaron en el suero de ratones portadores del tumor LP07. Transcurridos 15 días desde el inóculo tumoral, antes que la caquexia sea evidente, los niveles séricos de IL-6 fueron significativamente menores en los ratones tratados con indometacina (Fig. 7E). A los 30 días, cuando la caquexia era manifiesta en el grupo control, no hubo diferencias en los niveles de IL-6. La concentración sérica de IL-1 $\beta$  en los animales portadores del tumor LP07 no tratados, luego de 15 días de la inoculación, fueron menores a los determinados para animales controles sin tumor y los animales portadores tratados con indometacina (Fig. 7E). Por el contrario, con 30 días de desarrollo tumoral, los niveles de IL-1 $\beta$  fueron significativamente mayores en el grupo control con tumor, mientras que se mantuvieron cercanos a los ratones sin tumor en aquellos portadores tratados con indometacina.



**Fig. 7.** Los inhibidores de la COX-2 reducen el crecimiento sc y la progresión del tumor LP07. A) Expresión de COX-2 en la línea celular LP07 en comparación con otras líneas tumorales (LM3 y LMM3), con y sin la estimulación de SFB, y producción de PGE<sub>2</sub>, determinada en los medios condicionados de las distintas líneas celulares. B) Crecimiento sc del tumor LP07, en ratones BALB/c tratados o no con indometacina 10 μg/ml y celecoxib 1.500 ppm. C) Reducción del número y tamaño de las metástasis superficiales pulmonares en ratones portadores (30 días) del tumor LP07 tratados con celecoxib o indometacina. D) Disminución de los síndromes paraneoplásicos leucocitosis y caquexia, determinada como pérdida de peso corporal, en ratones portadores del tumor LP07 tratados con inhibidores de la COX-2 durante 30 días. E) Efecto de la indometacina sobre los niveles séricos de las citoquinas procaquécicas IL-1β e IL-6 en ratones portadores del tumor LP07, a los 15 y 30 días luego de la inoculación sc. La línea roja en el gráfico de la derecha muestra el nivel de IL-6 en el suero de ratones controles sin tumor. En todos los casos, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; comparaciones con el grupo control, excepto que se indiquen adicionales.

## Reducción de la viabilidad celular y la capacidad invasiva de las células LP07 tratadas con inhibidores de la COX-2

Se realizaron ensayos de viabilidad con las células LP07 para estudiar si la reducción del crecimiento tumoral in vivo y la capacidad metastásica se debía a un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales. La viabilidad de las células LP07 se redujo significativamente con la indometacina y el celecoxib, en concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. No se observaron diferencias con concentraciones menores de ambas drogas (Fig. 8A).

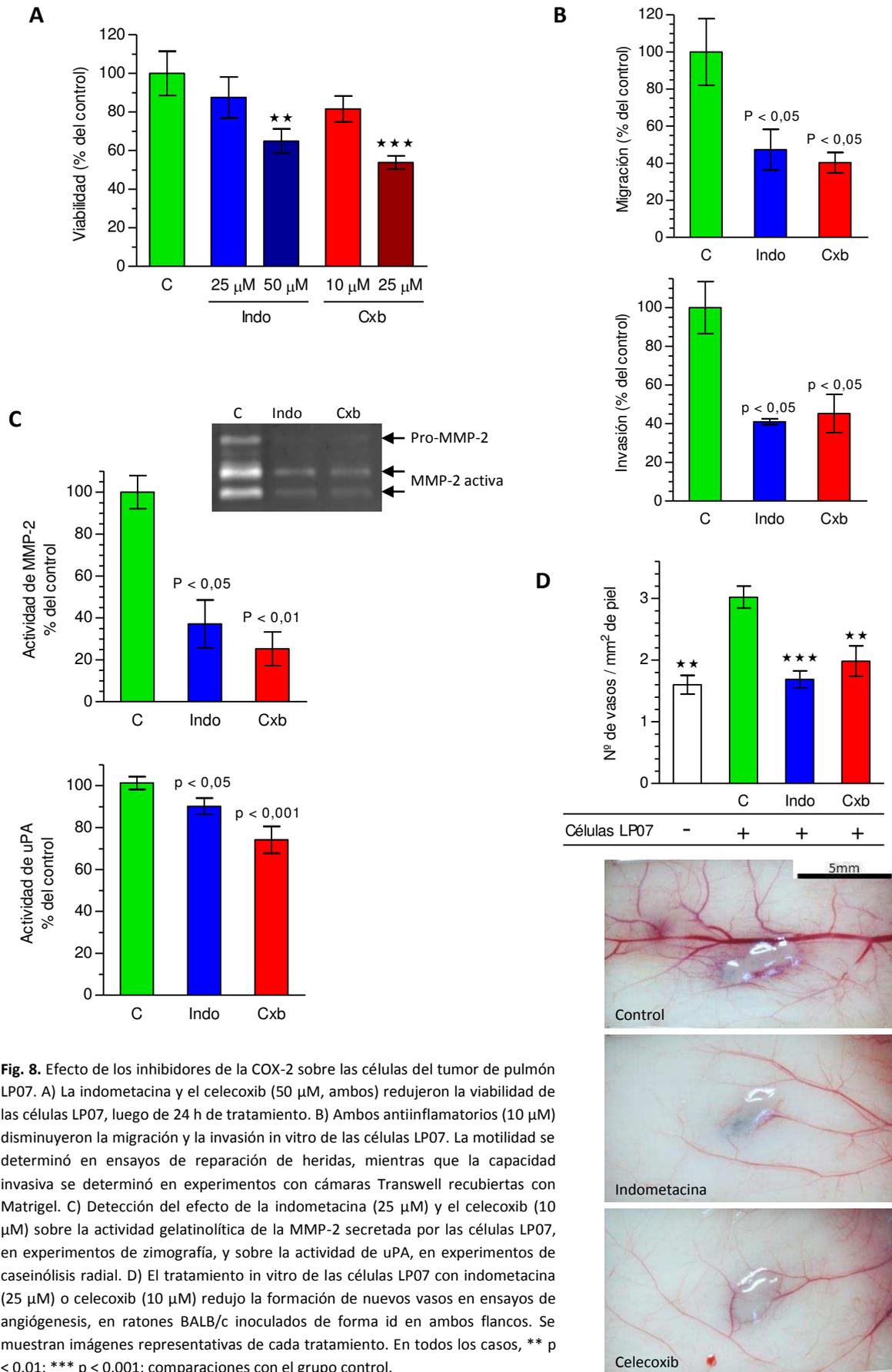
Dado la reducción del número de metástasis en animales portadores del tumor LP07, se estudió el papel de la inhibición de la COX-2 en la motilidad y la capacidad invasiva de las células LP07. En experimentos de migración en heridas, tanto el celecoxib como la indometacina (ambas en una concentración de 10 $\mu\text{M}$ ) redujeron la migración de las células LP07, al igual que la invasión, en ensayos con membranas cubiertas con Matrigel (Fig. 8B). La actividad de la MMP-2, una proteasa clave en procesos invasivos, fue menor en los medios condicionados de células LP07 tratadas con ambos antiinflamatorios, como se determinó en experimentos de zimografías utilizando gelatina como sustrato de la enzima (Fig. 8C). La actividad de la proteasa activadora del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) también estaba disminuida en los medios condicionados de las células LP07 tratadas con indometacina o celecoxib (Fig. 8C). Aunque significativa, esta reducción de la actividad fue menor que la observada para la MMP-2.

## Disminución de la capacidad angiogénica mediante el tratamiento con inhibidores de la COX-2

Se analizó el efecto del uso de inhibidores de la COX-2 en la angiogénesis inducida por la portación del tumor LP07. La densidad de vasos alrededor de un inóculo id de células LP07 fue menor cuando las células habían sido tratadas previamente con 25  $\mu\text{M}$  de indometacina o 10  $\mu\text{M}$  de celecoxib, y cercana a la determinada para ratones inoculados solo con medio de cultivo, como control (Fig. 8D).

## Efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la supervivencia de las células LP07

Dado el efecto de ambos antiinflamatorios sobre el crecimiento sc del tumor LP07, así como la disminución de la viabilidad observada in vitro, decidimos estudiar el efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la quinasa Akt, enzima que participa en vías de señalización de supervivencia<sup>142, 143</sup>. El celecoxib, con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  redujo la fosforilación de la serina 473 de Akt, clave para su activación, luego del estímulo con SFB (Fig. 9A). Por el contrario, el celecoxib incrementó la fosforilación de la quinasa dependiente de mitógenos (MAPK) p38 (Fig. 9B), cuya activación, entre otros estímulos,



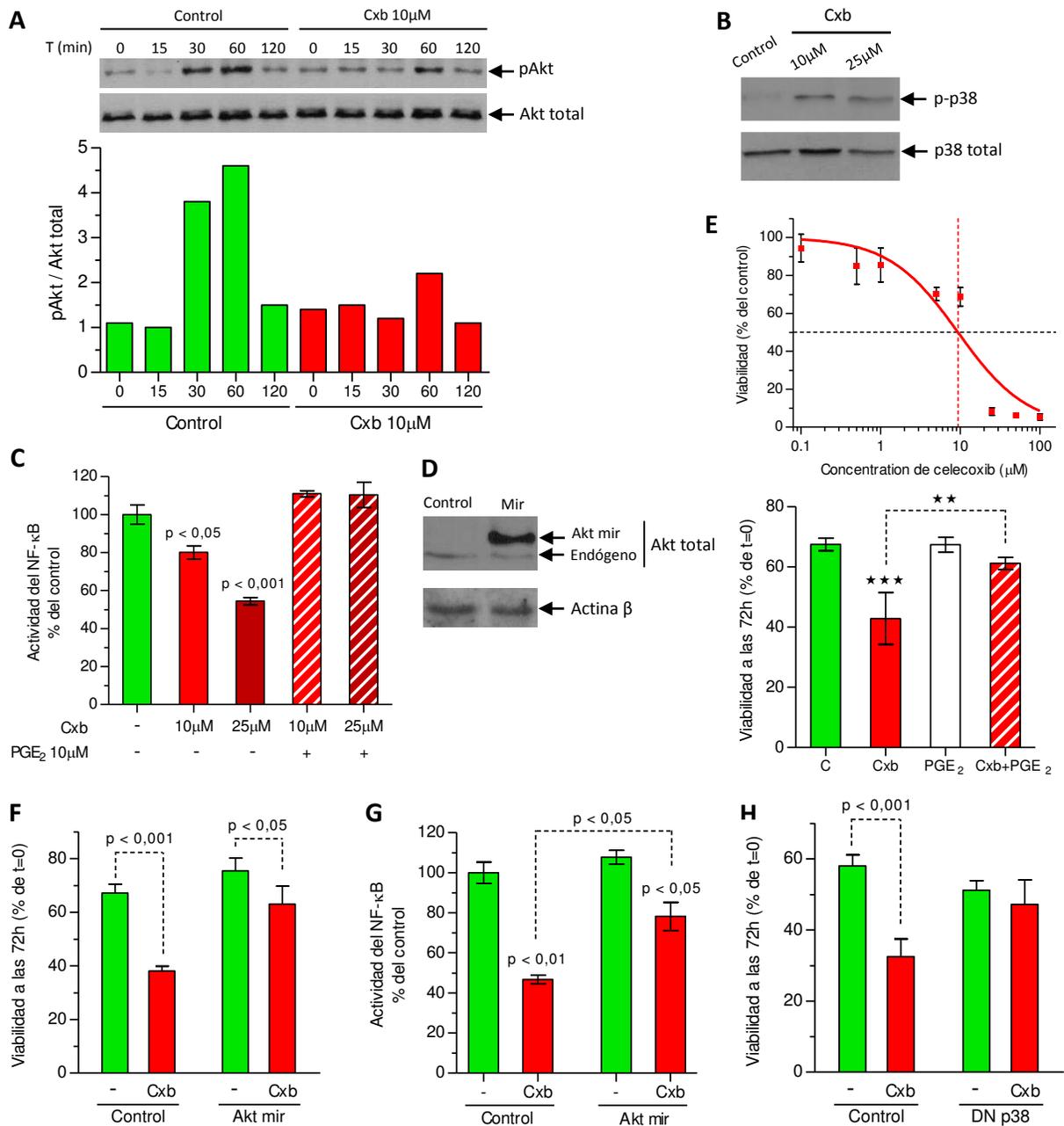
responde al estrés celular y que puede interactuar con otras vías de señalización, como la de Akt<sup>144</sup>. Entre los blancos regulados por la vía de Akt, se encuentra el NF-κB, factor fundamental en procesos inflamatorios y responsable de la transcripción del gen de la COX-2 entre otros<sup>145</sup>. El tratamiento con celecoxib disminuyó la actividad del NF-κB, determinada en experimentos con la luciferasa como gen reportero (Fig. 9C). Esta reducción se revirtió completamente con el agregado de la 16, 16-dimetilprostaglandina E<sub>2</sub> (16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub>), análogo de la PGE<sub>2</sub> resistente a la degradación.

Para estudiar la relación de la inhibición de la COX-2 sobre la reducción de la actividad de Akt relativa a la supervivencia de las células LP07, se generaron líneas celulares derivadas que expresaban una variante de Akt (Akt mir) con actividad constitutiva (Fig. 9D). Se determinó el efecto del celecoxib sobre la viabilidad de las células LP07 en condiciones de estrés, y se halló una disminución de la supervivencia, comparada con el control, a las 72 h de tratamiento en ausencia de SFB (Fig. 9E), lo que fue parcialmente revertido por el agregado de 16, 16-dimetil-PGE<sub>2</sub>. Cuando las células LP07 que expresaban el Akt mir se trataron con celecoxib, en ausencia de SFB, se obtuvo una reducción parcial de la mortalidad celular comparado con las células control (Fig. 9F). De acuerdo con esto, también se produjo una reversión parcial de la reducción de la actividad del NF-κB mediante el tratamiento con celecoxib (Fig. 9G).

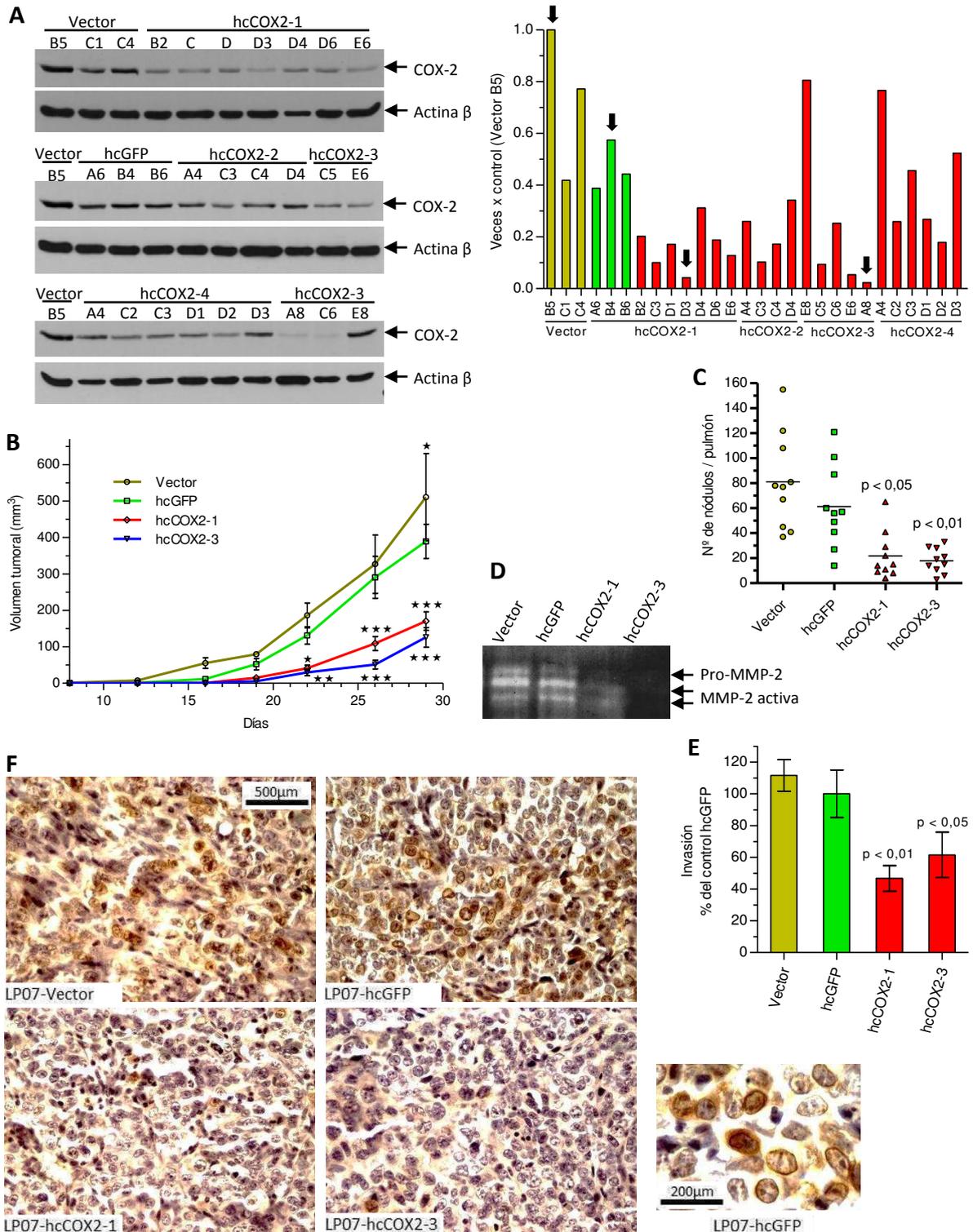
Finalmente, la transfección de las células LP07 con una variante dominante negativa de MAPK p38 (DN p38) eliminó completamente la reducción de la viabilidad inducida por la inhibición de la COX-2 (Fig. 9H).

### **Inhibición de la expresión de COX-2 y reducción de la progresión tumoral**

Algunos de los efectos antitumorales reportados para los inhibidores de la COX-2, podrían deberse en realidad, a su acción sobre otros blancos no relacionados con esta enzima. Para estudiar si la inhibición de la COX-2 era responsable de la reducción de la progresión tumoral observada con la indometacina y el celecoxib, se generaron líneas celulares derivadas de la LP07, con la expresión de la COX-2 reducida mediante ARNhc específicos. Las células LP07 se infectaron con retrovirus que portaban las secuencias para la producción de estos ARNhc. Se aislaron clones con alta y baja expresión de COX-2, correspondientes a cuatro construcciones distintas. Como controles se utilizaron células LP07 infectadas con un vector que no codifica ningún ARNhc (vector) y otro con la secuencia de un ARNhc contra la GFP, ausente en las células LP07 (hcGFP). Las construcciones específicas para COX-2, hcCOX2-1 y hcCOX2-3, redujeron más del 90% la expresión de la enzima (Fig. 10A).



**Fig. 9.** La inhibición de Akt y la estimulación de la MAPK p38 median los efectos antitumorales de la inhibición de la COX-2. A) Luego de un ayuno de SFB durante 6 h, seguidas por otras 4 h con celecoxib, se trató a las células LP07 con SFB durante los tiempos indicados. Se realizó la detección de fosfo-Akt (pAkt) en los extractos proteicos de estas células. B) Se trató a las células LP07 con celecoxib durante 24 h, en ausencia de SFB y se detectó la presencia de fosfo-p38 (p-p38) y p38 total en los lisados correspondientes. C) El celecoxib redujo la actividad del NF-κB determinada con el gen de la luciferasa como reportero. La reducción fue revertida por el agregado de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub>. D) Detección del éxito de la infección de las células LP07 con el vector retroviral que codifica la forma constitutivamente activa de Akt (Akt mir). E) Efecto de la viabilidad de distintas dosis de celecoxib, luego de 72 h de cultivo en ausencia de SFB. La adición de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> revirtió el aumento de la mortalidad inducido por el celecoxib. F) La expresión de la variante constitutivamente activa de Akt revirtió parcialmente la reducción de la viabilidad observada con el tratamiento con celecoxib. G) La activación constitutiva de Akt revirtió parcialmente la inhibición de la actividad de NF-κB por el celecoxib. H) La transfección con una variante dominante negativa de p38 eliminó la reducción de la viabilidad provocada por el celecoxib. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; comparaciones con el grupo control. En F, G y H comparaciones con el grupo control sin celecoxib.



**Fig. 10.** La inhibición de la expresión de la COX-2 inhibe la progresión del tumor LP07. A) Análisis de la expresión de la COX-2 en los distintos clones aislados luego de la infección con los vectores retrovirales que codificaban los distintos ARNhc contra esta enzima. El histograma indica con flechas negras los clones de alta y baja expresión seleccionados para su posterior estudio. La inhibición de la expresión de la COX-2 redujo el crecimiento tumoral *sc* (B) y el desarrollo de metástasis experimentales (C) de las células LP07. D) Zimograma que muestra la inhibición de la actividad de MMP-2 en los medios condicionados de células con la expresión de la COX-2 inhibida. E) La reducción de la expresión de COX-2 reduce la capacidad invasiva de las células LP07 en ensayos con cámaras Transwell. F) Detección mediante IHQ de la expresión de la COX-2 en las muestras de tumores *sc*. Puede observarse la perseverancia *in vivo* de la inhibición de la expresión de la enzima por medio de los ARNhc. Con mayor aumento se muestra la expresión netamente perinuclear de la COX-2 en los controles hcGFP. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

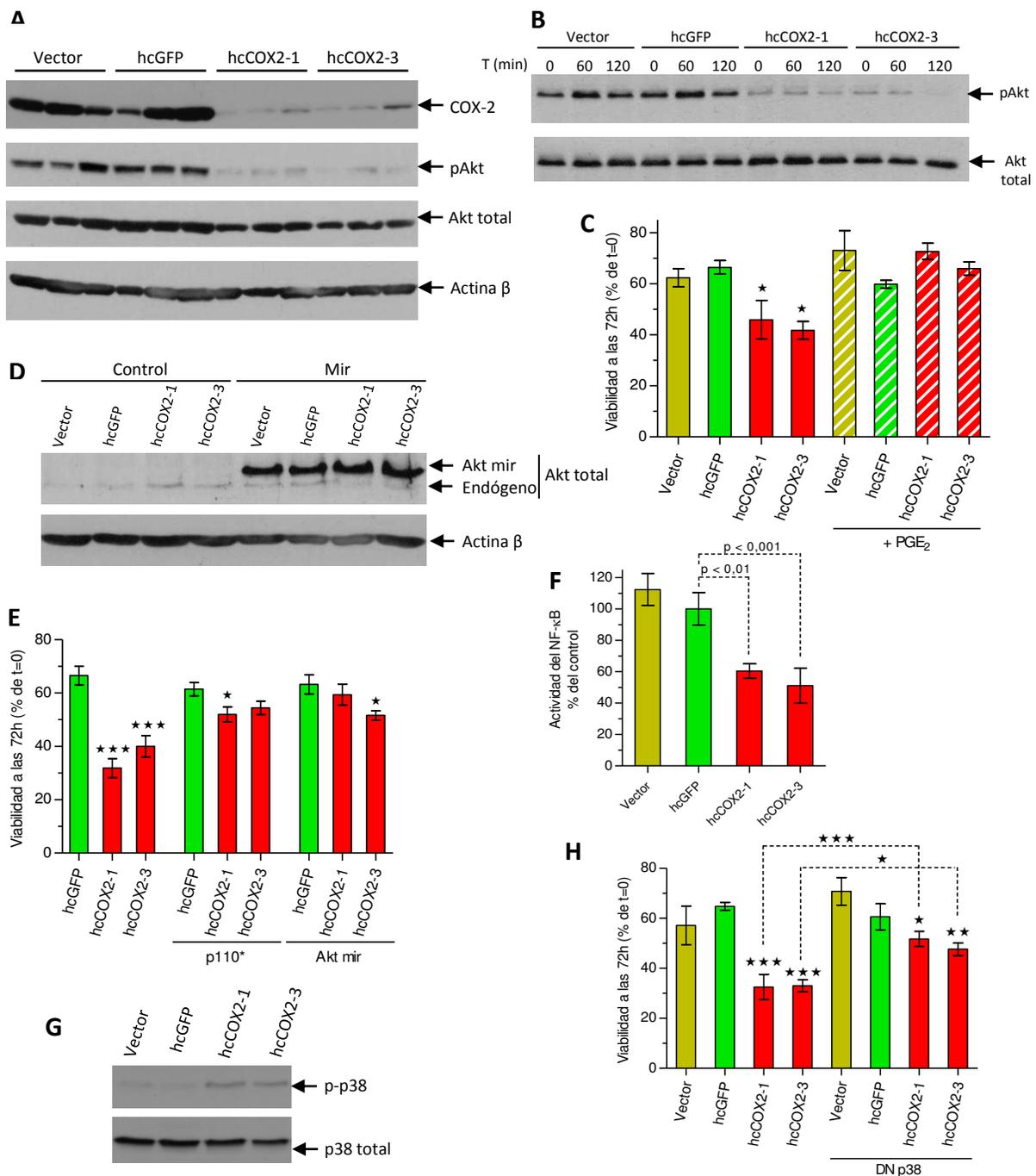
El crecimiento sc de los clones con expresión reducida de COX-2 fue significativamente menor que ambos controles (Fig. 10B). El análisis inmunohistoquímico de los tumores confirmó la persistencia de la inhibición de la COX-2 in vivo (Fig. 10F). El número de metástasis pulmonares superficiales también fue menor (datos no mostrados) en los ratones portadores de tumores con menor expresión de COX-2. Dado que esto podría haber sido una simple correlación con el menor tamaño tumoral, se inocularon células LP07 de manera iv, para independizar el resultado de este parámetro. Las células LP07-hcCOX2-1 y -3 produjeron un número menor de metástasis experimentales en el pulmón (Fig. 10C). La actividad gelatinolítica de la MMP-2 también se redujo en los medios condicionados de estas células con menor expresión de COX-2 (Fig. 10D), coincidentemente con la reducción de su capacidad invasiva (Fig. 10E).

### **Efecto de la expresión de la COX-2 sobre la supervivencia de las células LP07**

Para indagar si el efecto del celecoxib sobre la reducción de la activación de Akt se debía a la inhibición de la COX-2, se detectaron los niveles de fosfo-Akt en los homogenatos de los tumores generados por inoculación subcutánea. La reducción de la expresión de la COX-2 correlacionó con una disminución de los niveles de pAkt (Fig. 11A). Asimismo, las células LP07-hcCOX2-1 y -3, tratadas in vitro con SFB por distintos tiempos, evidenciaron una respuesta menor en cuanto a la fosforilación de Akt (Fig. 11B). Su viabilidad luego de 72 h de ayuno de SFB también disminuyó, y fue revertido por el agregado de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> (Fig. 11C).

Se generaron células LP07-hcCOX2-1 y -3 con la expresión constitutiva de Akt activado (Fig. 11D). La expresión de esta variante de Akt revirtió completamente la reducción de la viabilidad luego de 72 h de ayuno de SFB, observada con la menor expresión de COX-2 (Fig. 11C y 11E). El mismo resultado se obtuvo con la expresión, mediante transfección transitoria, de una mutante que confiere actividad constitutiva a la PI3K (p110\*), ubicada río arriba de Akt (Fig. 11E).

Finalmente, los niveles de fosfo-p38 fueron mayores en las células con menor expresión de COX-2 en respuesta al ayuno de SFB (Fig. 11G), y la expresión transitoria de la dominante negativa de p38 revirtió la disminución de la viabilidad provocada por la inhibición de la expresión de la COX-2 (Fig. 11H).



**Fig. 11.** La reducción de la viabilidad dependiente de la inhibición de la expresión de COX-2 es mediada por Akt y p38. Los niveles de fosfo-Akt fueron menores en los homogenatos de tumores con reducida expresión de COX-2 (A) y en las células LP07-hcCOX2-1 y -3 luego de la estimulación con SFB por distintos tiempos (B). C) Reducción de la viabilidad luego de 72 h de ayuno de SFB mediante la inhibición de la expresión de COX-2. El agregado de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> (10 μM) revierte completamente este efecto. D) Determinación de la presencia de Akt mir en los lisados de células LP07 infectadas con el vector retroviral con esta variante constitutivamente activa de Akt. E) La actividad constitutiva de Akt protegió a las células LP07 de la pérdida de la viabilidad inducida por la menor expresión de COX-2. Un resultado similar se obtuvo con la expresión, mediante transfección transitoria, de una mutante que confiere actividad constitutiva a la PI3K (p110\*). La inhibición de la expresión de la COX-2 redujo la actividad del NF-κB en ensayos con genes reporteros (F) y aumentó los niveles de la MAPK p38 fosforilada (G). La inhibición de p38 revirtió el efecto negativo de la ausencia de COX-2 sobre la viabilidad de las células LP07 (H). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, en todos los casos vs el control hcGFP.

## TUMORES DE MAMA LM3 Y LMM3

### Expresión de la COX-2 en las células LM3 y LMM3

Las células de los adenocarcinomas de mama murinos LM3 y LMM3, que comparten un origen común, difieren en cuanto a la expresión de la COX-2. Ambas líneas expresan la enzima en condiciones basales (Fig. 7A y 12A), e incrementan su expresión luego del estímulo con inductores clásicos como el SFB, el LPS y el TNF- $\alpha$  (Fig. 12A). En todos los casos los niveles de COX-2 son mayores en las células LM3, que además producen concentraciones significativamente más elevadas de PGE<sub>2</sub> (Fig. 7A y 12D).

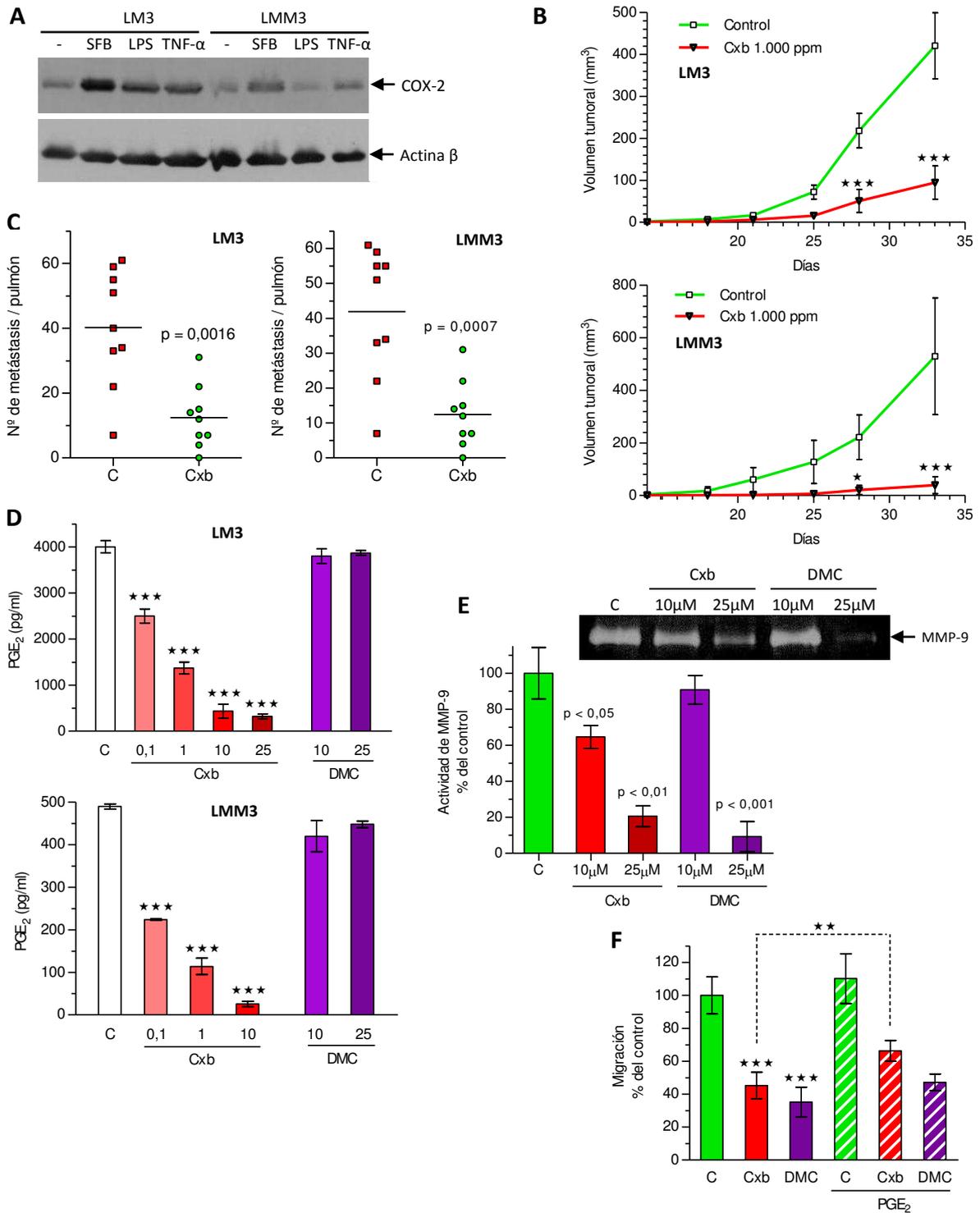
### Efecto antitumoral del celecoxib

El tratamiento con el celecoxib, inhibidor selectivo de la COX-2, de ratones inoculados sc con células LM3 o LMM3, redujo el crecimiento de los tumores de manera significativa (Fig. 12B). El número de metástasis pulmonares, tanto de las espontáneas (datos no mostrados) como de las experimentales, generadas por la inoculación iv de las células tumorales, fue significativamente menor en los animales tratados con celecoxib (Fig. 12C).

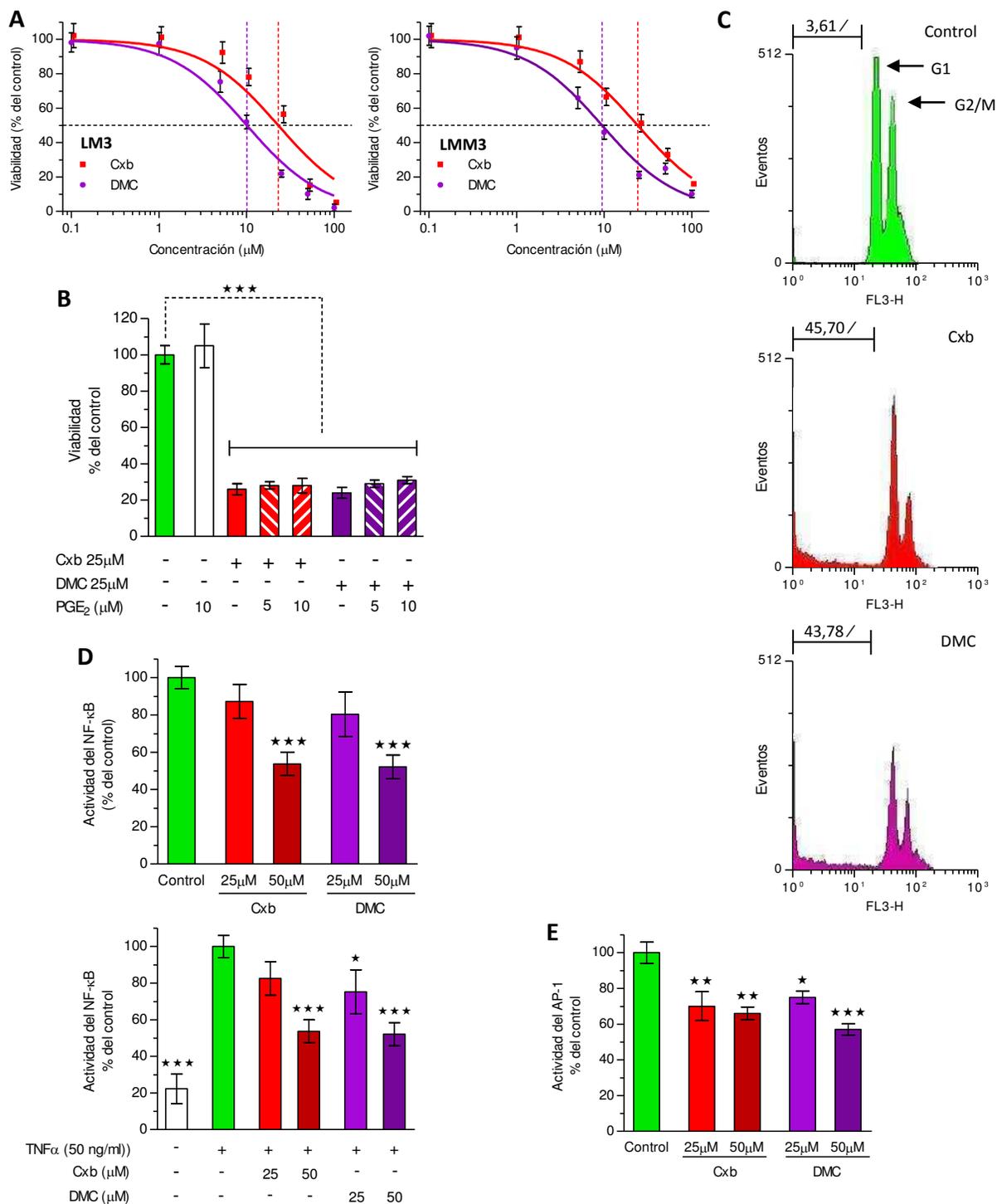
### Independencia de la COX-2 de los efectos antitumorales del celecoxib

Para investigar la dependencia de estos efectos de la inhibición de la COX-2, las células LM3 y LMM3 fueron tratadas *in vitro* con celecoxib o un análogo, el dimetilcelecoxib (DMC), que carece de actividad inhibitoria de la COX-2, lo que fue corroborado por la medición de la producción de PGE<sub>2</sub> en los medios condicionados de ambas líneas celulares (Fig. 12D). El tratamiento de las células LM3 con celecoxib redujo significativamente la actividad de la MMP-9 en los medios condicionados (Fig. 12E). La MMP-9 es una proteasa involucrada en los procesos invasivos. Además, el celecoxib y el DMC inhibieron la motilidad de las células LM3 (Fig. 12F) y LMM3 (datos no mostrados) en ensayos de reparación de heridas *in vitro*. La adición de PGE<sub>2</sub> exógena revirtió parcialmente este resultado sólo en el caso del celecoxib.

Ambas drogas redujeron la viabilidad de las células LM3 y LMM3, con una CI<sub>50</sub> menor para el DMC (Fig. 13A). Este efecto no pudo revertirse por el agregado de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> (Fig. 13B). El análisis mediante citometría de flujo de las células LM3 teñidas con yoduro de propidio reveló un aumento del porcentaje de células apoptóticas cuando fueron tratadas con celecoxib o DMC (Fig. 13C) así como una disminución del número de células en la fase G2/M del ciclo celular. La actividad del NF- $\kappa$ B está relacionada con la evasión de la apoptosis. Consecuentemente, ambas drogas inhibieron, en las células LM3, la actividad de este factor, ya sea la basal o la estimulada por TNF- $\alpha$  (Fig. 13D). La



**Fig. 12.** El celecoxib inhibe la progresión de los adenocarcinomas de mama murinos LM3 y LMM3. A) Expresión de la COX-2 en los cultivos de las células LM3 y LMM3, en ausencia o en presencia de diferentes estímulos: 10/ de SFB, 50 ng/ml de LPS o 20 ng/ml de TNF-α, durante 8 h. B) El celecoxib (1.000 ppm) redujo significativamente el crecimiento sc de los tumores LM3 (arriba) y LMM3 (abajo). C) El tratamiento con celecoxib disminuyó el número de metástasis pulmonares superficiales obtenidas luego de 21 días de un inóculo iv de células LM3 (izquierda) o LMM3 (derecha). D) Cuantificación de la PGE<sub>2</sub> presente en los medios condicionados de 24 h de células LM3 (arriba) o LMM3 (abajo). Se utilizó también un análogo de celecoxib, DMC, que carece de actividad inhibitoria de la COX-2, y que en consecuencia, no produjo una reducción de la secreción de PGE<sub>2</sub>. E) Tanto el celecoxib como el DMC redujeron la actividad gelatinolítica de la MMP-9 en experimentos de zimografía con medios condicionados de las células LM3. F) El celecoxib y el DMC (ambos 25mM) inhibieron la migración de las células LM3 en ensayos de reparación de heridas. La 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> revirtió parcialmente el efecto del celecoxib. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, en todos los casos.

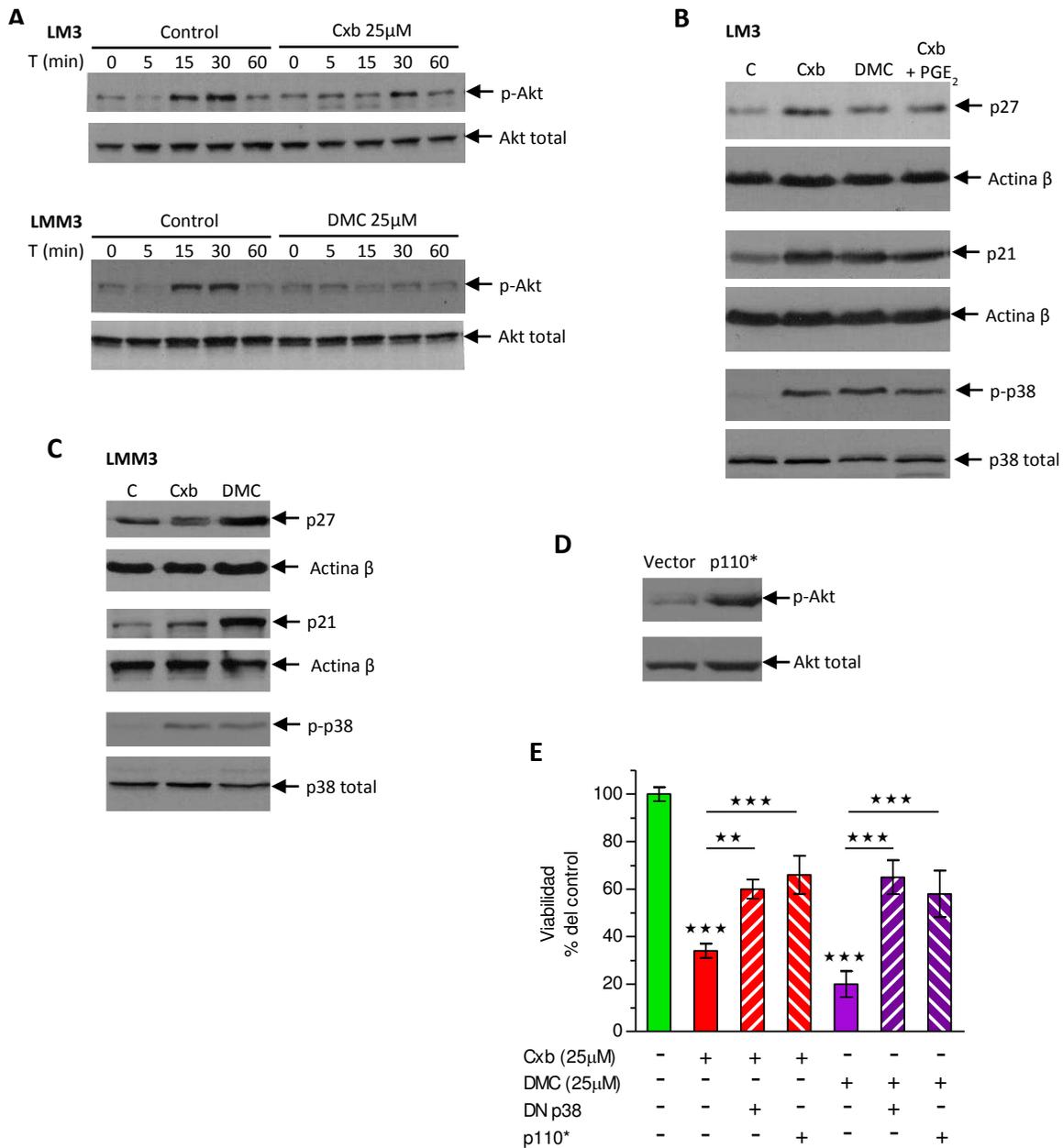


**Fig. 13.** El celecoxib inhibe la viabilidad de las células LM3 y LMM3 independientemente de la inhibición de la COX-2. Tanto el celecoxib como el DMC inhibieron la viabilidad de las células LM3 y LMM3. La CI50 para el DMC fue menor en ambos casos (A). B) La adición de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> no revirtió la disminución de la viabilidad. C) Ambas drogas (10 µM), durante 72 h, aumentaron el porcentaje de células apoptóticas determinado por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. También disminuyeron el porcentaje de células en G2/M. D) El celecoxib y el DMC redujeron la actividad del NF-κB, tanto basal como estimulada por TNF-α. Resultados similares se obtuvieron para la actividad transcripcional del factor AP-1 (E). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, en todos los casos.

actividad del factor de transcripción AP-1, otro modulador de la apoptosis, se redujo tanto con celecoxib como con DMC (Fig. 13E).

Dado que ambas drogas inhibieron la viabilidad de las células LM3 y LMM3, se determinaron los niveles de fosfo-Akt luego del tratamiento con las mismas. Tanto el celecoxib como el DMC redujeron la fosforilación de Akt en respuesta al SFB (Fig. 14A). En las células LM3, ambas drogas incrementaron los niveles de las proteínas inhibidoras del ciclo celular p21 y p27 (Fig. 14B) y de la MAPK p38 fosforilada. Esos aumentos no se revirtieron con el agregado de PGE<sub>2</sub> (Fig. 14B). Resultados similares se observaron para las células LMM3 (Fig. 14C).

Finalmente, la transfección con la una mutante que confiere actividad constitutiva a la PI3K (p110\*), enzima que fosforila a Akt (Fig. 14D), revirtió parcialmente la pérdida de la viabilidad debida al tratamiento con celecoxib o DMC en las células LM3 (Fig. 14E). El mismo efecto se observó mediante la transfección con una variante dominante negativa de p38 (DN p38, Fig. 14E).



**Fig. 14.** El celecoxib modula la actividad de las quinasas Akt y p38 y aumenta la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27. A) El celecoxib redujo la fosforilación de Akt estimulada por la presencia de SFB luego de distintos tiempos, en las células LM3 y LMM3. B) El tratamiento de las células LM3 celecoxib o DMC, durante 24 h, aumentó la expresión de p21 y p27 y la fosforilación de la MAPK p38. El agregado de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> al tratamiento con celecoxib no revirtió estos aumentos. C) Resultados similares se obtuvieron con las células LMM3. La transfección transitoria de las células LM3 con una mutante que confiere actividad constitutiva a la PI3K (p110\*), y por lo tanto fosforilación constante de Akt (D), revirtió parcialmente la reducción de la viabilidad debida al tratamiento con celecoxib o DMC (E). El mismo resultado se obtuvo con la expresión transitoria de una dominante negativa de p38. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El adenocarcinoma de pulmón murino LP07 es una herramienta útil para el estudio del cáncer de pulmón dado que comparte características con los tumores de pacientes humanos. Una de estas características importantes es el desarrollo de los síndromes paraneoplásicos de caquexia, leucocitosis e hipercalcemia<sup>140</sup>. Previamente se detectó la presencia de citoquinas como la IL-6 y el GM-CSF en los medios condicionados del tumor P07 que dio origen a la línea celular utilizada en este trabajo<sup>146-148</sup>. Estos factores tienen un papel importante en el desarrollo de tales síndromes. Las respuestas inflamatorias, cuando devienen crónicas y/o sistémicas favorecen, no solo el desarrollo de los síndromes paraneoplásicos sino además el crecimiento tumoral y el proceso metastásico<sup>32, 33, 45</sup>.

Los AINE se estudiaron ampliamente en la prevención del cáncer colorrectal y el tratamiento en modelos animales y en pacientes<sup>96, 149-151</sup>. Un número importante de trabajos les adjudica efectos terapéuticos beneficiosos con otros tipos de tumores<sup>152-155</sup>. La mayor parte de dichos trabajos relacionan esos efectos con la inhibición específica de la COX-2, dado que la expresión de esta isoforma es la que se encuentra incrementada en una gran variedad de tumores además de los colorrectales<sup>97-100, 103, 104</sup>.

Dado el componente inflamatorio asociado a la progresión del tumor LP07 (producción de GM-CSF e IL-6, leucocitosis), además de su elevada expresión de la COX-2 (Fig. 7A), decidimos utilizar los AINE para tratar a los ratones portadores de este tumor. Por otra parte, está documentado el papel de los eicosanoides, como las prostaglandinas, en el establecimiento y el desarrollo de la caquexia asociada al cáncer<sup>156, 157</sup>, por lo cual la terapia con los AINE resulta atractiva.

El tratamiento de los ratones portadores del tumor LP07 con indometacina y celecoxib redujo el crecimiento sc y el desarrollo de metástasis pulmonares (Fig. 7B y 7C), resultado coincidente con otros hallados en tumores de pulmón murino y otros tipos de cáncer<sup>158-160</sup> y con lo obtenido por nosotros con los adenocarcinomas de mama murinos LM3 y LMM3 (Fig. 12B y 12C). Estas líneas tumorales de mama, difieren entre sí y con la LP07, en cuanto a la expresión de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub> (Fig. 7A, 12A y 12D). Se observó además, en los ratones portadores del tumor LP07, una reducción de la leucocitosis y la pérdida de peso corporal asociada a la progresión tumoral (Fig. 7D). El efecto sobre la pérdida de peso fue descrito anteriormente en diferentes modelos tumorales y en pacientes con caquexia relativa al desarrollo tumoral<sup>161-163</sup>.

Las prostaglandinas producidas por el tumor estimulan la secreción de IL-6<sup>164, 165</sup>, y por lo tanto, la inhibición de la síntesis de las mismas con los AINE podría prevenir el establecimiento de la caquexia mediado por la IL-6. En nuestro trabajo, el tratamiento

con indometacina redujo los niveles séricos de IL-6 medidos el día 15 luego de la inoculación tumoral (Fig. 7E), cuando la caquexia comienza a establecerse, debido presumiblemente a la necesidad de una masa tumoral mínima de células productoras de factores caquéticos. Por el contrario, los niveles de IL-6 fueron similares luego de 30 días de portación, a pesar del tratamiento con indometacina. No obstante, el nivel de IL-6 sérica en los ratones tratados con este AINE siempre se mantuvo por debajo del pico detectado para los ratones sin tratar en el día 15 de portación tumoral. A pesar de no poder mantener la concentración de esta citoquina cercana a los valores para ratones no portadores, el establecimiento de la caquexia resultó retardado en los ratones tratados con indometacina, lo cual sugiere que el tratamiento preventivo con un AINE en etapas tempranas puede reducir la pérdida de peso a través de la inhibición de la producción de IL-6.

La IL-1 $\beta$  es una citoquina relacionada con respuestas inflamatorias sistémicas y la caquexia debida al cáncer<sup>166-168</sup>. Sus niveles séricos en los ratones tratados con indometacina permanecieron casi constantes y cercanos a los valores determinados para ratones no portadores de tumor (Fig. 7E). Los controles, en cambio, evidenciaron una caída de la concentración de IL-1 $\beta$  a los 15 días, reflejando quizá un impedimento para la iniciación de una respuesta inmune antitumoral. Cuando se determinaron al día 30 de portación tumoral, los niveles de IL-1 $\beta$  eran característicos de una respuesta inflamatoria crónica. La IL-1 $\beta$  está involucrada, además de la caquexia, en la producción de otras citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, y puede afectar positiva o negativamente el crecimiento tumoral dependiendo de sus niveles<sup>169-171</sup>. En conjunto, la reducción, en distintas etapas de la progresión tumoral, de los niveles de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-6, sería responsable, en parte, de la menor pérdida de peso de los ratones portadores del tumor LP07 tratados con indometacina. Esto concuerda con otro trabajo previo de nuestro laboratorio, con el mismo modelo tumoral, en el cual la combinación terapéutica de un AINE y la droga orexigénica acetato de medroxiprogesterona (MPA), inhibió la progresión tumoral y los síndromes paraneoplásicos<sup>172</sup>. También observamos que pacientes con adenocarcinoma de pulmón avanzado tratados con la combinación de celecoxib y MPA tuvieron una menor pérdida de pesos y mejoraron su calidad de vida<sup>173</sup>.

En la mayoría de los experimentos descriptos en esta tesis, tanto la indometacina como el celecoxib evidenciaron efectos antitumorales *in vitro* en concentraciones similares a las determinadas en el plasma de ratones ( $\approx 20 \mu\text{M}$ ) tratados con dosis similares a las usadas en nuestros experimentos *in vivo*<sup>174, 175</sup>. Este hecho es relevante ya que existe abundante bibliografía que describe trabajos *in vitro* en los cuales se utilizan concentraciones de los AINE mucho más elevadas de las que podrían alcanzarse *in vivo*, y por tanto podrían no explicar los efectos observados en modelos animales. Además, como hemos observado para el caso del celecoxib, concentraciones mayores de  $10 \mu\text{M}$

no incrementan la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> (Fig. 7A y 12D) de las células en cultivo. Si bien la PGE<sub>2</sub> no es la única prostaglandina cuya síntesis utiliza los intermediarios producidos por la COX-2, es el metabolito más relevante en la progresión tumoral. Ya en el comienzo de la investigación oncológica con los inhibidores selectivos de la COX-2 resultó evidente esta discrepancia entre las concentraciones necesarias para inhibir la enzima y aquellas que evidenciaban efectos antitumorales<sup>176</sup>. Además, las propiedades antitumorales de los inhibidores selectivos de la COX-2 diferían para drogas muy similares estructuralmente, es decir, no eran lo que en farmacología se conocen como efectos “de clase”, al menos en cuanto a sus resultados clínicos<sup>177, 178</sup>. En paralelo, algunos artículos científicos comenzaron a demostrar efectos de los inhibidores de la COX-2 en células que carecían de la expresión, siendo el de Zhang *et al* un ejemplo clásico de este tipo de resultados<sup>179</sup>. En este trabajo, fibroblastos primarios obtenidos de embriones de ratón transgénicamente deficientes para la expresión de la COX-2, y transformados con Ha-*ras* y/o SV-40 respondieron al tratamiento con los AINE de manera dependiente de la dosis, reduciendo la formación de colonias en agar y la proliferación, y aumentando la apoptosis.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos verificar el papel real de la COX-2, más allá de sus inhibidores, en la biología de estos tumores. Se infectaron las células LP07 con vectores retrovirales para la producción de ARNhc específicos inhibitorios de la expresión de la COX-2 (Fig. 10A). Los tumores generados por inoculación sc de estas células crecieron significativamente menos que los controles con expresión elevada de la COX-2 (Fig. 10B). El mismo resultado se obtuvo con las metástasis espontáneas (datos no mostrados) y con las generadas por inoculación iv de las células LP07 (Fig. 10C), lo que sugiere que la inhibición de la COX-2 es responsable de los efectos antitumorales del celecoxib in vivo en este modelo de cáncer de pulmón.

La disminución del número de metástasis mediante el tratamiento con indometacina y celecoxib, en los ratones portadores del tumor LP07 (Fig. 7C) y con celecoxib en los inoculados con LM3 y LMM3 (Fig. 12C), puede ser explicado por la inhibición de diferentes procesos. La motilidad, la invasión y la angiogénesis son directamente modulados por las prostaglandinas derivadas de la COX-2 o por otros mediadores, como la IL-1β. Voronov *et al* demostraron el papel favorecedor de la IL-1β en el desarrollo metastásico del melanoma B16<sup>171</sup>. Ambos inhibidores de la COX-2 redujeron la migración de las células LP07 en ensayos de reparación de heridas (Fig. 8B). El celecoxib hizo lo propio con la motilidad de las células LM3 en el mismo tipo de experimentos (Fig. 12F). Para evaluar la posibilidad de que este efecto fuera independiente de la inhibición de la COX-2, se utilizó el dimetilcelecoxib, derivado carente de actividad inhibitoria de esta enzima<sup>180</sup> (Fig. 12D). El DMC redujo la migración de las células LM3 de manera similar al celecoxib (Fig. 12F). El agregado de PGE<sub>2</sub> exógena afectó mínimamente la inhibición

obtenida con el celecoxib, lo que junto con el resultado anterior sugiere la existencia de otros blancos moleculares para este AINE en las células LM3 y LMM3, distintos de la COX-2.

Se ha reportado la inhibición de la motilidad de células tumorales de mama mediante el tratamiento con indometacina o NS398, inhibidor específico de la COX-2<sup>181</sup>; por el contrario, no se halló ningún efecto inhibitorio de la migración mediante el uso del mismo NS398 o el no selectivo ibuprofeno en células tumorales de próstata<sup>182</sup>. No obstante, en ambos trabajos, los antiinflamatorios redujeron la invasión de las células tumorales. Nuestros resultados demuestran que tanto la indometacina como el celecoxib redujeron la invasividad de las células LP07 (Fig. 8B). La inhibición de la expresión de la COX-2 produjo el mismo resultado (Fig. 10E). Se han descrito diferentes mecanismos que dan cuenta de esta inhibición; el tratamiento con un AINE puede afectar tanto la motilidad celular como la liberación de enzimas proteolíticas, mayormente metaloproteasas<sup>182-185</sup>. Cabe destacar que la capacidad invasiva requiere no sólo de la motilidad celular sino que además de la capacidad de degradar la matriz extracelular.

El celecoxib y el NS398 redujeron la actividad de la MMP-2 en los medios condicionados de líneas celulares de carcinoma escamoso oral<sup>186</sup> y osteosarcoma<sup>183</sup>, respectivamente, mientras que el NS398 y la reducción de la expresión de la COX-2 hicieron lo propio en una línea de fibroblastos humanos cuyos medios condicionados estimulan la invasión de células de carcinoma escamoso oral<sup>187</sup>. En nuestro trabajo detectamos una baja actividad proteolítica de la MMP-2 en los medios condicionados de células LP07 tratadas con indometacina o celecoxib (Fig. 8C) o mediante la inhibición de la expresión de la COX-2 (Fig. 10D), y de MMP-9 en los provenientes de las células LM3 tratadas con celecoxib (Fig. 12E). El DMC resultó igualmente efectivo en la reducción de la actividad gelatinolítica de la MMP-9 (Fig. 12E). La disminución de la motilidad y de la actividad proteolítica de la MMP-2 y de la MMP-9 explica la menor capacidad invasiva de las células LP07 y LM3 tratadas con los inhibidores de la COX-2. A esta misma disminución estaría asociada la reducción del número de metástasis observado en los ratones portadores de tumores LP07 (Fig. 7C y 10C) y de aquellos inoculados iv con células LM3 o LMM3 (Fig. 12C) cuando fueron tratados con los AINE.

La angiogénesis es un proceso necesario para el crecimiento de los tumores más allá de las dimensiones impuestas por la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de hipoxia. Es también un evento clave en la diseminación metastásica. Los AINE modulan la angiogénesis actuando directamente sobre las células endoteliales o sobre las células tumorales epiteliales y su estroma. Observamos una reducción del número de vasos que se desarrollan *in vivo* alrededor de un inóculo de células LP07 cuando estas fueron previamente tratadas con indometacina o celecoxib (Fig. 8D). La actividad de las metaloproteasas como la MMP-2 y la MMP-9 también contribuye a la invasión del

estroma tumoral por parte de las células endoteliales para alcanzar zonas no vascularizadas<sup>188-190</sup>. La inhibición de la actividad de la MMP-2 y el uPA (Fig. 8C) por los inhibidores de la COX-2 puede entonces, no sólo afectar la capacidad invasiva de las células epiteliales tumorales sino el crecimiento tumoral y el desarrollo metastásico a través de la inhibición de la angiogénesis.

La reducción del crecimiento tumoral sc y el número de metástasis pulmonares podría ser consecuencia de una disminución de la capacidad proliferativa de las células tumorales y/o reflejar una pérdida de la capacidad de supervivencia en el medio nutricionalmente pobre creado por una red vascular deficiente como suele ser la que se desarrolla en los tumores. Para el caso de las metástasis, además, esta capacidad es esencial habida cuenta de las condiciones hostiles que soportan las células tumorales durante la cascada metastásica. En nuestro trabajo, observamos un efecto directo de los AINE sobre la viabilidad de las células tumorales, ya que tanto la indometacina como el celecoxib aumentaron la mortalidad de las células LP07 en cultivo (Fig. 8A y 9E). El agregado de PGE<sub>2</sub> revirtió este efecto del celecoxib sobre las células LP07. El celecoxib también inhibió la viabilidad de las células LM3 y LMM3 (Fig. 13A), aunque la CI<sub>50</sub> del DMC fue levemente menor. En este punto, cabe notar que la progresión tumoral en el modelo de adenocarcinoma de pulmón comienza a evidenciar una dependencia de la COX-2 aparentemente ausente en ambas líneas de tumores mamarios. Al menos, resulta evidente que los efectos de los AINE son independientes de la enzima en los modelos de mama y no lo es en el de pulmón.

Akt es una quinasa involucrada en las vías de señalización de la supervivencia y cuya actividad se encuentra frecuentemente aumentada en muchos tipos de tumores. Es activada por citoquinas, factores de crecimiento y oncoproteínas como Ras. Esta activación está mediada por la PI3K<sup>191</sup> y localiza Akt en la membrana plasmática donde es sustrato de la PDK1, que la fosforila en la serina 473. Una vez que está completamente activada, Akt se moviliza al citoplasma y al núcleo donde fosforila, activando o inhibiendo diversos blancos que regulan diferentes funciones celulares, incluyendo el metabolismo celular, la síntesis proteica, la supervivencia/inhibición de la apoptosis y la progresión del ciclo celular<sup>192</sup>. Dada la reducción de la viabilidad en nuestras líneas celulares mediante la inhibición de la COX-2 o el uso de AINE, estudiamos el estado de Akt en nuestros modelos. Encontramos que tanto en las células LP07 como en las LM3 y LMM3, el tratamiento con celecoxib inhibió la fosforilación de Akt estimulada por el SFB (Fig. 9A y 14A). En las líneas de mama, nuevamente el DMC produjo resultados similares al celecoxib (Fig. 14A). En las células LP07 la ausencia de la COX-2 correlacionó con un nivel menor de Akt fosforilado en muestras de tumor (Fig. 11A) y en respuesta a la estimulación con SFB en células en cultivo (Fig. 11B). Esta reducción de la actividad de Akt fue determinante para el efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la viabilidad de las

células LP07, ya que la infección con un vector retroviral con la variante constitutivamente activa de Akt (Fig. 9D y 11D) revirtió parcialmente la reducción de la viabilidad con celecoxib (Fig. 9F) o por inhibición de la expresión de la COX-2 (Fig. 11E). Un resultado similar se obtuvo con las células LM3 mediante la transfección transitoria de una variante que confiere actividad constitutiva a la PI3K, que fosforila a Akt (Fig. 14D y 14E). En las células LP07 con expresión reducida de la COX-2, la PGE<sub>2</sub> exógena revirtió la menor supervivencia (Fig. 11C), confirmando nuevamente el papel clave de esta enzima en la biología del tumor LP07. Entre los blancos de Akt se encuentran proteínas inhibitorias de la apoptosis, como Bad y Bax. Consecuentemente con este rol modulador de la apoptosis, observamos que la reducción de la activación de Akt correlaciona con un aumento de la apoptosis en las células LM3 tratadas con celecoxib o DMC (Fig. 13C).

Además de Akt, otro factor que interviene en la señalización de la supervivencia es el NF- $\kappa$ B. La activación constitutiva de este factor de transcripción se encontró asociada a numerosos tipos de cáncer<sup>193</sup>. El NF- $\kappa$ B existe como dímero, mayoritaria aunque no exclusivamente, de las proteínas p50 y p65. Se encuentra retenido en el citoplasma e inactivo mediante la interacción con su inhibidor I $\kappa$ B. Existen distintos estímulos para la activación del NF- $\kappa$ B, entre ellos las citoquinas proinflamatorias y el LPS bacteriano. La activación requiere la fosforilación del I $\kappa$ B y su degradación proteosómica. En esas condiciones, el NF- $\kappa$ B trasloca al núcleo donde ejerce sus funciones como factor de transcripción. La sintonía fina de la actividad transactivadora la aportan diversas modificaciones postranscripcionales, entre ellas las provistas por la vía de Akt. En este trabajo, hallamos que el celecoxib reduce la actividad del NF- $\kappa$ B en las células LP07 (Fig. 9C), en una forma dependiente de la producción de PGE<sub>2</sub>, ya que el mismo resultado se obtuvo con la inhibición de la expresión de la COX-2 (Fig. 11F) y se revirtió con la adición de PGE<sub>2</sub> exógena (Fig. 9C). La misma reducción de la actividad del NF- $\kappa$ B se obtuvo en las células LM3 (Fig. 13D) y LMM3 (datos no mostrados) con celecoxib y DMC.

La MAPK p38 transduce un amplio rango de señales extracelulares generando múltiples y diferentes efectos biológicos. Citoquinas, factores de crecimientos y señales de estrés activan a la p38. Se ha propuesto que la duración e intensidad de la activación de la p38 le confiere efectos opuestos a sus respuestas. Por ejemplo, la respuesta al estrés usualmente genera una fuerte y sostenida activación de p38, mientras que distintas funciones homeostáticas están asociadas con un nivel de activación bajo y transitorio<sup>144</sup>. Por lo tanto, puede esperarse que el nivel de activación de la p38 discrimine los sustratos a ser fosforilados. Una activación fuerte está asociada a la promoción de la apoptosis mientras que niveles bajos de actividad se vinculan con la supervivencia celular<sup>144</sup>. En nuestro modelo de tumor de pulmón, encontramos que la inhibición de la COX-2 aumenta la fosforilación de p38 (Fig. 9B y 11G). Consecuentemente, la inhibición de su actividad con una dominante negativa revierte totalmente la menor viabilidad observada

por la inhibición de la COX-2 (Fig. 9H y 11H). Este efecto antitumoral de la p38 coincide con lo reportado para ratones deficientes en p38 $\alpha$ , los cuales fueron más sensibles a la tumorigénesis pulmonar inducida por K-ras<sup>194</sup>. En las líneas de mama, tanto el celecoxib como el DMC incrementaron la fosforilación de p38 (Fig. 14B y 14C), pero la inhibición de su actividad revirtió sólo parcialmente la disminución de la viabilidad causada por el tratamiento con ambas drogas (Fig. 14E).

El celecoxib y el DMC produjeron una disminución del porcentaje de células LM3 en la etapa G<sub>2</sub>/M del ciclo celular (Fig. 11C). Consecuentemente, observamos niveles menores de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27 cuando las células LM3 y LMM3 habían sido tratadas con cualquiera de estas drogas (Fig. 14B y 14C). La PGE<sub>2</sub> exógena no abolió este efecto del celecoxib (Fig. 14B), lo que concuerda con lo hallado por Han *et al* en diferentes líneas de colangiocarcinomas humanos en los que el celecoxib indujo un arresto del ciclo celular que no pudo ser revertido por la presencia de PGE<sub>2</sub> o el aumento de la expresión de la COX-2, y un incremento de los niveles de p21 y p27 que no revirtió por la inhibición de la expresión de la enzima<sup>176</sup>. Grösch *et al* obtuvieron un resultado similar con la expresión de p21 y p27 tratando con celecoxib distintas líneas celulares que diferían en los niveles de COX-2<sup>195</sup>. Cabe notar que tanto Akt como p38 están asociados con la modulación de la apoptosis y el ciclo celular. El celecoxib promovió la apoptosis o el arresto celular de líneas de cáncer de mama humanas de manera dependiente o no de la inhibición de la COX-2, inhibiendo la activación de Akt<sup>196</sup>. Por otra parte, en una línea de cáncer colorrectal humano, el celecoxib indujo la apoptosis vía la activación de la MAPK p38, mientras que un inhibidor específico de p38 anuló este aumento de la apoptosis causado por el celecoxib<sup>197</sup>. Finalmente, ambas quinasas, Akt y p38, interactúan entre sí y con otras proteínas en un dialogo cruzado. Por ejemplo, Kikuchi *et al*<sup>198</sup> demostraron que la inhibición simultánea de las vías de Akt y del factor de transcripción AP-1 resultaba en la expresión aumentada de p27 y el arresto del ciclo celular. En nuestro trabajo observamos una disminución de la activación de AP-1 (Fig. 13E) junto con las ya mencionadas disminución de la fosforilación de Akt (Fig. 14A) y aumento de la apoptosis y del arresto del ciclo celular (Fig. 13C) mediante el tratamiento con celecoxib o DMC.

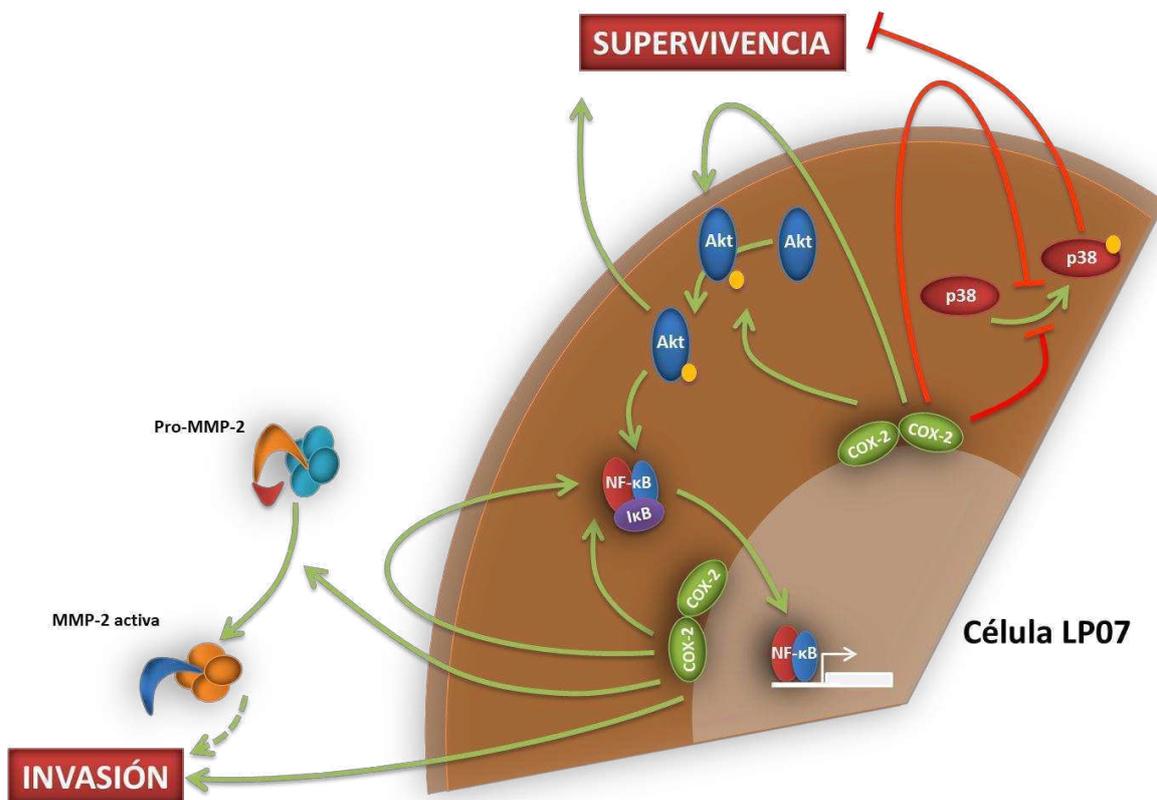
En conjunto, este trabajo demuestra que mecanismos similares subyacen a la inhibición de la progresión tumoral mediante el uso de ciertos AINE o la inhibición de la producción de prostaglandinas y de la expresión de la COX-2. Mientras que la COX-2 es importante para la biología del tumor LP07 su rol es más incierto en la de los tumores de mama LM3 y LMM3. En estos últimos, al menos, la PGE<sub>2</sub> no parece tener el papel preponderante en lo que respecta a la viabilidad y la migración. Por el contrario, en las células LP07, la reducción de la viabilidad mediante la inhibición de la COX-2 parece recaer enteramente en la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub>. Independientemente de estas diferencias, las

vías de Akt, p38 y NF- $\kappa$ B se ven afectadas ya sea por la inhibición de la expresión de la COX-2 o el uso de los AINE (Fig. 15). La modulación de estas vías produce en todas las líneas celulares estudiadas una alteración de la viabilidad celular.

En las líneas de tumores de mama, Akt y p38 también están involucrados en la supervivencia al tratamiento con celecoxib, y son potenciales moduladores de la actividad de NF- $\kappa$ B y AP-1, mientras que p21 y p27 serían responsables del arresto del ciclo celular. Debe aclararse que la utilización del DMC, que no inhibe la COX-2 pero emula los efectos antitumorales del celecoxib, no implica necesariamente una independencia de tales efectos de la inhibición de la COX-2. Tampoco la incapacidad de la PGE<sub>2</sub> de revertir la disminución de la viabilidad anula la posibilidad de que sea otro metabolito de la COX-2 el que asuma ese rol. No obstante, ambas evidencias sugieren fuertemente que los efectos del celecoxib son independientes de la COX-2. Nuevos experimentos inhibiendo la expresión de la enzima con estrategias similares a la utilizada con las células LP07 ayudarán a revelar esta cuestión.

Con respecto al tumor de pulmón LP07, podemos concluir que la expresión y/o productos de la actividad de la COX-2 están involucrados en la activación de Akt. Es probable que estas señales involucren de algún modo a la p38, aunque tal comunicación no resulte probada en este trabajo. Debe dilucidarse el orden jerárquico de las contribuciones respectivas de estos factores a la modulación de la progresión de este modelo de adenocarcinoma de pulmón por parte de la COX-2. Asimismo la COX-2 modula la expresión y/o actividad proteolítica de la MMP-2 y la capacidad invasiva de las células LP07 (Fig. 15).

Resumiendo, hemos determinado que la acción de los AINE inhibió el crecimiento de los tumores y sus metástasis en los modelos estudiados durante el desarrollo de esta tesis. La contribución de la COX-2 a la progresión tumoral se demostró en el tumor de pulmón LP07 mientras que su rol en los modelos de cáncer de mama, aunque no se descarta, es mucho menos destacado. No obstante, parece un blanco molecular interesante para terapias combinadas con otras drogas de uso común en la práctica médica oncológica.



**Fig. 15.** Resumen de resultados obtenidos con la línea celular de adenocarcinoma de pulmón murino LP07. La COX-2 favorece la actividad de Akt y del factor de transcripción NF-κB. Ambos están involucrados en la supervivencia celular. Además inhibe la actividad de la MAPK p38 y de la MMP-2. La PGE<sub>2</sub> sería responsable de estos efectos, actuando de manera autócrina, aunque no pueden descartarse otros mediadores, ya sea de manera autócrina o intracrina.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007;75:56-63.
2. Bilello KS, Murin S, Matthay RA. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002;23:1-25.
3. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:29S-55S.
4. Champagne BM, Sebrie EM, Schargrodsky H, Pramparo P, Boissonnet C, Wilson E. Tobacco smoking in seven Latin American cities: the CARMELA study. *Tob Control* 2010.
5. Loria D, Lence Anta JJ, Guerra Yí ME, Galán Álvarez Y, Barrios Herrera E, Alonso Barbeito R, et al. Tendencia de la mortalidad por cáncer en Argentina, Cuba y Uruguay en un período de 15 años. *Revista Cubana de Salud Pública* 2010;36:0.
6. Thomas L, Kwok Y, Edelman MJ. Management of paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2004;5:51-62.
7. Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Cytokines as mediators and targets for cancer cachexia. *Cancer Treat Res* 2006;130:199-217.
8. Roxburgh CS, McMillan DC. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol* 2010;6:149-63.
9. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003;58:892-900.
10. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* 2003;54:73-87.
11. Zochbauer-Muller S, Gazdar AF, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 2002;64:681-708.
12. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2009;28 Suppl 1:S32-S37.
13. Sun M, Behrens C, Feng L, Ozburn N, Tang X, Yin G, et al. HER family receptor abnormalities in lung cancer brain metastases and corresponding primary tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:4829-37.
14. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1207-17.

15. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;24:2137-50.
16. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
17. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
18. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:47-61.
19. Holstege H, Joosse SA, van Oostrom CT, Nederlof PM, de VA, Jonkers J. High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res* 2009;69:3625-33.
20. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006;295:1379-88.
21. Teschendorff AE, Caldas C. The breast cancer somatic 'muta-ome': tackling the complexity. *Breast Cancer Res* 2009;11:301.
22. Kulinsky VI. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry (Mosc )* 2007;72:595-607.
23. Khatami M. 'Yin and Yang' in inflammation: duality in innate immune cell function and tumorigenesis. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:1461-72.
24. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010.
25. Asquith M, Powrie F. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. *J Exp Med* 2010;207:1573-7.
26. Goldberg JE, Schwertfeger KL. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Curr Drug Targets* 2010;11:1133-46.
27. Kyewski B, Romero P. Chronic inflammation is regarded as a strong promoter of tumorigenesis. *Int J Cancer* 2010;127:747.
28. MacKinnon AC, Kopatz J, Sethi T. The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *Br Med Bull* 2010;95:47-61.
29. Collepriest BJ, Ward SG, Tosh D. How does inflammation cause Barrett's metaplasia? *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:721-6.
30. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 2006;56:69-83.

31. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G7-17.
32. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-45.
33. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.
34. Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 2002;60:78-83.
35. Howe LR. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007;9:210.
36. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:256-69.
37. Whitcomb D, Greer J. Germ-line mutations, pancreatic inflammation, and pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:S29-S34.
38. Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:145-53.
39. Rajput S, Wilber A. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;2:176-83.
40. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007;121:2373-80.
41. Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, et al. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:143-8.
42. Ying L, Marino J, Hussain SP, Khan MA, You S, Hofseth AB, et al. Chronic inflammation promotes retinoblastoma protein hyperphosphorylation and E2F1 activation. *Cancer Res* 2005;65:9132-6.
43. Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res* 1999;59:4516-8.
44. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 2004;14:433-9.
45. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:387-408.
46. Goldberg JE, Schwertfeger KL. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Curr Drug Targets* 2010;11:1133-46.

47. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.
48. Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, et al. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 2010;120:2699-714.
49. Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Kelly MG, Fest S, Visintin I, et al. Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene* 2008;27:4712-23.
50. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr Pharm Des* 2009;15:1949-55.
51. Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle* 2009;8:3267-73.
52. Ancrile BB, O'Hayer KM, Counter CM. Oncogenic ras-induced expression of cytokines: a new target of anti-cancer therapeutics. *Mol Interv* 2008;8:22-7.
53. Degeorge KC, Degeorge BR, Jr., Testa JS, Rothstein JL. Inhibition of oncogene-induced inflammatory chemokines using a farnesyltransferase inhibitor. *J Inflamm (Lond)* 2008;5:3.
54. Zhong L, Roybal J, Chaerkady R, Zhang W, Choi K, Alvarez CA, et al. Identification of secreted proteins that mediate cell-cell interactions in an in vitro model of the lung cancer microenvironment. *Cancer Res* 2008;68:7237-45.
55. Karin M. Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nat Med* 2005;11:20-1.
56. Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:27-39.
57. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer* 2010.
58. Ma X, Kundu N, Ioffe OB, Goloubeva O, Konger R, Baquet C, et al. Prostaglandin E Receptor EP1 Suppresses Breast Cancer Metastasis and Is Linked to Survival Differences and Cancer Disparities. *Mol Cancer Res* 2010.
59. Wang D, DuBois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 2010;29:781-8.
60. Wu YC, Su LJ, Wang HW, Jeff Lin CF, Hsu WH, Chou TY, et al. Co-overexpression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 adversely affects the postoperative survival in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5:1167-74.
61. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol* 2004;5:241.
62. Kulmacz RJ, van der Donk WA, Tsai AL. Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. *Prog Lipid Res* 2003;42:377-404.

63. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S29-S34.
64. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82.
65. Spencer AG, Thuresson E, Otto JC, Song I, Smith T, DeWitt DL, et al. The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis. *J Biol Chem* 1999;274:32936-42.
66. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996;384:644-8.
67. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994;367:243-9.
68. Thuresson ED, Lakkides KM, Rieke CJ, Sun Y, Wingerd BA, Micielli R, et al. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem* 2001;276:10347-57.
69. Wong E, Bayly C, Waterman HL, Riendeau D, Mancini JA. Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 --> Arg and Ile523 --> val mutation. *J Biol Chem* 1997;272:9280-6.
70. Gierse JK, McDonald JJ, Hauser SD, Rangwala SH, Koboldt CM, Seibert K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* 1996;271:15810-4.
71. Habeeb AG, Praveen Rao PN, Knaus EE. Design and synthesis of celecoxib and rofecoxib analogues as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: replacement of sulfonamide and methylsulfonyl pharmacophores by an azido bioisostere. *J Med Chem* 2001;44:3039-42.
72. Kang YJ, Mbonye UR, DeLong CJ, Wada M, Smith WL. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res* 2007;46:108-25.
73. Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, et al. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 1994;221:889-97.
74. Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, et al. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1992;267:25934-8.
75. Xie W, Herschman HR. Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J Biol Chem* 1996;271:31742-8.

76. Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tschlis PN. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J* 2002;21:4831-40.
77. Chen JJ, Huang WC, Chen CC. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in response to proteasome inhibitors involves reactive oxygen species-mediated signaling pathway and recruitment of CCAAT/enhancer-binding protein delta and CREB-binding protein. *Mol Biol Cell* 2005;16:5579-91.
78. Deng WG, Zhu Y, Wu KK. Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood* 2004;103:2135-42.
79. Caivano M, Cohen P. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol* 2000;164:3018-25.
80. Wu MH, Wang CA, Lin CC, Chen LC, Chang WC, Tsai SJ. Distinct regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in normal and endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:286-95.
81. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990;265:16737-40.
82. Masferrer JL, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* 1990;86:1375-9.
83. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157-60.
84. Kurumbail RG, Kiefer JR, Marnett LJ. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol* 2001;11:752-60.
85. Kulmacz RJ, Wang LH. Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995;270:24019-23.
86. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-226.
87. Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol* 2000;83:279-85.
88. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-5.
89. Murakami M, Kudo I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2006;12:943-54.
90. Jachak SM. PGE synthase inhibitors as an alternative to COX-2 inhibitors. *Curr Opin Investig Drugs* 2007;8:411-5.

91. Shi J, Johansson J, Woodling NS, Wang Q, Montine TJ, Andreasson K. The prostaglandin E2 E-prostanoid 4 receptor exerts anti-inflammatory effects in brain innate immunity. *J Immunol* 2010;184:7207-18.
92. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7220-5.
93. Thoren S, Jakobsson PJ. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* 2000;267:6428-34.
94. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000;275:32783-92.
95. Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997;39:1-20.
96. Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001;1:11-21.
97. Fang HY, Lin TS, Lin JP, Wu YC, Chow KC, Wang LS. Cyclooxygenase-2 in human non-small cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:171-7.
98. Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, et al. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:627-37.
99. Miglietta A, Toselli M, Ravarino N, Vencia W, Chiecchio A, Bozzo F, et al. COX-2 expression in human breast carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:655-64.
100. Frasor J, Weaver AE, Pradhan M, Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17beta-estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology* 2008;149:6272-9.
101. Sauter ER, Qin W, Hewett JE, Ruhlen RL, Flynn JT, Rottinghaus G, et al. Celecoxib concentration predicts decrease in prostaglandin E2 concentrations in nipple aspirate fluid from high risk women. *BMC Cancer* 2008;8:49.
102. Zheng Y, Ritzenthaler JD, Sun X, Roman J, Han S. Prostaglandin E2 stimulates human lung carcinoma cell growth through induction of integrin-linked kinase: the involvement of EP4 and Sp1. *Cancer Res* 2009;69:896-904.
103. Benamouzig R, Uzzan B, Martin A, Deyra J, Little J, Girard B, et al. Cyclooxygenase-2 expression and recurrence of colorectal adenomas: effect of aspirin chemoprevention. *Gut* 2010;59:622-9.
104. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep* 2010;62:233-44.

105. Kaltoft N, Tilotta MC, Witte AB, Osbak PS, Poulsen SS, Bindslev N, et al. Prostaglandin E2-induced colonic secretion in patients with and without colorectal neoplasia. *BMC Gastroenterol* 2010;10:9.
106. Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res* 2003;63:728-34.
107. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009;30:377-86.
108. Lee JJ, Natsuizaka M, Ohashi S, Wong GS, Takaoka M, Michaylira CZ, et al. Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis. *Carcinogenesis* 2010;31:427-34.
109. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803-9.
110. Singh B, Cook KR, Vincent L, Hall CS, Berry JA, Multani AS, et al. Cyclooxygenase-2 induces genomic instability, BCL2 expression, doxorubicin resistance, and altered cancer-initiating cell phenotype in MCF7 breast cancer cells. *J Surg Res* 2008;147:240-6.
111. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-6.
112. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276:18563-9.
113. Muller-Decker K, Neufang G, Berger I, Neumann M, Marks F, Furstenberger G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12483-8.
114. Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, et al. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res* 2000;60:4705-8.
115. Funahashi H, Satake M, Dawson D, Huynh NA, Reber HA, Hines OJ, et al. Delayed progression of pancreatic intraepithelial neoplasia in a conditional Kras(G12D) mouse model by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2007;67:7068-71.
116. Nam KT, Hahm KB, Oh SY, Yeo M, Han SU, Ahn B, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide prevents *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer development in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2004;10:8105-13.
117. Narayanan BA, Narayanan NK, Pittman B, Reddy BS. Regression of mouse prostatic intraepithelial neoplasia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Clin Cancer Res* 2004;10:7727-37.

118. Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, et al. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001;61:1733-40.
119. Bai XM, Jiang H, Ding JX, Peng T, Ma J, Wang YH, et al. Prostaglandin E2 upregulates survivin expression via the EP1 receptor in hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci* 2010;86:214-23.
120. Hanaka H, Pawelzik SC, Johnsen JI, Rakonjac M, Terawaki K, Rasmuson A, et al. Microsomal prostaglandin E synthase 1 determines tumor growth in vivo of prostate and lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18757-62.
121. Kaur J, Sanyal SN. PI3-kinase/Wnt association mediates COX-2/PGE(2) pathway to inhibit apoptosis in early stages of colon carcinogenesis: chemoprevention by diclofenac. *Tumour Biol* 2010.
122. Han C, Michalopoulos GK, Wu T. Prostaglandin E2 receptor EP1 transactivates EGFR/MET receptor tyrosine kinases and enhances invasiveness in human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Physiol* 2006;207:261-70.
123. Yang SF, Chen MK, Hsieh YS, Chung TT, Hsieh YH, Lin CW, et al. Prostaglandin E2/EP1 signaling pathway enhances intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and cell motility in oral cancer cells. *J Biol Chem* 2010;285:29808-16.
124. Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2004;31:2-11.
125. Jain S, Chakraborty G, Raja R, Kale S, Kundu GC. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:7750-9.
126. Herfs M, Herman L, Hubert P, Minner F, Arafa M, Roncarati P, et al. High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:603-14.
127. Liu X, Lazenby AJ, Siegal GP. Signal transduction cross-talk during colorectal tumorigenesis. *Adv Anat Pathol* 2006;13:270-4.
128. Bulun SE, Lin Z, Zhao H, Lu M, Amin S, Reierstad S, et al. Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1155:121-31.
129. Subbaramaiah K, Hudis C, Chang SH, Hla T, Dannenberg AJ. EP2 and EP4 receptors regulate aromatase expression in human adipocytes and breast cancer cells. Evidence of a BRCA1 and p300 exchange. *J Biol Chem* 2008;283:3433-44.
130. Yamaki T, Endoh K, Miyahara M, Nagamine I, Thi Thu HN, Sakurai H, et al. Prostaglandin E2 activates Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP3. *Cancer Lett* 2004;214:115-20.
131. Yano T, Zissel G, Muller-Qernheim J, Jae SS, Satoh H, Ichikawa T. Prostaglandin E2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP3. *FEBS Lett* 2002;518:154-8.

132. Fujino H, Toyomura K, Chen XB, Regan JW, Murayama T. Prostaglandin E(2) Regulates Cellular Migration via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in HCA-7 Human Colon Cancer Cells. *Biochem Pharmacol* 2010.
133. Katoh H, Hosono K, Ito Y, Suzuki T, Ogawa Y, Kubo H, et al. COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine systems. *Am J Pathol* 2010;176:1469-83.
134. Taniguchi T, Fujino H, Israel DD, Regan JW, Murayama T. Human EP3(I) prostanoid receptor induces VEGF and VEGF receptor-1 mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:1173-8.
135. Brouxhon S, Kyrkanides S, O'Banion MK, Johnson R, Pearce DA, Centola GM, et al. Sequential down-regulation of E-cadherin with squamous cell carcinoma progression: loss of E-cadherin via a prostaglandin E2-EP2 dependent posttranslational mechanism. *Cancer Res* 2007;67:7654-64.
136. Dohadwala M, Yang SC, Luo J, Sharma S, Batra RK, Huang M, et al. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:5338-45.
137. Kim JI, Lakshmikanthan V, Frilot N, Daaka Y. Prostaglandin E2 promotes lung cancer cell migration via EP4-betaArrestin1-c-Src signalsome. *Mol Cancer Res* 2010;8:569-77.
138. Amano H, Ito Y, Suzuki T, Kato S, Matsui Y, Ogawa F, et al. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis. *Cancer Sci* 2009;100:2318-24.
139. Ito H, Duxbury M, Benoit E, Clancy TE, Zinner MJ, Ashley SW, et al. Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 2004;64:7439-46.
140. Urtreger AJ, Diament MJ, Ranuncolo SM, Del C, V, Puricelli LI, Klein SM, et al. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. *Int J Oncol* 2001;18:639-47.
141. Daroqui MC, Puricelli LI, Urtreger AJ, Elizalde PV, Lanuza GM, Bal de Kier JE. Involvement of TGF-beta(s)/T(beta)Rs system in tumor progression of murine mammary adenocarcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:287-301.
142. Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* 2010;16:34-44.
143. Xu CX, Jin H, Shin JY, Kim JE, Cho MH. Roles of protein kinase B/Akt in lung cancer. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010;2:1472-84.
144. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 2010;429:403-17.
145. Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M. The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:235-56.

146. Diament MJ, Garcia C, Stillitani I, Saavedra VM, Manzur T, Vauthay L, et al. Spontaneous murine lung adenocarcinoma (P07): A new experimental model to study paraneoplastic syndromes of lung cancer. *Int J Mol Med* 1998;2:45-50.
147. Diament MJ, Garcia C, Parma M, Mondelo N, Stillitani I, Klein S. Immune reactivity during the growth of a murine lung adenocarcinoma: evaluation of paraneoplastic syndrome development. *Oncol Rep* 2001;8:1165-70.
148. Parma M, Diament M, Garcia C, Piccinni E, Mondelo N, Klein S. Mechanisms of paraneoplastic syndromes in mice bearing a spontaneous lung adenocarcinoma. *Tumour Biol* 1999;20:304-11.
149. Coghill AE, Newcomb PA, Campbell PT, Burnett-Hartman AN, Adams SV, Poole EM, et al. Prediagnostic non-steroidal anti-inflammatory drug use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *Gut* 2010.
150. Iwama T. NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 19:72-6.
151. Lanas A, Ferrandez A. NSAIDs and the colon. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:44-9.
152. Ashok V, Dash C, Rohan TE, Sprafka JM, Terry PD. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk. *Breast* 2010.
153. Che SM, Zhang XZ, Hou L, Song TB. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances radiosensitivity of radioresistant esophageal cancer cells by inhibiting AKT activation and inducing apoptosis. *Cancer Invest* 2010;28:679-88.
154. Bradley MC, Hughes CM, Cantwell MM, Napolitano G, Murray LJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Br J Cancer* 2010;102:1415-21.
155. Tang JY, Aszterbaum M, Athar M, Barsanti F, Cappola C, Estevez N, et al. Basal cell carcinoma chemoprevention with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in genetically predisposed PTCH1<sup>+/-</sup> humans and mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3:25-34.
156. Deans C, Wigmore SJ. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:265-9.
157. Mantovani G, Madeddu C. Cyclooxygenase-2 inhibitors and antioxidants in the treatment of cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 2008;2:275-81.
158. Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2000;6:2006-11.
159. Howe LR, Dannenberg AJ. A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. *Semin Oncol* 2002;29:111-9.
160. Moody TW, Leyton J, Zakowicz H, Hida T, Kang Y, Jakowlew S, et al. Indomethacin reduces lung adenoma number in A/J mice. *Anticancer Res* 2001;21:1749-55.

161. Davis TW, Zweifel BS, O'Neal JM, Heuvelman DM, Abegg AL, Hendrich TO, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:929-34.
162. Mantovani G, Madeddu C, Maccio A, Gramignano G, Lusso MR, Massa E, et al. Cancer-related anorexia/cachexia syndrome and oxidative stress: an innovative approach beyond current treatment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1651-9.
163. Wang W, Andersson M, Lonroth C, Svanberg E, Lundholm K. Anorexia and cachexia in prostaglandin EP1 and EP3 subtype receptor knockout mice bearing a tumor with high intrinsic PGE2 production and prostaglandin related cachexia. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24:99-107.
164. Lin CC, Lee IT, Yang YL, Lee CW, Kou YR, Yang CM. Induction of COX-2/PGE(2)/IL-6 is crucial for cigarette smoke extract-induced airway inflammation: Role of TLR4-dependent NADPH oxidase activation. *Free Radic Biol Med* 2010;48:240-54.
165. Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappaB activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:C1445-C1456.
166. Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 2006;101:189-98.
167. Nazarenko I, Marhaba R, Reich E, Voronov E, Vitacolonna M, Hildebrand D, et al. Tumorigenicity of IL-1alpha- and IL-1beta-deficient fibrosarcoma cells. *Neoplasia* 2008;10:549-62.
168. Zhang D, Zheng H, Zhou Y, Tang X, Yu B, Li J. Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer* 2007;7:45.
169. Cheng CY, Hsieh HL, Sun CC, Lin CC, Luo SF, Yang CM. IL-1 beta induces urokinase-plasminogen activator expression and cell migration through PKC alpha, JNK1/2, and NF-kappaB in A549 cells. *J Cell Physiol* 2009;219:183-93.
170. Roy D, Sarkar S, Felty Q. Levels of IL-1 beta control stimulatory/inhibitory growth of cancer cells. *Front Biosci* 2006;11:889-98.
171. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2645-50.
172. Diamant MJ, Peluffo GD, Stillitani I, Cerchietti LC, Navigante A, Ranuncolo SM, et al. Inhibition of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in a murine lung adenocarcinoma by medroxyprogesterone acetate and indomethacin. *Cancer Invest* 2006;24:126-31.
173. Cerchietti LC, Navigante AH, Peluffo GD, Diamant MJ, Stillitani I, Klein SA, et al. Effects of celecoxib, medroxyprogesterone, and dietary intervention on systemic syndromes in patients with advanced lung adenocarcinoma: a pilot study. *J Pain Symptom Manage* 2004;27:85-95.

174. Eli Y, Przeddecki F, Levin G, Kariv N, Raz A. Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 2001;61:565-71.
175. Kisley LR, Barrett BS, Dwyer-Nield LD, Bauer AK, Thompson DC, Malkinson AM. Celecoxib reduces pulmonary inflammation but not lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* 2002;23:1653-60.
176. Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004;64:1369-76.
177. Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, et al. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 2005;11:1999-2007.
178. Schiffmann S, Maier TJ, Wobst I, Janssen A, Corban-Wilhelm H, Angioni C, et al. The anti-proliferative potency of celecoxib is not a class effect of coxibs. *Biochem Pharmacol* 2008;76:179-87.
179. Zhang X, Morham SG, Langenbach R, Young DA. Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts. *J Exp Med* 1999;190:451-9.
180. Schonthal AH, Chen TC, Hofman FM, Louie SG, Petasis NA. Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:197-208.
181. Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 2001;93:497-506.
182. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2000;60:4629-37.
183. Lee EJ, Choi EM, Kim SR, Park JH, Kim H, Ha KS, et al. Cyclooxygenase-2 promotes cell proliferation, migration and invasion in U2OS human osteosarcoma cells. *Exp Mol Med* 2007;39:469-76.
184. Leung E, McArthur D, Morris A, Williams N. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents migration of colorectal cancer cells to extracellular matrix by down-regulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Dis Colon Rectum* 2008;51:342-7.
185. Redpath M, Marques CM, Dibden C, Waddon A, Lalla R, Macneil S. Ibuprofen and hydrogel-released ibuprofen in the reduction of inflammation-induced migration in melanoma cells. *Br J Dermatol* 2009;161:25-33.

186. Kwak YE, Jeon NK, Kim J, Lee EJ. The cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib suppresses proliferation and invasiveness in the human oral squamous carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1095:99-112.
187. Kurihara Y, Hatori M, Ando Y, Ito D, Toyoshima T, Tanaka M, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 production and activation. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:425-32.
188. Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, Rao JS. MMP-2 alters VEGF expression via alphaVbeta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *Int J Cancer* 2010;127:1081-95.
189. Du R, Petritsch C, Lu K, Liu P, Haller A, Ganss R, et al. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro Oncol* 2008;10:254-64.
190. Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, Phillips J, Gallo E, Yu Y, et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. *Cancer Res* 2010;70:2224-34.
191. Crowell JA, Steele VE, Fay JR. Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2139-48.
192. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009;102:19-65.
193. Karin M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog* 2006;45:355-61.
194. Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, et al. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2007;39:750-8.
195. Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001;15:2742-4.
196. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R422-R435.
197. Hsiao PW, Chang CC, Liu HF, Tsai CM, Chiu TH, Chao JI. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by celecoxib oppositely regulates survivin and gamma-H2AX in human colorectal cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;222:97-104.
198. Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Oizumi S, Nishimura M, Birrer MJ, et al. Simultaneous blockade of AP-1 and phosphatidylinositol 3-kinase pathway in non-small cell lung cancer cells. *Br J Cancer* 2008;99:2013-9.

# PARTE II

# INTRODUCCIÓN

## El carcinoma ductal *in situ* de mama

La carcinogénesis mamaria es un proceso secuencial a través de etapas clínicas y patológicas definidas, comenzando con la hiperproliferación ductal, la progresión hacia el carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y luego invasivo (CDI), y culminando con la diseminación metastásica<sup>1, 2</sup>. El CDIS frecuentemente coexiste con lesiones invasivas y recurre como tumor invasivo en el sitio original, lo que sustenta su consideración como el potencial precursor del carcinoma ductal invasivo. La comprensión de la patofisiología del CDIS a nivel molecular puede conllevar el desarrollo de nuevas terapias que disminuyan la incidencia de carcinomas invasivos potencialmente letales. Parte del atraso y la dificultad en el análisis de tumores de mama preinvasivos, incluyendo el CDIS, se ha debido a la falta de técnicas apropiadas para el estudio de tumores pequeños, frecuentemente microscópicos. El desarrollo de tecnologías como los microarreglos de ADN, y el análisis serial de la expresión génica, han hecho posible obtener perfiles de expresión génica de carcinomas mamarios en todas sus etapas<sup>3</sup>.

## El estroma tumoral

Los tejidos epiteliales son estructuras multicelulares, tridimensionales, que interactúan dinámicamente, en el contexto de una red proteica, la matriz extracelular, con múltiples tipos celulares como fibroblastos, adipocitos, células infiltrantes del sistema inmunitario y células endoteliales. La fidelidad del desarrollo tisular, la remodelación de los tejidos adultos y la homeostasis tisular dependen del estricto mantenimiento de un diálogo espacial y temporal complejo entre el epitelio y el estroma. La perturbación de estas interacciones epitelio-estromales resulta en la pérdida de dicha homeostasis tisular y la inducción de patologías como el cáncer<sup>4, 5</sup>. Se ha propuesto que el microambiente es un modificador epigenético del tumor, que puede regular positiva o negativamente el comportamiento maligno de las células genéticamente aberrantes que lo conforman<sup>4</sup>.

El rol del microambiente en la preparación de un terreno fértil para el crecimiento tumoral fue identificado hacia fines del siglo XIX por Paget<sup>6</sup>. El descubrimiento de virus tumorales, oncogenes y genes supresores de tumor en el siglo siguiente relegó estos primeros estudios, en la búsqueda de mecanismos celulares autónomos de iniciación, progresión y metástasis. En la última década, la visión de la tumorigénesis enfocada exclusivamente en el epitelio ha sido lentamente suplantada por otra que involucra al microambiente tisular. En esta concepción, la patogénesis tumoral es vista como un fenómeno ligado a alteraciones de las interacciones epitelio-estromales. Tal como la función de un órgano normal está determinada por la comunicación recíproca entre las células del epitelio y el estroma circundante, el mismo principio organizativo se aplica al

cáncer, y la progresión desde una metaplasia hasta la transformación maligna, puede ser caracterizada por el incremento de la comunicación anormal entre las células que comprenden el tumor y su microambiente. El tumor responde a estas interacciones cambiantes, y a medida que evoluciona, adquiere nutrientes y evade los mecanismos antitumorales, invadiendo eventualmente tejidos vecinos. En los modelos tradicionales, estos cambios se asumían como resultado único de defectos preexistentes o adquiridos en el núcleo de células epiteliales. La identificación de cambios en la expresión genética y alteraciones epigenéticas en todos los tipos celulares estromales durante la progresión del cáncer de mama, y el hallazgo de que el sustrato genético del hospedador influencia el comportamiento metastásico, sugiere que la tumorigénesis es un “esfuerzo de equipo”<sup>4</sup>. Para identificar cambios moleculares en el microambiente celular, Allinen *et al* purificaron y analizaron todos los tipos celulares (epiteliales, mioepiteliales, endoteliales fibroblastos, miofibroblastos y leucocitos infiltrantes) de tejido mamario normal y de carcinomas in situ invasivos y concluyeron que los cambios en la expresión génica ocurren en todos los tipos celulares durante la progresión del cáncer de mama, pero los cambios seleccionados de manera clónica son solo observados en las células tumorales epiteliales<sup>7</sup>.

El fibroblasto es el principal tipo celular del estroma y está íntimamente comprometido en el mencionado diálogo con el epitelio para el mantenimiento de la homeostasis tisular<sup>8, 9</sup>. La primera evidencia de que los fibroblastos y su medio circundante pueden alterar sus propiedades durante el desarrollo tumoral provino de la observación de los patólogos. La proliferación de los fibroblastos, el aumento de la presencia de colágeno en la vecindad de las células tumorales y la expresión *de novo* de actina  $\alpha$  de músculo liso, indicaban un cambio en el estado de reposo, denominado desmoplasia<sup>10-13</sup>. La reacción desmoplásica es común a muchos tumores sólidos incluidos los de mama, próstata, pulmón y colon, siendo acompañada, en algunos casos, por el reclutamiento de células inflamatorias<sup>14</sup>.

El advenimiento de medios efectivos para separar células estromales y epiteliales y recombinarlas in vivo o en cultivo, constituyó una herramienta invaluable para diseccionar las contribuciones de cada linaje a la transformación maligna. Mediante experimentos de coinoculación de fibroblastos transformados en ratones atímicos, se demostró que éstos estimulan la tumorigenicidad de una serie de líneas celulares tumorales humanas de diferentes tejidos<sup>15, 16</sup>. Por otra parte, fibroblastos aislados del estroma tumoral reactivo tuvieron la capacidad de transformar células epiteliales prostáticas no malignas<sup>17</sup>. Células netamente tumorales pueden expresar nuevamente un fenotipo normal, y tejidos normales desarrollar tumores epiteliales por alteraciones en el microambiente y el estroma<sup>18</sup>.

## La COX-2 y el CDIS

Aunque estos experimentos demostraron claramente que el diálogo entre el epitelio y el estroma tiene un papel crítico en el desarrollo neoplásico, el lenguaje de esa comunicación no ha sido descifrado, incluyendo la identidad de las moléculas de señalización paracrinas que son parte constituyente, en parte debido a su complejidad y redundancia. Un gran número de factores secretados por múltiples tipos celulares pueden estar asociados a los mismos efectos, lo cual implica un desafío cuando se intenta identificar blancos terapéuticos

Muchos trabajos que analizan las interacciones epitelio-estromales han estudiado las citoquinas y quimioquinas como mediadores potenciales de ese diálogo<sup>19, 20</sup>, mientras que no ha ocurrido lo mismo con la señalización por mediadores lipídicos como las prostaglandinas. La COX-2 emerge como un biomarcador importante y es un blanco experimental para el tratamiento de algunos tumores sólidos. El papel potencial de esta enzima en los estadios preinvasivos de la tumorigénesis mamaria se ha estudiado abundantemente debido al resultado de estudios epidemiológicos en humanos que relacionan el uso de AINE con un menor riesgo de cáncer de mama<sup>21</sup>. El análisis de la expresión de COX-2 en el CDIS, en combinación con otros marcadores como p16 y Ki67, demostró su asociación con el subsecuente comportamiento del tumor, y su utilidad como factor predictor del riesgo de recurrencia invasiva<sup>22</sup>. De acuerdo con esta observación, un estudio ha reportado que la expresión de COX-2 en la hiperplasia epitelial atípica correlacionó con el subsecuente desarrollo de cáncer de mama, e identificó a la COX-2 como un biomarcador potencial para la predicción del riesgo y la selección de pacientes para estudios de quimioprevención<sup>23</sup>. En otro estudio se detectó expresión de COX-2 en un 85% de los especímenes de CDIS, correlacionando la mayor expresión con un mayor grado nuclear<sup>24</sup>. Los CDIS adyacentes a tumores invasivos expresan altos niveles de COX-2, mayores a los del tejido invasivo, sugiriendo que la expresión de la misma puede ser un evento temprano en la carcinogénesis mamaria<sup>25</sup>.

Mediante el análisis del perfil molecular de tumores humanos y experimentos con modelos de CDIS se han identificado grandes cambios en la expresión génica y los perfiles epigenéticos de cada tipo celular de los que componen el microambiente tumoral<sup>26</sup>. Estos estudios demostraron la importancia de las interacciones epitelio-estromales en la progresión del CDIS. El rol del microambiente en la inducción y mantenimiento de la expresión de COX-2 en lesiones preinvasivas de la mama como el CDIS no ha sido estudiado extensamente. En este trabajo, investigamos si la COX-2 es un mediador potencial de estas interacciones celulares que promueven el crecimiento y la progresión de tumores *in situ*, utilizando un modelo de xenotrasplante de CDIS humano.

# OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el potencial papel mediador de la COX-2 en las interacciones celulares entre el epitelio y el estroma que promueva la transición del carcinoma ductal *in situ* de mama a carcinoma invasivo.

Para tal fin se utilizó un modelo de células tumorales humanas, MCF10DCIS.com (MCFDCIS en adelante) que cuando es trasplantado en ratones atímicos reproduce aspectos fundamentales de la progresión de los tumores humanos de tipo basal, y como tal podía ser usado para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la transición de *in situ* a carcinoma invasivo<sup>27</sup>. La inoculación de células MCFDCIS con fibroblastos normales, tumorales o provenientes de sinovios de pacientes con artritis reumática (AR), promovió la transición de los tumores *in situ* a invasivos. Los cambios más notables se produjeron con los fibroblastos de AR. El fibroblasto es el tipo celular predominante en el microambiente tumoral<sup>28</sup>. La AR es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por un desorden del microambiente sinovial. Los fibroblastos de AR proveen un ejemplo del papel de las células estromales en la persistencia de la inflamación. Además, expresan un fenotipo que es estable en condiciones de cultivo *in vitro*<sup>29, 30</sup>. Por estas razones se decidió utilizar un modelo de co-cultivos *in vitro* de células MCFDCIS y fibroblastos de AR (RASf) para investigar las interacciones entre el epitelio y el estroma en la progresión del CDIS.

Los objetivos específicos fueron:

- La reproducción *in vitro* de los resultados observados con la coinoculación *in vivo* de las células MCFDCIS y RASf. Para ello se realizaron cultivos en 2 y 3 dimensiones para evaluar el crecimiento celular, la motilidad y la capacidad invasiva de las células MCFDCIS.
- El análisis del papel de la COX-2 en estas interacciones entre células MCFDCIS y RASf, mediante la inhibición de su actividad y el silenciamiento de su expresión.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cultivos celulares

Las células MCF10DCIS.com se cultivaron en DMEM/F12 con 5% de suero de caballo, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina, 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de hidrocortisona, 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de toxina colérica, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), L-glutamina 2 mM y penicilina y estreptomocina. Los fibroblastos de artritis reumática se cultivaron en DMEM con 10% de suero de ternero fortificado con hierro.

Los co-cultivos de ambos tipos celulares para el aislamiento de ARN se realizaron de la siguiente manera: se sembraron  $3 \times 10^5$  fibroblastos en placas de 100 mm en DMEM suplementado con 10% de SFB y se incubaron durante 24 h. Luego se sembraron  $1 \times 10^5$  células MCFDCIS sobre estas placas y los co-cultivos se mantuvieron por 48 h en el medio de cultivo de estos últimos. Las células MCFDCIS se obtuvieron a partir de los co-cultivos mediante el uso de perlas magnéticas conjugadas a un anticuerpo (CELLlection™ Epithelial Enrich, Invitrogen) específico para dos antígenos (glicoproteínas de la membrana) expresada en la mayoría de las células epiteliales humanas, normales o tumorales. Asimismo, se realizó una selección negativa, mediante la exclusión de los fibroblastos con la utilización del kit CELLlection Pan Mouse IgG Kit (Invitrogen) y el anticuerpo IB10 (Sigma-Aldrich).

Para la obtención de medios condicionados se utilizó el mismo procedimiento que para el aislamiento de ARN, pero adaptado a placas de 35 mm. Luego de 48 h de co-cultivo, las placas se lavaron tres veces con PBS y se agregó DMEM/F12 sin aditivos. Los co-cultivos se incubaron por otras 24 h y entonces se recolectaron los medios condicionados, se centrifugaron para eliminar desechos celulares y fueron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para los cultivos en 3D cada pocillo de una placa de 24 se recubrió con 100  $\mu\text{l}$  de Matrigel (BD Biosciences). Luego de la gelificación, se sembraron  $5 \times 10^3$  células MCFDCIS junto o no con  $15 \times 10^3$  fibroblastos en DMEM/F12 preparado con una concentración doble a la habitual, suplementado también con una concentración doble de aditivos (sin hidrocortisona), y el agregado de un volumen igual de Matrigel. Una vez solidificado, se agregó medio de cultivo (en la concentración habitual, propia y de suplementos, sin hidrocortisona) sobre el Matrigel. Los cultivos se incubaron en condiciones estándar. Cuando fue necesario recuperar las colonias, los cultivos fueron tratados con dispasa y lavados exhaustivamente con PBS frío para eliminar el Matrigel.

## Drogas

El celecoxib (RTK Laboratories) y el éster fenetilo del ácido cafeico (Sigma-Aldrich) se disolvieron en DMSO, el cuál se mantuvo en una concentración de 0,1% en los cultivos.

## Purificación del ARN, retrotranscripción y qPCR

La extracción del ARN se realizó mediante la utilización del kit *RNeasy Mini* (Qiagen) y las columnas *QIAshredder* (Qiagen). El ADNc se obtuvo mediante el uso del kit Omniscript RT (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de RCP cuantitativa se utilizaron maquinas ABI 7500 QPCR con el reactivo *ABI SYBR Green PCR Master Mix* según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Las condiciones de ciclado fueron: 8 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95°C más 1 min a 58,5°C. El número de copias relativo entre los distintos tratamientos se calculó por el método de comparación de los  $C_t$ , usándose como control para la normalización la proteína ribosómica L39 (RPL39). Las secuencias de los *primers* se detallan en la Tabla 1.

| <i>Primers para:</i> | Directo                 | Reverso                 |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>PTGS2</i>         | TGAGCATCTACGGTTTGCTG    | TGCTTGTCTGGAACAACCTGC   |
| <i>MMP9</i>          | CTACCACCTCGAACTTTGACAGC | CATTCACGTCGTCCTTATGCAAG |
| <i>MMP14</i>         | CATGCAGAAGTTTACGGCTTG   | TAGCGCTTCCTTCGAACATTG   |
| <i>RPL39</i>         | CAGCTCCCTCCTCTCTCTT     | GCCAGGAATCGCTTAATCC     |

Tabla 1. Secuencias de los *primers* utilizados para las PCR cuantitativas

## Ensayos de gen reportero

Se sembraron  $2,1 \times 10^4$  fibroblastos en placas de 24 pocillos. El mismo día se transfectaron las células MCFDCIS, mediante Lipofectamine2000 (Invitrogen), con un plásmido reportero con el gen de la luciferasa de *P. pyralis* bajo el control de un promotor que contenía elementos repetidos de respuesta al factor NF- $\kappa$ B y otro plásmido con el gen de la luciferasa de *Renilla*. El día siguiente,  $7 \times 10^3$  de estas células transfectadas se sembraron en cada pocillo de la placa que contenía los fibroblastos o en pocillos vacíos. Se incubaron las placas durante 24 h y se procedió a determinar la actividad de ambas luciferasas mediante el uso de los reactivos del kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

## Zimografías

Los medios condicionados, estandarizados sus volúmenes de acuerdo a la cuantificación de la proteína celular, se sembraron en condiciones no reductoras y se resolvieron en geles de 10% de acrilamida [Novex 10% Zymogram (Gelatin) Gel, Invitrogen] con 0,1% de gelatina. Se realizó la corrida electroforética en búfer Tris-Glicina-SDS. Posteriormente se eliminó el SDS con un lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación

suave, con el búfer de re-naturalización Novex (Invitrogen). Luego se incubaron los geles a 37°C en el búfer de desarrollo Novex (Invitrogen) durante 36 h. Se tiñeron los geles con una solución de 0,1% de azul de Coomassie en 40% de etanol y 10% de ácido acético y se destiñeron con una solución de 10% de etanol y 7,5% de ácido acético. Se midió la densidad de las bandas claras correspondientes a la actividad lítica sobre la gelatina.

### Invasión y migración

Se ensayó la capacidad invasiva y la motilidad usando las cámaras BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers y BD Falcon™ Cell Culture Insert Companion Plates (BD Biosciences), respectivamente (diámetro del inserto: 6,5 mm, poro: 8 µm). Las células MCFDCIS se cargaron con el colorante fluorescente CellTracker™ Green CMF-DA (Invitrogen). Se suspendieron  $1 \times 10^4$  células MCFDCIS solas o junto con  $2 \times 10^4$  fibroblastos en 0,5ml de DMEM/F12 sin SFB y se sembraron en el compartimiento superior de la cámara. Se agregaron 0,75ml de DMEM/F12 suplementado con 20% de SFB como quimioattractante en el compartimiento inferior. Luego de una incubación de 36h en condiciones estándar, se lavaron los filtros con PBS y se removieron las células en la cara superior por medio de un hisopo húmedo. Se fijaron las células en la superficie inferior con solución de Carnoy a temperatura ambiente. Se tiñeron los núcleos con DAPI. Las células verdes se contaron bajo un aumento x100 usando un microscopio invertido. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió al menos dos veces.

# RESULTADOS

## Interacciones entre el epitelio y el estroma en modelos de cultivos celulares

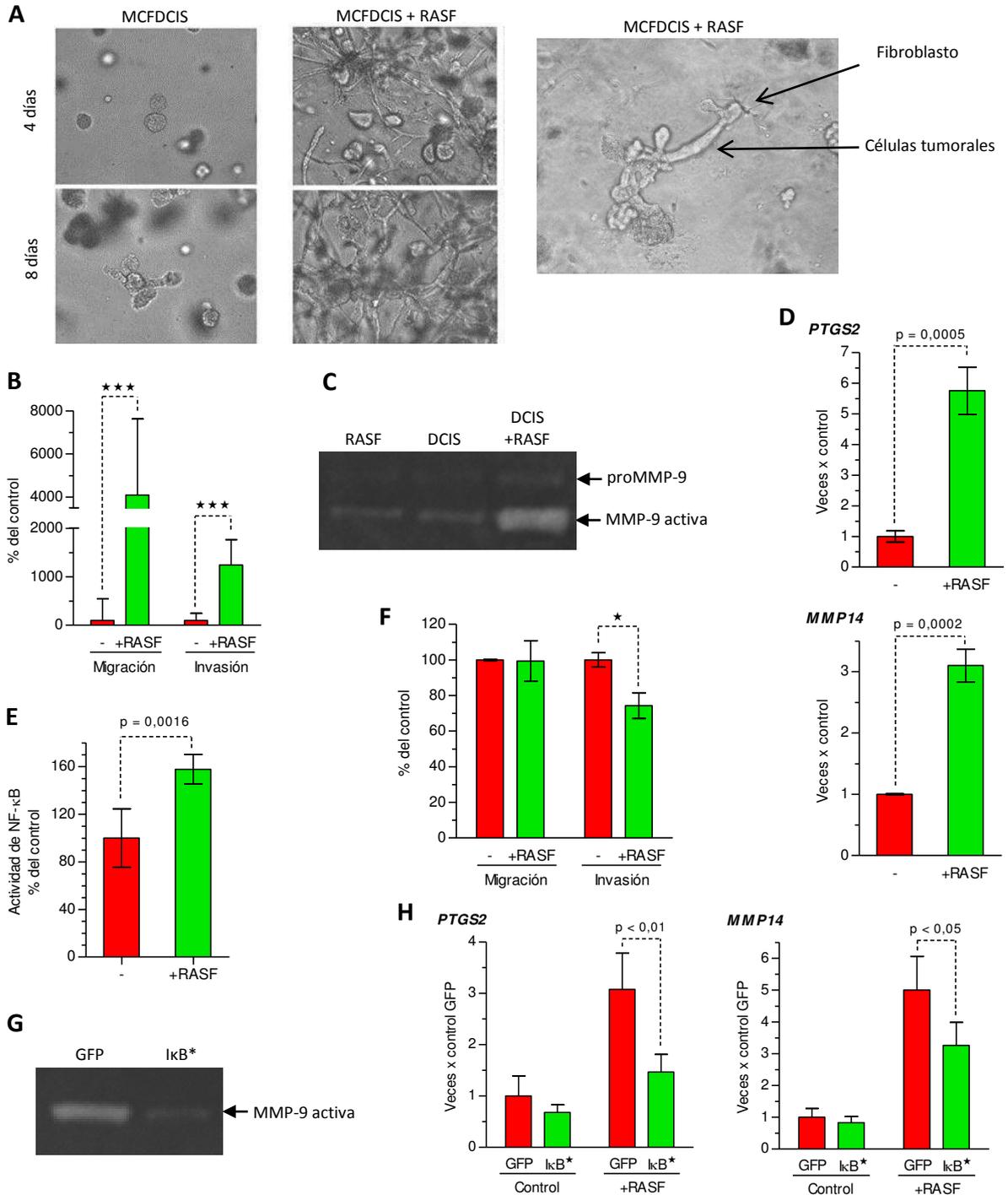
Para tratar de descifrar qué mecanismos moleculares subyacen a las interacciones entre las células tumorales epiteliales MCFDCIS y los fibroblastos, y su papel en la progresión hacia el carcinoma invasivo, se desarrollaron cocultivos en dos y tres dimensiones (2D y 3D, respectivamente) que incluían a los dos tipos celulares. El cocultivo con fibroblastos en Matrigel resultó en un crecimiento invasivo de las células MCFDCIS, con ramificaciones a partir de los esferoides, en cuyos extremos distales se podían observar, en la mayoría de los casos, uno o más fibroblastos (Fig. 1A).

Se hicieron ensayos de invasión *in vitro* para cuantificar el efecto pro-invasivo de los fibroblastos sobre las células MCFDCIS, las cuales fueron cargadas con un colorante fluorescente para permitir la discriminación entre ambos tipos celulares. Estos ensayos demostraron que los fibroblastos incrementaron significativamente la motilidad y la invasión de las células MCFDCIS a través del Matrigel (Fig. 1B). Este efecto no requirió del contacto directo entre los dos tipos celulares dado que con la presencia de medio condicionado de los fibroblastos en lugar de las células se observó esencialmente el mismo resultado (datos no mostrados). De acuerdo con esto, cuando se analizó el medio condicionado de los cocultivos mediante zimografías con gelatina como sustrato, se detectó un aumento de la actividad de la metaloproteasa-9 (MMP-9), comparado con los medios condicionados de cultivos de células MCFDCIS solamente (Fig. 1C).

Se estudiaron las alteraciones en la expresión de genes en las células MCFDCIS que pudieran acompañar los cambios fenotípicos inducidos por los fibroblastos, mediante qPCR. De esta manera se detectaron cambios en la expresión de los ARNm de la COX-2 y la MMP-14 en las células MCFDCIS recuperadas de cocultivos en 2D con fibroblastos de AR (Fig. 1D). No se pudieron observar cambios en la expresión de la MMP-9, a pesar de detectar el mencionado aumento de su actividad en los cocultivos. La cuantificación de los niveles de ARNm de la COX-2 y la MMP-14 y la MMP-9 en las células MCFDCIS recuperadas de las colonias crecidas en Matrigel, produjo los mismos resultados (datos no mostrados).

## El factor NF- $\kappa$ B y las interacciones entre epitelio y estroma en el CDIS

Ensayos preliminares sobre medios condicionados de fibroblastos de AR y de células mioepiteliales HME, que antagonizan los efectos de los fibroblastos en cuanto al cambio fenotípico de las células MCFDCIS, habían demostrado niveles mayores de distintas



**Fig. 1.** Efecto del cocultivo con fibroblastos de AR sobre las células MCFDCIS. A) Morfología de las células MCFDCIS cultivadas en presencia o no de fibroblastos de AR durante 4 y 8 días incluidas en Matrigel. Los fibroblastos promovieron la invasividad de las células tumorales. En numerosas colonias observadas en los cocultivos se apreciaban fibroblastos liderando el extremo invasor de las colonias de células MCFDCIS. B) El cocultivo con células RASF aumentó significativamente la migración y la invasión de las células MCFDCIS. C) Actividad gelatinolítica de la MMP-9 detectada en zimogramas, utilizando medios condicionados de células MCFDCIS cocultivadas o no con RASF. D) Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de la expresión de los genes *PTGS2* (*COX-2*) y *MMP14* en las células MCFDCIS cocultivadas o no con RASF; el eje y indica los niveles de ARNm normalizados al control *RPL39*. E) Activación del NF-κB en las células MCFDCIS por el cocultivo con RASF; el eje y indica como porcentaje del control, la actividad de la luciferasa de *P. pyralis* dependiente del NF-κB, relativizada a la actividad de la luciferasa de *Renilla*. F) La expresión del IκB\* en las células MCFDCIS atenuó el incremento de su invasividad inducida por los RASF, sin alterar la motilidad. G) La actividad de la MMP-9 inducida por el cocultivo con RASF disminuyó con la expresión del IκB\* en las células MCFDCIS. Se utilizaron células infectadas con adenovirus que codificaban la GFP como controles. H) La expresión del IκB\* en las células MCFDCIS atenuó el aumento de los niveles del ARNm de *PTGS2* y *MMP14* inducido por el cocultivo con RASF. En todos los casos, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

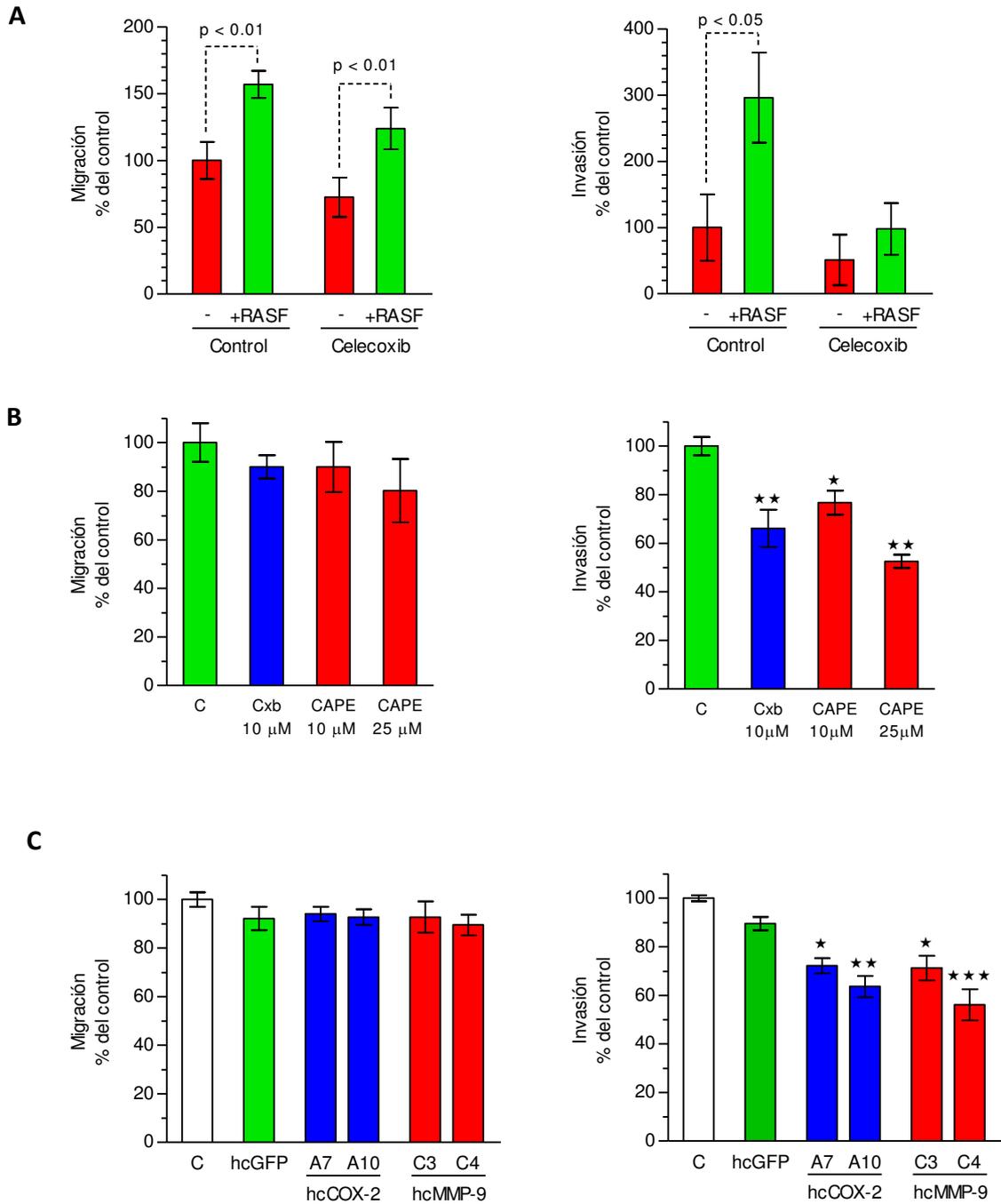
citoquinas liberadas por los fibroblastos en comparación a las células mioepiteliales. Dado que la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B está regulada por varias citoquinas, se determinó dicha actividad en las células MCFDCIS cocultivadas con fibroblastos o con medio condicionado de los mismos por medio de ensayos de gen reportero. Se encontró un aumento de la actividad de NF- $\kappa$ B en ambas condiciones comparadas con el cultivo de células MCFDCIS solas o sin medio condicionado (Fig. 1E).

Luego determinamos si la activación de NF- $\kappa$ B es necesaria para los efectos estimulatorios de la capacidad invasiva de las células MCFDCIS exhibidos por los fibroblastos. Para esto se expresó, en las células tumorales, una versión mutada del inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, que actúa como súper-represor de su actividad. Las células MCFDCIS que portaban este I $\kappa$ B mutado demostraron una capacidad invasiva disminuida a través del Matrigel cuando fueron cocultivadas con fibroblastos de AR, aunque su motilidad no fue disminuida (Fig. 1F). Esta reducción de la invasión fue acompañada por una disminución de la actividad de MMP-9 en medios condicionados de células MCFDCIS que portaban el I $\kappa$ B cuando fueron cocultivadas con fibroblastos (Fig 1G). La expresión de este I $\kappa$ B mutado también redujo, aunque no eliminó el aumento en la expresión de COX-2 y MMP-14 en las células MCFDCIS cocultivadas con fibroblastos (Fig. 1H).

### **Inhibición de la COX-2 y el NF- $\kappa$ B**

Se analizaron las consecuencias de la inhibición farmacológica de la actividad de la COX-2 y el NF- $\kappa$ B sobre los efectos de los fibroblastos promotores de la invasión de las células MCFDCIS. El celecoxib, inhibidor selectivo de la COX-2 redujo significativamente la capacidad invasiva de las células MCFDCIS en presencia de los fibroblastos de AR, sin alterar su motilidad (Fig. 2A). De manera similar, el inhibidor de la actividad de NF- $\kappa$ B, CAPE, disminuyó la invasión de las células MCFDCIS estimulada por los fibroblastos. El CAPE no afectó la motilidad de las células tumorales (Fig. 2B).

Dado que los inhibidores de la COX-2 pueden ejercer a la vez efectos dependientes e independientes de su acción sobre esta enzima, se generaron derivados de las células MCFDCIS que expresaran establemente ARNhc para la COX-2. La misma estrategia se utilizó para inhibir la MMP-9. La reducción efectiva de la expresión de ambas proteínas se confirmó por qPCR y WB. Cuando la capacidad migratoria e invasiva de estos clones con expresión reducida de COX-2 y MMP-9 se ensayó en los cocultivos, la invasión inducida por los fibroblastos se redujo mientras que no sucedió lo mismo con la motilidad (Fig. 3C). La actividad de la MMP-9 disminuyó levemente en los cocultivos de fibroblastos de AR y los clones con baja expresión de COX-2 (datos no mostrados). Estos resultados indican que, al menos en parte, la actividad promotora de la invasión que mostraban los fibroblastos en los cocultivos, se debía a la modulación positiva de la expresión de la COX-2 y la MMP-9 en las células MCFDCIS.



**Fig. 2.** Inhibición de la COX-2, la MMP-9 y el NF- $\kappa$ B en los cocultivos de células MCFDCIS y RASF. La inhibición de la actividad de la COX-2 o el NF- $\kappa$ B mediante el uso del celecoxib (A) o CAPE (B), respectivamente redujo el aumento de la invasividad de las células MCFDCIS inducida por el cultivo con RASF, sin afectar la motilidad. C) La reducción de la expresión de la COX-2 y la MMP-9 en las células MCFDCIS, por medio de la expresión de los ARNhc respectivos, disminuyó su capacidad invasiva, pero no la migración, inducida por el cocultivo con RASF. En todos los casos, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En trabajos previos se demostró que el modelo de xenotrasplante con las células MCF10DCIS.com reproduce las principales características de la progresión de los tumores de mama de tipo basal, y que por lo tanto, es útil para investigar los mecanismos moleculares que gobiernan la transición del carcinoma de mama in situ al invasivo<sup>31</sup>. Por otra parte, la coinoculación de fibroblastos estromales, derivados de tejido mamario normal, de tumores de mama o sinoviales de pacientes con artritis reumática promovió la invasión de las células MCFDCIS, efecto que fue contrarrestado por la coinoculación con células mioepiteliales normales<sup>31</sup>. En otros resultados anteriores a los desarrollados en esta tesis, la coinoculación de fibroblastos y células MCFDCIS en ratones atímicos llevó a un aumento en la expresión de COX-2 en estas últimas, mientras que con la coinoculación de células mioepiteliales solo se detectaron unas pocas células positivas para la expresión de COX-2<sup>32</sup>. Un resultado similar se reportó en un estudio de cáncer de páncreas, en el cual la expresión de COX-2 aumento significativamente en respuesta al cocultivo con fibroblastos. En este trabajo, además, la reducción de la expresión de COX-2 disminuyó las propiedades invasivas de las células tumorales, adquiridas por interacciones epiteliales-mesenquimales<sup>33</sup>. La expresión de COX-2 en los xenotrasplantes de las células MCFDCIS solas se mantuvo reducida aun cuando los tumores se tornaron invasivos luego de 7-8 semanas, lo que sugiere que la expresión elevada de COX-2 en las células MCFDCIS coinoculadas con fibroblastos era consecuencia de la presencia de éstos y no de la adquisición de un fenotipo invasivo<sup>32</sup>.

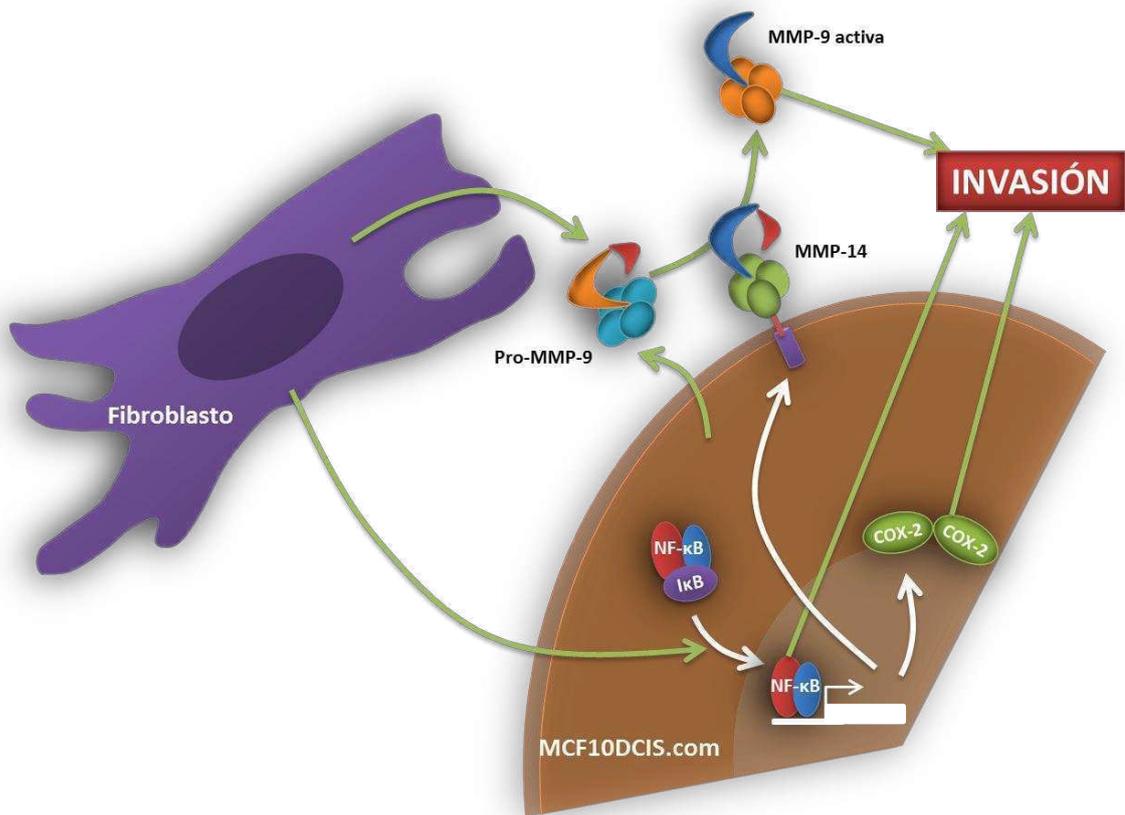
Los fibroblastos de AR provocaron el cambio hacia un perfil invasivo de las células MCFDCIS en los cultivos en 3D (Fig. 1A). En concordancia con lo reportado en un trabajo que utilizó cocultivos de fibroblastos y células de carcinoma escamoso de piel<sup>34</sup>, se observó que en el extremo distal de los grupos de células invasoras se encontraban al menos un fibroblasto líder. Al menos en algunos aspectos, la progresión invasiva y las interacciones entre células que ocurren en los xenotrasplantes<sup>31, 32</sup> pudieron ser reproducidas en este modelo de cultivo celular, y por lo tanto, puede ser usado para la disección de vías de señalización involucradas en estos procesos.

El cocultivo con fibroblastos de AR provocó un aumento de los transcritos de COX-2 y MMP-14 en las células MCFDCIS, similar a lo hallado con el mismo modelo en xenotrasplantes<sup>32</sup> (Fig. 1D). También se encontró un aumento de la actividad de MMP-9 en los cocultivos (Fig. 1C), aunque no ocurrió lo mismo con los niveles de su ARNm. La MMP-14 es una metaloproteasa de membrana (MT1-MMP) que activa múltiples MMP<sup>35</sup>, por lo cual el aumento de su expresión en los cocultivos podría provocar un incremento de la actividad de MMP-9 sin alterar su expresión a nivel del ARNm o de la proteína misma. Diversos trabajos implican a la MMP-14 en la activación de la MMP-9 en una

cascada que involucra a la MMP-13 como intermediaria<sup>36, 37</sup>. No obstante, dada la compleja regulación de las MMP y otras proteasas que degradan la matriz extracelular, no se pueden descartar hipótesis alternativas.

Las células MCFDCIS incrementaron la actividad del factor NF- $\kappa$ B cuando se cocultivaron con fibroblastos de AR (Fig. 1E). Como fibroblastos con un fenotipo inflamatorio, éstos secretan distintas citoquinas que pueden estimular la actividad de NF- $\kappa$ B. Este factor, por su parte, puede incrementar la expresión de diversos genes de proteínas proinflamatorias, entre ellas la COX-2<sup>38</sup>. Diversos trabajos demostraron que su actividad está involucrada en el aumento de la expresión de la MMP-14<sup>39, 40</sup>. De acuerdo con esto, los niveles de ARNm de COX-2 y MMP-14 fueron menores en las células MCFDCIS portadoras del súper-represor de NF- $\kappa$ B al ser cocultivadas con fibroblastos (Fig. 1H). La actividad de la MMP-9 también se redujo con esta estrategia (Fig. 1G). La inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B con un inhibidor farmacológico o por expresión de su súper-represor redujo parcialmente el aumento de la capacidad invasiva de las células MCFDCIS en los cocultivos (Fig. 1F y 2B). Esta inhibición incompleta se puede explicar por la activación de diversas vías de señalización inducidas por las interacciones epiteliales-estromales. Por ejemplo, numerosas citoquinas secretadas por los fibroblastos de AR activan vías de señalización que pueden regular positivamente la expresión de COX-2 y las MMP, y aumentar la motilidad y la capacidad; entre ellas las vías de ERK, Akt y el calcio intracelular, además del NF- $\kappa$ B<sup>41-45</sup>. Por otra parte, varias PG y otros mediadores lipídicos y especies reactivas de oxígeno producidas por los fibroblastos de AR pueden favorecer el crecimiento tumoral y la capacidad invasiva. La misma COX-2 de las células tumorales está involucrada en el aumento de la invasividad promovida por los fibroblastos de AR (Fig. 2C). Esta capacidad estaría asociada al aumento de la actividad de la MMP-9, dado que la inhibición de la expresión de esta proteasa disminuye la invasión a través del Matrigel (Fig. 2C).

En este trabajo se demostró el papel de la COX-2, la MMP-9 y el NF- $\kappa$ B en la adquisición del fenotipo invasivo de las células MCFDCIS al ser cocultivadas con fibroblastos inflamatorios. Estas interacciones entre los dos tipos celulares provocaron también un aumento de la expresión de la MMP-14. Permanece por resolver las relaciones de jerarquía entre estos factores. Por ejemplo, la inhibición de NF- $\kappa$ B disminuyó la expresión de COX-2 y MMP-14, coincidentemente con lo reportado sobre la actividad de este factor. Sin embargo, la MMP-14 puede incrementar la expresión de COX-2, independientemente de su actividad proteolítica, valiéndose de la señalización vía NF- $\kappa$ B.<sup>46</sup>



**Fig. 3.** Resumen de los resultados obtenidos con el modelo de cocultivo de células de carcinoma ductal in situ y fibroblastos inflamatorios. Las células MCF10DCIS.com responden a las señales provenientes de los fibroblastos incrementando la expresión de la COX-2 y la MMP-14, mediada en parte por la actividad del factor de transcripción NF-κB. El cocultivo, además produce un aumento de la actividad de la MMP-9. La MMP-14 podría ser responsable de este aumento de la forma activa de la MMP-9. En conjunto, La COX-2, la MMP-9, la MMP-14 y el NF-κB promueven la invasividad de las células tumorales.

La redundancia de factores secretados y de las redes que modulan las interacciones epiteliales-estromales evidencian las dificultades asociadas con el tratamiento de las alteraciones en el microambiente tumoral. Múltiples tipos celulares presentes en el dicho microambiente pueden producir distintas citoquinas y quimioquinas con la capacidad de provocar respuestas similares en las células tumorales epiteliales. Por lo tanto, la inhibición de una vía particular puede no resultar terapéuticamente favorable. De manera análoga, esta redundancia hace difícil discernir cómo las células tumorales epiteliales podrían desarrollar una dependencia de un tipo celular estromal en particular, y cómo esta interacción podría proveer una ventaja selectiva para la expansión de un clon específico de células estromales.

Resumiendo, a pesar de la complejidad de la comunicación entre la célula tumoral y su microambiente, hemos demostrado que la COX-2 interviene en el diálogo entre el epitelio y su estroma, en particular en un contexto inflamatorio como lo es el aportado por los fibroblastos de artritis reumática. En ese escenario, el aumento de la expresión de COX-2 en las células tumorales, inducido por el estroma, promueve la transición de CDIS a carcinoma invasivo.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med* 2004;350:1430-41.
2. Polyak K. Molecular alterations in ductal carcinoma in situ of the breast. *Curr Opin Oncol* 2002;14:92-6.
3. Polyak K. On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2001;1552:1-13.
4. Radisky D, Hagios C, Bissell MJ. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol* 2001;11:87-95.
5. Weaver VM, Gilbert P. Watch thy neighbor: cancer is a communal affair. *J Cell Sci* 2004;117:1287-90.
6. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010;70:5649-69.
7. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004;6:17-32.
8. Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res* 2001;61:1320-6.
9. Shekhar MP, Santner S, Carolin KA, Tait L. Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *Am J Pathol* 2007;170:1546-60.
10. Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2009;31:1346-53.
11. Radisky ES, Radisky DC. Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:279-87.
12. Schmid SA, Dietrich A, Schulte S, Gaumann A, Kunz-Schughart LA. Fibroblastic reaction and vascular maturation in human colon cancers. *Int J Radiat Biol* 2009;85:1013-25.
13. Yashiro M, Ikeda K, Tendo M, Ishikawa T, Hirakawa K. Effect of organ-specific fibroblasts on proliferation and differentiation of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2005;90:307-13.
14. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:54-9.
15. Koldovsky P, Haas I, Ganzer U. Promoting effects of fibroblasts on growth and progression of head and neck carcinoma cells. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1996;58:248-52.

16. Picard O, Rolland Y, Poupon MF. Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice: implication for implantation of metastases. *Cancer Res* 1986;46:3290-4.
17. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 2001;166:2472-83.
18. Kenny PA, Bissell MJ. Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues. *Int J Cancer* 2003;107:688-95.
19. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
20. Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, et al. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 2008;13:23-35.
21. Ulrich CM, Bigler J, Potter JD. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer* 2006;6:130-40.
22. Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, et al. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:627-37.
23. Visscher DW, Pankratz VS, Santisteban M, Reynolds C, Ristimaki A, Vierkant RA, et al. Association between cyclooxygenase-2 expression in atypical hyperplasia and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:421-7.
24. Shim V, Gauthier ML, Sudilovsky D, Mantei K, Chew KL, Moore DH, et al. Cyclooxygenase-2 expression is related to nuclear grade in ductal carcinoma in situ and is increased in its normal adjacent epithelium. *Cancer Res* 2003;63:2347-50.
25. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002;62:1676-81.
26. Hu M, Polyak K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:2760-5.
27. Miller FR, Santner SJ, Tait L, Dawson PJ. MCF10DCIS.com xenograft model of human comedo ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1185-6.
28. Shekhar MP, Pauley R, Heppner G. Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res* 2003;5:130-5.
29. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:233-55.
30. Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:356-60.

31. Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, Carrasco D, et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* 2008;13:394-406.
32. Hu M, Peluffo G, Chen H, Gelman R, Schnitt S, Polyak K. Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:3372-7.
33. Sato N, Maehara N, Goggins M. Gene expression profiling of tumor-stromal interactions between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts. *Cancer Res* 2004;64:6950-6.
34. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:1392-400.
35. Holmbeck K, Bianco P, Yamada S, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP: a tethered collagenase. *J Cell Physiol* 2004;200:11-9.
36. Dreier R, Grassel S, Fuchs S, Schaumburger J, Bruckner P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res* 2004;297:303-12.
37. Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L, Tsukamoto H. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem* 2007;282:12928-39.
38. Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:95-114.
39. Distler JH, Jungel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, III, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2892-7.
40. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001;114:131-9.
41. O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J* 2008;409:635-49.
42. Jenkins JK, Hardy KJ, McMurray RW. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: a guide to therapy. *Am J Med Sci* 2002;323:171-80.
43. Ospelt C, Gay S. The role of resident synovial cells in destructive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:239-52.
44. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:2927-31.
45. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:396-405.

46. Annabi B, Laflamme C, Sina A, Lachambre MP, Beliveau R. A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation* 2009;6:8.

# AGRADECIMIENTOS

A Danka, por haberme hecho un lugar de este lado, el de los que hacemos lo que (casi) queremos; por las ideas iniciáticas y las libertades ulteriores. No menos importante, por haberme permitido permanecer casi al costado de la inmunología tumoral.

A Elisa por haberme permitido establecer una embajada más allá del bioterio (transnazqueña, si se permite) y ofrecerme un día la posibilidad de la pasantía en el DFCI.

A Nelly por aceptarme como pasante en su laboratorio, y por extensión, a la gente en el DFCI/Harvard University: Reo, Sibgat, Misha, So Yeon, Noga, Min, Laura y Janina.

A Lore, de quien abusé amistad dentro y fuera del laboratorio.

A Vani, con quien nos divertimos mientras nos mentíamos sobre nuestros días en el Roffo, hace diez años. No hemos cumplido nuestras promesas, todavía, pero hacíamos amenas esas horas de bioterio, allá hace tiempo, cuando los ratones todavía no habían desatado una despiadada venganza alérgica sobre mi persona.

A Alejandro, porque de él aprendí buena parte de las cosas que se hacen sobre las mesadas y de las que ahora hablo como si conociera desde siempre.

A Isa, quien me dio las primeras herramientas y es casi tan obsesiva como yo en estos menesteres con células y reactivos.

A Jopi, porque quizá no haya nadie más en quien encontrar tanto sol cotidiano; por su amistad.

A Ova por su constante y contagioso buen humor; su aporte a mi habilidad técnica es materia sujeta a debate.

A Diego por su solidaridad temporal y espacial para conmigo.

A Ces, por brindarme su amistad.

A Andre, a quien deben su vida mis clones mientras estaba en algún congreso.

A los amigos en este camino: María y Lau M (y su permanente insistencia para con la redacción de esta tesis), Cande (charlas de bioterio de por medio), Ce, Kriszta, Pao, Marina, Pau.

A Giselle, por algunas ideas oportunas.

A Martín y su paciencia para discutir protocolos y datos que mi memoria, escasa en este como en otros asuntos, insiste en olvidar.

A Lili, porque hubo tardes con charlas, galletas y licores.

A quienes desde las ideas, las correcciones, la ayuda, la paciencia, la generosidad o la simple convivencia (o combinaciones de ellas) contribuyeron conmigo: Miriam, Lucas, Lydia, Vale, Lore R, Romi, Sil, Guada, Ada, Flor B, Lali C, Edu, Ana, Gabi, Lore, Leti, Flor R, Sole, Cata L, Ale A, Marce y Lourdes y a quien pueda haber olvidado o no.

A Andrea, obviamente. Cálidamente.

A mi amigo Ignacio, a quien algún día devolveré tanto Sancho entre estos molinos de viento.

A mi madre, y por extensión a mi tía, por mucho.

A quienes fueron mis abuelos. A Marcelo, perdón por los tiralíneas y compases abandonados cuando aún no éramos digitales. Este *inyeniero* los encuentra cada tanto en su desorden y se detiene un rato para observarlos. A Aída, todas las azucenas.

Se llevó un siglo y un tanto más el viaje atlántico desde el analfabetismo. No evitó fondear en puerto alguno, marcados todos en una carta de navegación que nadie vio, pero ha estado presente. Tampoco conoció apuros. Desconozco el mérito de este arribo; podría no haberlo, pero es solo una intuición. Ignoro si los tiempos debían o podían ser más cortos, si siquiera esta tesis terminó siendo como debería haber sido y fue pensada, si puede una tesis ser soñada de una determinada manera, si fue sólo el resultado de alguna obsesión más el tiempo transcurrido. Entre tanto desconocimiento, asoma, sin embargo, una certeza: debía mencionar aquella lejana partida, este puerto y el agua entre ellos.