Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Regulación de la diseminación de los tumores sólidos murinos por el sistema del ácido retinoico y sus receptores

Campodónico, Paola Bernadette

2012

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

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

Cita tipo APA:
Campodónico, Paola Bernadette. (2012). Regulación de la diseminación de los tumores sólidos murinos por el sistema del ácido retinoico y sus receptores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Campodónico, Paola Bernadette. "Regulación de la diseminación de los tumores sólidos murinos por el sistema del ácido retinoico y sus receptores". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Regulación de la diseminación de los tumores sólidos murinos por el sistema del ácido retinoico y sus receptores.

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

Lic. Paola Bernadette Campodónico

Directora de tesis: Dra. Laura Beatriz Todaro

Consejero de estudios: Dr. Gerardo Glikin

Lugar de trabajo: Área de Investigación,

Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo"

Buenos Aires, 2012

“Paso a paso…”

Tata y Tati

A Mamá

Al Tata

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a Laura por haber aceptado dirigirme durante tanto tiempo, habiéndome enseñado y padeciéndome tanto en mi tesis de licenciatura como en el doctorado. Hubo situaciones muy difíciles, aún así hay mucho para agradecer.

También quiero agradecer muy especialmente a Elisa, por haberme permitido trabajar en el Instituto hace ya algunos años, por las charlas y sus ideas a pesar de mi ansiedad. Además, por ayudarme a descubrir una gran vocación, a pesar de la timidez, por la docencia.

Otro agradecimiento super especial a Master Farias, es un placer trabajar con alguien como vos, charlar y terminar con nuestros delirios típicos, quedarnos horas en el confocal cantando EL hit (dame el DAPI, dame, dame el DAPI…). Fue una experiencia única trabajar con Master Farias. También agradezco a Sil, su mujer, Yeriel, Tracey, Uma y todos los demás integrantes del piso 24.

También me gustaría agradecer a Marina por su eterno aguante con todos los becarios. A Guille Peluffo que siempre está dispuesto a ayudar, charlar y pelear, debo reconocer que se te extraña mucho. A Giselle por las charlas y el aguante. A Alejandro, será peleador pero sólo para disimular que es un muy buen tipo. A Lydia, Dory, Marta, Agustín y Lilia Lauría.

A todos los chicos del Área de Investigación. Especialmente a Dami, Ine, Carito y Tefo, los compañeros de grupo, eTcelentes becarios, siempre dispuestos a ayudar y hacer las cosas más divertidas. A Rocío (autollamada Messi) una de las chicas más divertidas, trabajadoras e insólitas que he conocido. Junto a Dami fueron los responsables de que nunca exista un minuto de silencio en becariato y nos dieron la oportunidad de llenar un pizarrón con sus sabias palabras.

A Denu, la personita más dulce que hay y siempre dispuesta a ayudar a todos. A Yani… negri, sos muy inteligente, trabajadora y dulce, dale siempre para adelante. A Helen (Meolans), gracias por alimentarnos tan rico y por aportar también al famoso pizarrón de becariato. A Jopi, Diego, Sil, Ampi (ya te fuiste pero te sigo contando acá), los día de trabajo son mucho más amenos con gente como ustedes. A Gabita, tus ocurrencias son

únicas, haces que cada día sea único. A Bárbara (nuestra defensora), Cris, Luciana, Mariana, Ada, gracias chicas. Gracias Ana por estar siempre dispuesta a ayudarme. A Andrea, Lucas, Gabriel, Eduardo y Madela. A Leo, Alicia y Antonia por la ayuda ofrecida y los mates de la mañana temprano cuando todavía no estaba despierta.

A toda la gente de bioterio, especialmente a Cande, Vani y Andre (que ya no están). Chicas, trabajar con los ratones se hizo mucho más amenos con nuestras charlas terapéuticas de por medio.

En fin, a todos mis compañeros de trabajo en general, espero no haberme olvidado de nadie, si así fue espero sepan comprender que tengo una memoria casi nula.

A dos grandes amigos que ya hace un tiempo se fueron del Instituto pero que fueron claves en mi trabajo y en mi vida diaria: Ceci y Ova. Ceci, te extraño muchísimo, siempre disfruté nuestras charlas y momentos juntas. Ova, gracias por ser un amigo del cual me siento orgullosa, gracias por sentarte a escribir conmigo, por tu ayuda y tus charlas. Hago extensivo este agradecimiento a Lau que nos bancó a los dos en su casa, y al poroto por hacerme tía postiza.

Agradezco también a Fogarty Internacional Research Collaboration Award, FIRCA R03 TW007207, que solventó gran parte de este trabajo.

A toda la gente de la cátedra 3 de histología, biología, embriología y genética.

A toda, toda mi familia que me bancó con mis raros horarios de laboratorio. Especialmente al Tata, la Tati, la abuela Delfi, a mis madres, a mi papá, a mis hermanos: Gaby, Fabry y la enana hermosa Lauri. A mi tía Norma, tía Moni, tío Adalbertico, Rodro, Sole y mis dos debilidades: Tatu y Renata ¡las amo! A Macuña por soportarnos y ayudarnos mutuamente, y a toda su familia. A Piflo, Ceci y la Pancha que las quiero con el alma.

Por último, a dos seres que me acompañaron fielmente, cuerpo a cuerpo, casi encima de la computadora, durante la escritura de este trabajo: Narky y Franky.

ÍNDICE

Contenido

ABREVIATURAS....10
Regulación de la diseminación de los tumores sólidos murinos por el sistema del ácido retinoico y sus receptores....13
RESUMEN....13
Regulation of murine solid tumors dissemination by retinoic acid system and its receptors....16
ABSTRACT....16
Cáncer y Cascada Metastásica....18
EL CÁNCER....19
CONCEPTOS GENERALES....19
TUMOR BENIGNO Y TUMOR MALIGNO....19
CARACTERÍSTICAS DEL AMBIENTE TUMORAL....20
MECANISMOS DE LA PROGRESIÓN TUMORAL....20
APOPTOSIS....20
SENESCENCIA/DORMANCY....20
CICLO CELULAR....20
CRECIMIENTO: SOBREVIDA-PROLIFERACIÓN....21
DISEMINACIÓN METASTÁSICA....21
CÉLULAS STEM Y CÁNCER....22
Cáncer de mama....25
CÁNCER DE MAMA....26
LA GLÁNDULA MAMARIA....26
EL CÁNCER DE MAMA....26
CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES MAMARIOS....26
CÉLULAS STEM MAMARIAS....27
IMPORTANCIA DE LOS MODELOS TUMORALES MAMARIOS....27
RETINOIDES. CARACTERÍSTICAS Y USO EN LA CLÍNICA....29
EL SISTEMA RETINOIDE....30
VÍA CLÁSICA DEL SISTEMA DEL ÁCIDO RETINOICO....30
VÍAS NO GENÓMICAS DEL SISTEMA DEL ÁCIDO RETINOICO....31
RETINOIDES Y CÁNCER....31
Materiales y Métodos....36
TUMOR....37
MANTENIMIENTO IN VITRO DE LA LÍNEA CELULAR LM38-LP....37

RETINOIDES Y DOSIS....37
SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES LUMINAL Y MIOEPITELIAL....37
RT-PCR Y PCR....37
WESTERN BLOT....37
ENSAYO DE GENES REPORTEROS....40
ACTIVIDAD RARE LUCIFERASA....40
ACTIVIDAD AP1 LUCIFERASA....40
CAPACIDAD PROLIFERATIVA....40
ENSAYO DE CLONOGENICIDAD....40
CULTIVO DE ESFEROIDES....40
CITOMETRÍAS....40
INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPÍA CONFOCAL....40
CULTIVOS 3D EN MEMBRANA BASAL RECONSTITUIDA (MATRIGEL)....41
ensayo de SENESCENCIA....41
EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS....41
Citometría de flujo....41
Microscopía de fluorescencia....41
FORMACIÓN DE MAMOSFERAS POR CÉLULAS STEM TUMORALES....41
preparación DE MEDIOS CONDICIONADOS....41
ZIMOGRAFÍAS....41
CASEINÓLISIS RADIAL....42
ENSAYO DE MIGRACIÓN....42
ENSAYO DE INVASIÓN EN CÁMARAS TRANSWELL....42
CAPACIDAD ADHESIVA....42
análisis de MARCADORES DE CÉLULAS STEM/progenitoras TUMORALES....42
ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DE UN PANEL DE GENES involucrados en la transición epitelio-mesenquimática EN PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)....42

GENERACIÓN DE LAS SUBLÍNEAS DERIVADAS de LM38-LP POR TRANSFECCIÓN ESTABLE, PARA EL SILENCIAMIENTO O SOBRE-EXPRESIÓN DE DIFERENTES RARs 42

ANIMALES....43

CRECIMIENTO TUMORAL Y CAPACIDAD METASTÁSICA ESPONTÁNEA....43

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS....43

Objetivo 1: 45

Separación de los componentes LEP y MEP de la línea celular LM38-LP....46

Expresión y modulación de los principales receptores del sistema retinoideo....46

Estudio de la funcionalidad de los receptores del sistema retinoico....46

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 5....46

Objetivo 2: 48

Efecto del tratamiento retinoide sobre la proliferación celular in vitro....49

Análisis de la distribución en el ciclo celular frente al tratamiento con retinoides....49

Efecto del tratamiento retinoide sobre la expresión de moléculas relacionadas con el control del ciclo celular....49

Efecto del tratamiento retinoide sobre la expresión de moléculas relacionadas a vías reguladoras de supervivencia y proliferación celular....49

Estudio de la senescencia inducida por retinoides....50

Efecto del tratamiento retinoide sobre la apoptosis....50

EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR....50

Capacidad clonogénica de la línea celular LM38-LP....50

Efecto de los retinoides sobre la formación de esferoides de células....51

LM38-LP....51

Efecto de los retinoides sobre la formación de colonias de la línea celular LM38-LP. Cultivos 3D en matrigel....51

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 6....52

Objetivo 3: 54

Actividad del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y de Metaloproteasas....55

Medición de la actividad del gen reportero AP1-luciferasa....55

Efecto de los retinoides sobre la migración de la línea LM38-LP....55

Efecto de los retinoides sobre la capacidad invasiva de la línea celular LM38-LP 55

Efecto de los retinoides sobre la capacidad adhesiva de la línea celular LM38-LP 55

ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE ALGUNOS GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMÁTICA....56

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 7....63

Objetivo 4: 64
ESTUDIO DE LA EXISTENCIA DE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS STEM/PROGENITORAS EN LA LÍNEA CELULAR LM38-LP 65
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 8.....66
Objetivo 5: 67
Generación de sub-líneas derivadas de LM38-LP por transfección estable 68
papel de los diferentes rars sobre el crecimiento tumoral in vivo frente al tratamiento con ácido retinoico.....68
Actividad del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y de MMP-9.....69
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 9.....69
DISCUSIÓN GENERAL 72
Bibliografía.....76

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APL: Leucemia promielocítica aguda

ARN: Ácido ribonucleico

ATRA: Forma *trans* del ácido retinoico

ARNm: ARN mensajero

BSA: Seroalbúmina bovina

CRBP: Proteína citosólica de unión al retinol

DBD: Dominio de unión al ADN

HIF1: FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA 1

LBD: Dominio de unión al ligando

LEP: Células epiteliales-luminales de la glándula mamaria

MC: Medio condicionado

ME: Matriz extracelular

MEP: Células mioepiteliales de la glándula mamaria

MMP: Metaloproteasa

PBS: Buffer fosfato salino

RAR: Receptor de ácido retinoico

RARE: Elemento respondedor al ácido retinoico

RXR: Receptor rexinoideo

S.C: subcutáneo

SFB: Suero Fetal Bovino

shARN: Pequeño ARN en forma de horquilla

T.A: Temperatura ambiente

TEM: Transición epitelio-mesenquimática

TSP-1: Trombospondina-1

uPA: Activador de Plasminógeno tipo uroquinasa

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

REGULACIÓN DE LA DISEMINACIÓN DE LOS TUMORES SÓLIDOS MURINOS POR EL SISTEMA DEL ÁCIDO RETINOICO Y SUS RECEPTORES.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el rol del sistema retinoide en la progresión del tumor mamario murino LM38-LP, haciendo énfasis en las interacciones celulares entre su componente luminal (LEP) y mioepitelial (MEP).

Determinamos que la línea LM38-LP expresa receptores retinoides y que los mismos son funcionales. El tratamiento con retinoides induce en la línea un arresto del ciclo celular. El mismo tratamiento induce apoptosis sólo en el compartimiento LEP y senescencia en las células MEP, mientras que una pequeña población celular que mediaría la interacción entre ambos componentes continúa ciclando.

Asimismo se ha podido determinar la existencia de una población con características de células stem/progenitoras parcialmente resistentes al tratamiento con retinoides.

Hemos estudiado además mecanismos implicados en la diseminación metastásica de la línea LM38-LP. En este sentido hemos observado que los retinoides inhiben tanto la actividad de proteasas secretadas como la capacidad migratoria, mientras que aumentan la capacidad adhesiva a componentes de la matriz extracelular. Los retinoides inhiben la invasión sólo en la población MEP de la línea LM38-LP.

Se analizó la transcripción de un panel de genes implicados en el proceso de transición epitelio-mesenquimática. Se pudo determinar que el ácido retinoico modula estos genes diferencialmente entre los compartimientos LEP y MEP conduciendo a la línea hacia un fenotipo menos agresivo.

Se generaron sublíneas que presentan silenciados o sobreexpresados los distintos receptores retinoideos, lo que permitió evaluar la participación de cada uno de ellos en la progresión tumoral maligna de la línea en estudio.

Este trabajo sugiere que los retinoides ejercen efectos pro-apoptóticos y citostáticos diferenciales en los diferentes compartimentos celulares de la línea LM38-LP. Asimismo los resultados sugieren la existencia de una tercera población con capacidad clonogénica y resistente a los retinoides.

Palabras claves: cáncer de mama, ácido retinoico, células stem/progenitoras, receptores retinoideos, interacción entre componente luminal y mioepitelial.

RESUMEN EN INGLÉS

REGULATION OF MURINE SOLID TUMORS DISSEMINATION BY RETINOIC ACID SYSTEM AND ITS RECEPTORS

ABSTRACT

The objective of the present work is to study the role of retinoid system in the murine mammary tumor LM38-LP progression, emphasizing luminal and myoepithelial cellular interactions.

We determined that LM38-LP cell line expresses retinoic acid receptors and that these are functional. Retinoid treatment induces cell cycle arrest in the cell line. Same treatment induces apoptosis only in LEP compartment, senescence in MEP cells, while a small cellular population that mediates interaction between LEP and MEP compartment remains cycling.

We determined the presence of a small cell population with characteristics of stem/progenitor cells, partially resistant to retinoid treatment.

Besides, we studied some mechanism involved in metastatic dissemination in LM38-LP cell line. In this way, we observed that retinoids inhibit both secreted protease activity and migratory capacity, while increase adhesion capacity to some components of extracellular matrix. Retinoids inhibit invasion only in LM38-LP cell line MEP population.

A set of genes implicated in epithelial-mesechymal transition were analyzed employing a qPCR array. We could determine that retinoic acid modulated these genes in a differential way in LEP and MEP compartments, leading to a less aggressive phenotype.

By using sub lines generated either silencing or over expressing different retinoic acid receptors, we analyzed the role of the different receptors in the metastatic progression of LM38-LP cells.

This work suggests that retinoids exert differential pro apoptotic and citostatic functions on the different cell components of the mammary tumor cell line LM38-LP. Likewise, these results suggest the existence of a third cell population with clonogenic capacity and resistant to retinoids.

Key words: brest cancer, retinoic acid, stem/progenitor cells, retinoic acid receptors, luminal and myoepithelial interactions.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

CÁNCER Y CASCADA METASTÁSICA.

EL CÁNCER

CONCEPTOS GENERALES

El cáncer es un proceso de múltiples etapas en el cual los controles normales de proliferación celular, de interacción célula-célula y célula-matriz extracelular se encuentran alterados, llevando a la célula tumoral a un crecimiento descontrolado, a la desorganización de sus interacciones, a la adquisición de un fenotipo invasivo y a la capacidad de inducir neovascularización.

El cáncer es una enfermedad que, en el período 1997-2001 ocasionó aproximadamente 190 muertes / 100.000 habitantes en nuestro país[1] y en 2008 causó aproximadamente 260 muertes / 100.000 habitantes en los Estados Unidos[2]. Existe un gran número de evidencias que demuestran que el estilo de vida es un factor de importancia que puede modificar el riesgo de cáncer[3,4]. Así, en la actualidad se recomienda modificar algunos factores de riesgo, como no fumar, aumentar la actividad física moderada, controlar el peso, mejorar los hábitos alimenticios y limitar el consumo de alcohol[5].

Los distintos tipos de tumores se clasifican de acuerdo al tejido y tipo celular a partir de los que se originan. Los tumores procedentes de células epiteliales se denominan carcinomas; los que proceden de tejido conjuntivo o células musculares se denominan sarcomas. Existen nombres para tumores benignos y paralelamente nombres para tumores malignos: un adenoma es un tumor epitelial benigno con una organización glandular, siendo el tipo de tumor maligno correspondiente un adenocarcinoma. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos son carcinomas probablemente porque los tejidos epiteliales están expuestos más frecuentemente a las diversas formas de lesión física y química que favorecen el desarrollo del cáncer[6].

Así, el cáncer a un grupo heterogéneo de enfermedades respecto al tipo celular y tejido de origen, caracterizadas por la presencia de un tumor maligno, que implica la desregulación de múltiples cascadas de señalización relacionadas a procesos celulares

fundamentales como muerte, proliferación, diferenciación y migración[7]. Las células provenientes del tumor original, o tumor primario, pueden colonizar y proliferar en un nuevo tejido formando nuevos tumores denominados tumores secundarios o metástasis (gr. meta: lugar distinto + stasis: fijar = fijado en otro lugar), pudiendo generar mal funcionamiento del órgano y finalmente la muerte del paciente[8].

TUMOR BENIGNO Y TUMOR MALIGNO

Según su comportamiento, los tumores se clasifican en benignos y malignos. La Tabla 1.I resume las características principales de cada uno.

Característica	Tumor benigno	Tumor maligno
Forma de crecimiento	Expansivo	Infiltrante
Tasa de crecimiento	Generalmente lento	Rápido
Recurrencia	Rara	Común
Efectos sistémicos	Raros (excepto endocrinos)	Común
Diferenciación	Similares al tejido de origen	Poco diferenciados
Invasión local	Nunca	Invasivos (temprano)
Metástasis	Nunca	Casi siempre
Macroscópico		
• **Cápsula**	Común	Ausente o Pseudocápsula
• **Necrosis**	Rara	Común
• **Ulceración**	Rara	Común
Microscópico		
• **Atipia**	Mediana	Severa
• **Pleomorfismo**	Mediano	Severo
• **Mitosis**	Pocas	Muchas
• **Relación N/C**	Normal	Aumentada
• **Nucleolos**	Normales	Prominentes
• **Ploidía**	Generalmente normal	Usualmente anormal

TABLA .I. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS TUMORES BENIGNOS Y MALIGNOS. MODIFICADO DE COTRAN, KUMAR Y ROBBINS[9].

Un tumor benigno es un tipo de neoplasia que carece de la malignidad de los tumores cancerosos. Este tipo de tumor no crece en forma desproporcionada ni agresiva, por lo que no invade tejidos adyacentes y no hace metástasis a tejidos u órganos distantes. Los tumores benignos generalmente se componen de células morfológicamente muy similares a las del tejido que las origina.

En algunos casos ciertos tumores benignos generan una afección maligna, debido a la ocurrencia de alteraciones genéticas adicionales en una sub-población de células neoplásicas de comportamiento benigno. Un ejemplo notable de ello es el adenoma tubular, un tipo de pólipo de colon, el cual es un precursor común del cáncer de colon. En este tipo de tumor, como en la mayoría de tumores benignos que progresan a cáncer, muestran anormalidades en la apariencia y maduración celular conocidas como displasia[9].

La formación de un tumor maligno es un proceso gradual en el que se pueden distinguir distintas fases. La primera fase se califica como displasia e histopatológicamente se define como un desarrollo anormal de un órgano o tejido. En presencia de un agente carcinogénico, las displasias progresan de forma continua y se pueden distinguir estadios leves, moderados o graves. Si se modifican las condiciones carcinogénicas las displasias comienzan a revertir. Por otro lado, si las condiciones carcinogénicas continúan, aumenta la probabilidad de que se produzca la transición a un estadio irreversible de tumor maligno, o cáncer.

CARACTERÍSTICAS DEL AMBIENTE TUMORAL

Hace tiempo se determinó que la transformación tumoral y la metástasis (propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició) son consecuencia de cambios genómicos en las células que constituyen el tumor así como de la respuesta integrada del tejido u órgano a factores extrínsecos solubles, como factores de crecimiento, citoquinas y estímulos quimiotácticos. La progresión tumoral está determinada por una gran cantidad de puntos de control tanto a nivel genético y epigenético, como histopatológico, incluyendo amplificación génica, aumento en los niveles de transcripción o inactivación de genes específicos, expresión de marcadores tumorales y alteraciones morfológicas en las células o en la arquitectura del tejido[7].

En los tejidos adultos, la proliferación y la muerte celular se encuentran compensadas de forma tal de mantener relativamente constante el número de células y el tamaño de los órganos. De otro modo, se podrían generar efectos deletéreos tales como: la hiperplasia (aumento en el número de células), hipertrofia (aumento en el tamaño de las células), hipoplasia (disminución en el número de células) o hipotrofia (disminución en el tamaño de las células).

Las células cancerosas se caracterizan por presentar la capacidad de sobrevivir, proliferar y diseminarse incluso en ausencia de las señales que normalmente inducen estos procesos. Estas funciones son adquiridas por diferentes tumores mediante distintos mecanismos a lo largo de la progresión tumoral. Una de las características

que permite la adquisición de este fenotipo tumoral es el desarrollo de la inestabilidad genómica en las células que componen al tumor. Esta inestabilidad es capaz de generar mutaciones puntuales o de longitud variable al azar, alteraciones en los patrones de metilación génica e incluso re-arreglos cromosómicos[10].

Otra característica involucra al estado inflamatorio de las lesiones pre-malignas y malignas mediado por células del sistema inmune, algunas de las cuales son capaces de promover la progresión tumoral[11]. En la última década, las investigaciones acerca del proceso de inflamación con relación al cáncer han progresado considerablemente, demostrando la importancia de los efectos promotores, que presentan algunas células del sistema inmune, sobre la progresión tumoral[12]. Así, la inflamación puede ejercer múltiples efectos sobre el tumor al suplementar el microambiente tumoral con moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento, factores de sobrevida, moléculas pro-angiogénicas, enzimas capaces de modificar la matriz extracelular (ME) y señales de inducción que permiten la activación de la transición epitelio-mesenquimática, la que a su vez favorece la diseminación de la célula tumoral a sitios distantes, todas ellas características críticas del comportamiento de los tumores malignos[13] (Figura 1.I).

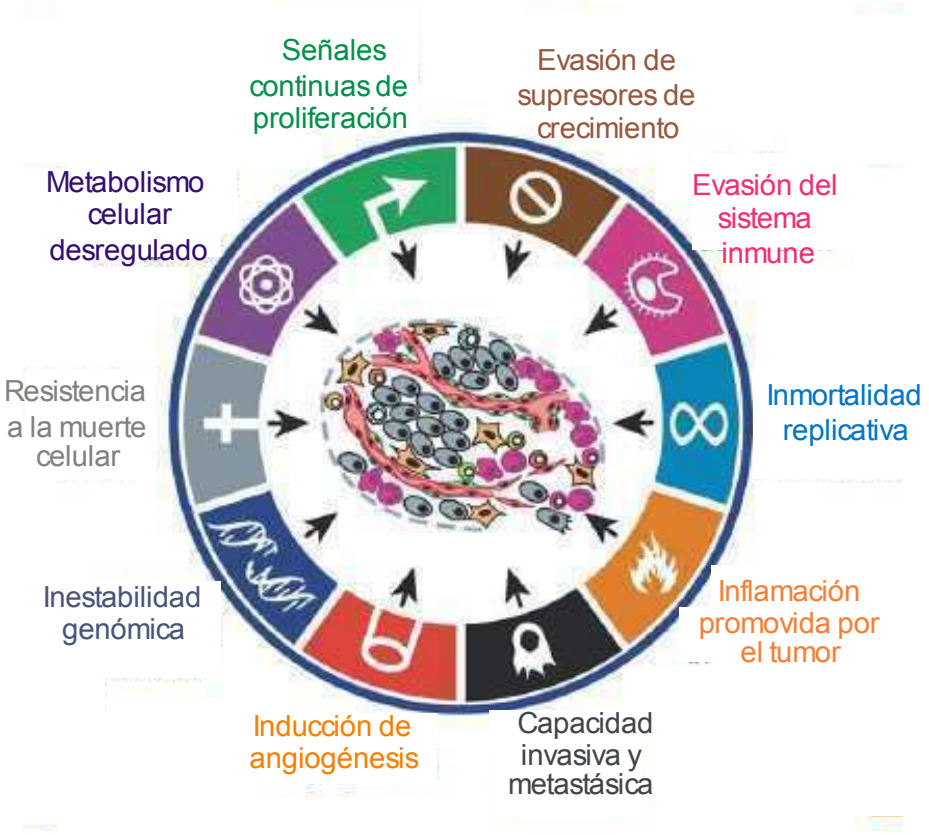


Figura 1.I. Características principales de los tumores malignos. Modificado de Hanahan, D., Weinberg, R.A.[11]

Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de mantener activas cascadas de señalización de proliferación celular de diversas maneras. Por ejemplo, estas células pueden producir factores de crecimiento que actúan en forma autocrina estimulando la proliferación celular. Además, muchos tumores presentan constitutivamente activados receptores implicados en la proliferación celular. Por otro lado, las células que integran la masa tumoral pueden estimular a las células normales que componen el estroma asociado al tumor, las cuales responden liberando factores de crecimiento hacia el mismo[14,15]. En los últimos años, la secuenciación de genomas de distintos tipos de cáncer reveló la presencia de diversas mutaciones somáticas que implican la activación de múltiples cascadas de señalización (generalmente activadas por factores de crecimiento), así como la inactivación de moléculas implicadas en la regulación negativa de estas vías.

MECANISMOS DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

APOPTOSIS

La apoptosis o “muerte celular programada” es una forma de “suicidio celular” que funciona como una barrera natural contra el desarrollo del cáncer. Se considera a la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte inherente al desarrollo celular, que se desencadena por múltiples señales, que pueden ser endógenas o estimulaciones exógenas ambientales. Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas; ello trae como resultado la activación de un programa genético que conduce, generalmente, a la nucleolisis por la acción de las endonucleasas. Este mecanismo de muerte celular interviene en importantes fenómenos fisiológicos como: embriogénesis, mantenimiento de la homeostasia, renovación tisular y desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario. Por ello, los mecanismos que regulan el fenómeno de apoptosis son esenciales para el normal desarrollo y mantenimiento de la homeostasis. Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores[16].

El estudio de las señales que regulan esta muerte celular, evidenció que el proceso apoptótico es activado en respuesta al stress fisiológico que las células del tumor experimentan como resultado de terapias anti-tumorales. Sin embargo, un gran número de las células que constituyen la masa tumoral han desarrollado una amplia variedad de estrategias que limitan o inhiben la apoptosis[17]. Así, muchos factores de supervivencia limitan la apoptosis a partir de la activación de proteínas Ras y de la cascada de señalización del fosfatidilinositol-3-OH quinasa (PI3K). Un mediador clave de esta vía es la quinasa Akt, la cual fosforila a múltiples efectores conduciendo a cambios en la proliferación, el metabolismo, el crecimiento celular y la supervivencia. Akt promueve la evasion de la apoptosis mediante el control de programas celulares que inhiben a los efectores apoptóticos, suprimen la transcripción de genes pro-apoptóticos, y modula la traducción de ARNm implicados en la regulación de la muerte celular. Además, algunas células son capaces de secretar citoquinas que estimulan la

activación de STATs y NF-κB, que son factores que promueven la supervivencia celular al modular la transcripción de proteínas relacionadas a Bcl2 y otros genes anti-apoptóticos. De esta manera, no es de sorprender que algunas mutaciones que activan constitutivamente vías de señalización de supervivencia celular contribuyan a la formación de neoplasias[17].

SENESCENCIA/DORMANCY

Por otro lado, la senescencia celular es un arresto irreversible de la proliferación. Este evento es activado cuando las células se encuentran frente a condiciones de stress como daño al ADN, acortamiento de los telómeros o activación de oncogenes[18]. En varios tumores se han detectado abundantes células con características morfológicas de células senescentes, tales como citoplasma aumentado, ausencia de marcadores de proliferación y expresión de la enzima asociada a senescencia SA-β-galactosidasa[19]. Esta enzima cataliza la hidrólisis de β-galactosidos en monosacáridos sólo en células senescentes. Actualmente este fenómeno es explicado por la sobre-expresión y acumulación de la β-galactosidasa lisosomal endógena, específicamente en células senescentes.

Al igual que la apoptosis, la senescencia impide la progresión tumoral y actúa como una barrera que las células pre-neoplásicas deben superar durante su evolución para llegar a un estado completamente tumorigénico. Esta respuesta parece reflejar los mecanismos de respuesta intrínseca diseñados para eliminar células que presenten niveles excesivos de ciertas señales.

Por otro lado, a pesar de los grandes progresos en las terapias de tumores sólidos como el cáncer de mama, la prognosis de pacientes incluso con tumores primarios pequeños, aún se encuentra limitada por la probabilidad de desarrollar metástasis con un período de latencia que puede abarcar de algunos años hasta décadas después de la remoción del tumor primario. Este periodo puede ser explicado por el fenómeno de *"dormancy"*, un estado dentro la progresión tumoral en el cual la enfermedad está presente pero de manera asintomática[20].

El fenómeno de *dormancy* puede ser dividido en mecanismos que antagonizan la expansión de una población celular tumoral en división (*dormancy* de la masa tumoral) y en mecanismos que resultan en el arresto del crecimiento de la célula tumoral (*dormancy* de célula tumoral o *dormancy* celular). En estos últimos, las células tumorales normalmente se dividen, pero la lesión no se expande más allá de cierto tamaño por las limitaciones de la llegada de sangre a la masa tumoral o por un sistema inmune activo. El *dormancy* celular puede ocurrir cuando las células tumorales entran en un estado de quiescencia. Así, el *dormancy* de algunas lesiones, células tumorales diseminadas o micrometástasis, implican una pausa en la progresión tumoral y la ausencia de síntomas clínicos posteriormente al tratamiento de la lesión primaria[21].

CICLO CELULAR

Las células normales de cualquier tejido necesitan de estímulos mitogénicos para pasar de un estado quiescente al estado de proliferación activo. Por el contrario, las células tumorales presentan menor dependencia de estímulos externos y se comportan como si se encontrasen continuamente sujetas a un mecanismo de estimulación autocrino. Esta independencia respecto de estimulación externa claramente rompe con las señales que normalmente operan para mantener la homeostasis tisular.

Las estrategias moleculares que permiten a las células tumorales adquirir la autonomía necesaria para su proliferación en ausencia de estimulación externa provienen de señales inapropiadas activadas en la ruta hacia el núcleo a partir de una alteración en: a) la señalización desde la membrana, b) un mediador de la vía a nivel citoplasmático, o c) factores nucleares anormalmente activos. El resultado del conjunto de señales que convergen sobre una misma célula deben ser canalizadas finalmente hacia la maquinaria de control del ciclo celular.

La maquinaria de control del ciclo celular esencialmente está formada por dos tipos de componentes: las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) y las ciclinas. El ensamblaje de estas moléculas constituye el ritmo que lleva a la célula a avanzar por las distintas fases de su ciclo.

Figura 1.II. La maquinaria de control del ciclo celular esencialmente está formada por dos tipos de componentes: las cdk y las ciclinas. El ensamblaje de estas moléculas constituye el ritmo que lleva a la célula a avanzar por las distintas fases de su ciclo.

Cuando una célula abandona su estado de quiescencia en respuesta a los estímulos mitogénicos, tiene lugar una inducción de la síntesis de ciclinas del tipo D que formarán complejos con cdk4 y cdk6. En la fase G1 tardía se produce la síntesis y formación de complejos ciclina E-cdk2 cuya activación es clave para la conclusión de esta fase y la entrada en la fase S. En esta fase es cuando se expresa ciclina A, siendo necesaria para que la maquinaria de replicación lleve a cabo la síntesis de ADN. En la fase G2 se producen complejos ciclina A-cdc2, necesarios para iniciar los preparativos para la inminente mitosis. En esta fase la actividad cdc2 es orientada hacia otros sustratos al formar complejos activos con otras ciclinas (ciclina B-cdc2)[6].

En mamíferos, la interrupción de la proliferación es mediada por la proteína p27 que evita el ensamblaje y activación del complejo cdk-E. Además se han identificado otras dos proteínas inhibidoras de la actividad de los complejos cdk-ciclina: p16 y p21. La inducción de p21 depende de p53 y ocurre cuando las células presentan daño en su ADN. La proteína p16 inhibe la activación de cdk4-D1. Durante la transición de la fase G1 a S, diferentes sustratos pueden ser blancos de los complejos cdk2-E, como por ejemplo la proteína supresora de tumores pRb. La proteína pRb se asocia con E2F, que participa en la transcripción de múltiples genes implicados en el ciclo celular[22].

CRECIMIENTO: SOBREVIDA-PROLIFERACIÓN

Las células tumorales presentan la capacidad de mantener un estado de proliferación crónica de varias formas alternativas. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales de crecimiento y división celular, asegurando así la homeostasis tisular.

Así, las células que componen la masa tumoral pueden producir factores de crecimiento, a los cuales pueden responder mediante la expresión de los receptores adecuados, resultando en una estimulación proliferativa autocrina. Alternativamente, estas células pueden enviar señales que estimulan a las células normales que las

rodean para producir factores de crecimiento. Además, la señalización mediada por los receptores también puede encontrarse desregulada al aumentar el número de estos receptores en la membrana plasmática de las células alteradas. De esta manera, las células son hiper-respondedoras a limitadas cantidades de factores de crecimiento; el mismo resultado puede obtenerse de alteraciones estructurales y funcionales de los receptores y sus vías de señalización implicadas en la regulación de la proliferación celular[11].

La independencia de factores de crecimiento para poder proliferar también puede derivar de la activación constitutiva de algunos componentes de ciertas vías de señalización. Así, se ha observado que aproximadamente el 40% de los melanomas humanos contienen mutaciones activadoras que afectan la estructura de la proteína B-Raf, resultando en una activación constitutiva de las proteínas mitogénicas implicadas en la vía de MAP quinasas[23]. También, mutaciones en la subunidad catalítica de PI3K han sido detectadas en múltiples tipos de tumores, lo que genera una hiperactivación del circuito de señalización de PI3K, incluyendo a Akt/PKB.

Por otro lado, las células tumorales no sólo pueden desregular su capacidad proliferativa al activar en forma exacerbada las vías de señalización implicadas en la proliferación celular, sino que además pueden presentar alteradas las vías implicadas en la regulación negativa de las mismas. Un ejemplo de esto implica a la oncoproteína Ras, cuyos efectos oncogénicos no resultan de una hiperactivación, sino que las mutaciones en el gen *ras* compromete la actividad de Ras GTPasa, la cual opera normalmente como un mecanismo de regulación negativa, asegurando que la transmisión de la señal proliferativa sea transitoria[11].

DISEMINACIÓN METASTÁSICA

La metástasis se puede definir como la capacidad que tienen las células malignas de abandonar el tumor primario, migrar e implantarse en los tejidos de un órgano a distancia, proliferando y formando nuevos focos tumorales. La diseminación metastásica provoca en el paciente un impacto sistémico severo, siendo el acontecimiento que ensombrece el pronóstico del paciente oncológico[24].

La capacidad de dar metástasis depende de varios pasos secuenciales e independientes[25]. Las células tumorales deben adquirir diferentes alteraciones genéticas y/o epigenéticas para poder avanzar en la progresión tumoral. La integración de las señales paracrinas provenientes del microambiente, del estroma y de las diferentes poblaciones celulares que componen los tumores puede favorecer o inhibir la aparición de esos cambios moleculares.

Estos pasos fueron resumidos en lo que se conoce como "cascada metastásica" que comprende los procesos esquematizados en la Figura 1.III.

Figura 1.III. Principales eventos de la cascada metastásica. Los primeros pasos requieren de proliferación e invasión a través de los tejidos adyacentes y la membrana basal. Las células tumorales posteriormente se arrestan en vasos de tejidos lejanos, invaden y proliferan en el sitio secundario. Modificado de Wirtz D, et al.[26].

Brevemente, los pasos que componen la cascada metastásica se pueden resumir de la siguiente manera:

FORMACIÓN DEL TUMOR PRIMARIO. Según el modelo clásico o de "Modelo de Progresión" la carcinogénesis[27], la progresión tumoral se considera "lineal" y se caracteriza porque las células van incrementando su malignidad localmente en el tumor primario hasta alcanzar las capacidades que les permitirán dar origen a la metástasis. Según esta teoría, un tumor deriva de una única célula "fundadora" que, por modificaciones genéticas, adquiere un aumento de su capacidad proliferativa sobre las células normales. A este proceso se lo denomina transformación maligna.

Por otro lado evidencias clínicas y experimentales han llevado a la hipótesis de un modelo de "Progresión Tumoral Paralela", según el cual las células se desprenderían muy tempranamente del tumor primario y adquirirían su genotipo y fenotipo metastático en sitios distantes del mismo y en forma paralela a la evolución del tumor de origen[28].

Otro ejemplo es el “Modelo de Compartimientos Transientes” de Weiss[29]. Este modelo fue propuesto para explicar la falta de aumento en la capacidad metastásica de los tumores secundarios respectos de los primarios. Si, como se predice en el modelo de progresión, la capacidad metastásica se debe a una serie de mutaciones heredables, sería de esperar que aquellas células que completaron exitosamente la cascada metastásica sean más eficientes estableciendo nuevos tumores metastásicos que el tumor primario. Sin embargo, esto no se observa en todos los sistemas experimentales estudiados. El modelo de compartimiento metastásico transiente sugiere que todas las células viables en un tumor adquieren capacidad metastásica, pero debido a eventos de cambios epigenéticos sólo una pequeña fracción celular es capaz de completar el proceso en un determinado momento. Así, aunque un tumor puede haber derivado de una célula que completó exitosamente el proceso metastásico, no todas las células dentro de este tumor retienen la capacidad para colonizar un sitio secundario debido a cambios epigenéticos azarosos o inducidos por el microambiente tumoral, o por un inadecuado acceso a la vasculatura.

Estos modelos de progresión maligna se deben tener en cuenta a la hora de establecer criterios de diagnóstico y tratamientos adecuados.

ANGIOGÉNESIS. Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren de nutrientes y oxígeno. Por ello, muchos tumores son capaces de generar una neovasculatura mediante el proceso de angiogénesis. En los tejidos normales adultos la angiogénesis se encuentra activa sólo de manera transitoria en procesos tales como curaciones de heridas y el ciclo de reproducción femenina. Sin embargo, durante la progresión tumoral, se produce un cambio por el cual el proceso angiogénico se encuentra activado la mayor parte del tiempo[25], de esta manera las células que componen el macizo tumoral pueden sobrevivir. Este cambio en la activación parece estar mediado por diversos factores, reguladores positivos o negativos de la angiogénesis, tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A), regulador positivo, y la trombospondina-1 (TSP-1) como factor negativo[30].

Sin la producción de nuevos vasos sanguíneos, el crecimiento del volumen tumoral se encuentra limitado a unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia que el

oxígeno y otros nutrientes pueden difundir a través de los tejidos. A medida que el tumor crece en tamaño, los niveles intratumorales de O2 caen y el centro de la masa tumoral se encuentra en estado de hipoxia, conduciendo a un aumento en los niveles del factor inducible de hipoxia, HIF131. Un importante blanco transcripcional de HIF1 es el factor de crecimiento pro-angiogénico VEGF[32], que en conjunto con otras citoquinas induce la neovascularización del tumor y permite su crecimiento más allá de la limitación de tamaño impuesta por la difusión del oxígeno.

INVASIÓN. La invasión local al estroma ocurre por una serie de mecanismos similares a los utilizados para penetrar las finas vénulas y así entrar al torrente sanguíneo[33]. Las células tumorales implicadas en este proceso desarrollan alteraciones típicas en su morfología así como en su capacidad de adhesión a otras células y a la ME[11]. En los tumores de origen epitelial (carcinomas), que constituyen más del 80 % de los tumores humanos, se altera profundamente la organización de las ME y las membranas basales son modificadas y atravesadas varias veces a lo largo de la cascada metastásica. Para ello es necesaria la presencia de un conjunto de enzimas extracelulares (proteasas) que catalizan la hidrólisis de proteínas. Entre dichas proteasas se destacan las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Tanto las MMPs como el uPA se han encontrado muy aumentados en numerosos tumores experimentales y humanos, siendo su medición de utilidad para predecir la evolución de los pacientes.

La capacidad de las células neoplásicas de desprenderse del tumor primario permite la invasión de los tejidos vecinos, facilita su intravasación y de este modo, favorece uno de los aspectos más insidiosos de la patología tumoral: la colonización de órganos alejados del sitio primario, lo cual constituye un proceso fisiopatológico de profunda relevancia clínica.

MIGRACIÓN. Para que la célula invada es necesario que pueda migrar en forma activa a través de la ME desorganizada por la acción de las proteasas. Las células tumorales pueden migrar en forma direccional en respuesta a gradientes de concentración de factores solubles (quimiotaxis) o bien hacia proteínas insolubles de la ME (haptotaxis). Entre los agentes que estimulan la capacidad migratoria de la célula tumoral se

encuentran los factores secretados por la propia célula tumoral, componentes de la ME y factores de crecimiento entre otros.

EMBOLISMO. La mayoría de las células individuales son rápidamente destruidas en la circulación, siendo las únicas que sobreviven, aquellas que forman trombos con otras células tumorales y con componentes de la sangre.

ARRESTO. Las células se unen a los lechos capilares de los órganos distales por adherencia a las células endoteliales o a la membrana basal sub-endotelial [34].

EXTRAVASACIÓN. La salida desde los vasos ocurre por mecanismos similares a los operados en la intravasación inicial.

CRECIMIENTO SECUNDARIO. Una vez en el parénquima del órgano blanco, las células forman un tumor secundario. Para ello debe aumentar el volumen tumoral, para superar los pocos milímetros de diámetro, al igual que ocurrió con el tumor primario, también deberá inducir un nuevo proceso angiogénico.

Se sabe que los distintos órganos no son igualmente aptos para el desarrollo de las metástasis, hecho que ha intrigado a los investigadores desde hace mucho tiempo. En 1889, Stephen Paget[35] planteó a la distribución de metástasis por el organismo como una cuestión de oportunidad. En su estudio de casos terminales de cáncer de mama, advirtió que el hígado tenía una fuerte propensión a ser sede de crecimiento secundario en comparación con cualquier otro órgano. A raíz de estas observaciones, propuso la hipótesis de la "semilla y el suelo”. Al igual que las "semillas son transportadas en todas las direcciones", las células tumorales pueden llegar a cualquier órgano a través de la circulación; sin embargo, las semillas "sólo pueden vivir y crecer si caen en un suelo fértil" y la célula tumoral se desarrollará completamente en una metástasis sólo si el microambiente proporcionado por un órgano específico es apropiado[36].

Actualmente, en base a este concepto y con el aporte de nuevos datos, se ha descripto el modelo del "nicho metastático”. Este modelo sugiere que el microambiente del nuevo destino de la célula en proceso de diseminación cambia significativamente como resultado de factores secretados por el tumor, generándose un "nicho pre-metastático"

que evolucionará en un nicho metastático tumoral después de la implantación de la célula tumoral[37]. Sin embargo, no se sabe con certeza en qué medida esta atractiva hipótesis es aplicable a los diversos tipos de tumores. Por otra parte, algunos modelos alternativos, tales como la teoría mecanística o hemodinámica, han explicado consistentemente los patrones de distribución metastática en determinados tumores[38].

Luego de su llegada al órgano blanco, la célula tumoral puede tener diferentes destinos. Así, las células diseminadas pueden residir en el órgano en forma aislada, en un estado no proliferativo de quiescencia o "*dormancy*", por un periodo prolongado de tiempo[39]. Así, las células tumorales diseminadas pueden permanecer en diferentes órganos durante largo tiempo después de eliminado el tumor primario y este estado es asintomático en el paciente oncológico.

CÉLULAS STEM Y CÁNCER

A pesar de los múltiples avances, la metástasis, la recidiva y la resistencia a las terapias antitumorales permanecen siendo algunas de las principales causas de muerte en pacientes con cáncer.

La definición de célula stem es funcional. Se denomina así a toda célula que posee las siguientes propiedades[40]:

POTENCIALIDAD. Es la capacidad de diferenciarse en células especializadas.

AUTORRENOVACIÓN. Es la capacidad de dividirse manteniendo su estado indiferenciado.

Originariamente, se consideraba que las únicas células stem eran las células embrionarias; actualmente se sabe que las células stem adultas son un pequeño porcentaje de las células que conforman los sistemas de órganos donde dan lugar a tipos celulares específicos, como la piel, la glándula mamaria, intestino y sistema nervioso[41,42].

Las células stem tumorales han sido implicadas tanto en la iniciación como en el mantenimiento del tumor primario, así como en la migración celular y el establecimiento de metástasis en sitios distantes[43].

Tradicionalmente las células tumorales fueron consideradas como una población homogénea hasta un estadio relativamente tardío de la progresión tumoral, cuando la hiper-proliferación en conjunto con el aumento de la inestabilidad genómica conlleva a la generación de sub-poblaciones clonales. Muchos tumores humanos histopatológicamente diversos reflejan esta heterogeneidad clonal, conteniendo regiones delimitadas por varios grados de diferenciación, proliferación, vascularización, inflamación o invasividad. Sin embargo, en los últimos años se ha acumulado evidencias que señalan la existencia de una nueva clase de células neoplásicas en los tumores, conocidas como “células stem tumorales” o “células iniciadoras de tumores”. Una pequeña parte de las células que componen un tumor tiene capacidad clonogénica[44]. Además, se ha hipotetizado que los tumores pueden originarse de la transformación de células stem de tejidos adultos normales o de células progenitores más diferenciadas que adquirieron la capacidad de autorrenovación[45].

Algunas teorías actuales postulan que el crecimiento de los tumores, como el de cualquier órgano, estaría sustentado por las células stem tumorales[46] (Figura 1.IV).

Figura1.IV. Cómo surgen las células stem tumorales. Se ha propuesto que el cáncer puede surgir cuando algunos eventos producen mutaciones en las células stem adultas, afectando su habilidad para regular la división celular. La figura ilustra 3 hipótesis principales acerca de cómo puede surgir una célula stem tumoral. Adaptado de Godthwaite[47].

Por lo tanto, las células stem/progenitoras que componen este compartimiento, tienen la capacidad de perpetuarse a ellas mismas y a la vez generar células maduras de un tejido particular a través de la diferenciación. El estudio de la biología de las células stem también podría proveer de nuevas herramientas para abordar terapéuticas contra

el cáncer. Esta hipótesis está basada en tres principios: 1- los mecanismos implicados en la autorenovación de las células stem normales y tumorales son similares, 2- es posible que las células tumorales surjan de células stem normales y 3- los tumores podrían contener células stem malignas con alto potencial proliferativo que conduzcan a la formación y crecimiento del tumor, así como su diseminación. Sin embargo las células stem/progenitoras tumorales son una minúscula parte dentro de él. Este hecho presenta un gran desafío tanto para las terapias como para la investigación básica. Esta circunstancia explicaría porque los tratamientos convencionales que reducen sustancialmente la masa tumoral removiendo células proliferantes fallan para curar al paciente en algunos tipos de cáncer, dado que las células stem/progenitoras tienen generalmente una tasa de proliferación muy baja y son insensibles a estos tratamientos[48,49].

Algunas evidencias demuestran que muchas vías de señalización que se encuentran clásicamente asociadas con el cáncer, también pueden regular el desarrollo normal de células stem. Un ejemplo de esto es la prevención de la muerte celular por apoptosis al forzar la expresión del oncogen *bcl-2*, que resulta en un aumento en el número de células stem humanas *in vivo*. Si las vías de señalización que normalmente regulan las propiedades de las células stem pueden conducir a la tumorigénesis cuando se encuentran desreguladas, entonces estas células podrían ser el blanco de transformación en ciertos tipos de cáncer[45].

Cabe destacar que estudios recientes han establecido una relación crucial entre la transición epitelio-mesenquimática (TEM) y la adquisición de propiedades moleculares y funcionales de células stem[50]. Como la TEM algunas veces puede ser iniciada por estímulos extracelulares y factores del microambiente, estos hallazgos proveen una posible explicación para la generación de células stem tumorales *de novo* a partir de células tumorales diferenciadas y sugiere que la TEM es una fuerza alternativa y/o adicional en la tumorigénesis.

Trabajos recientes demostraron que los patrones de expresión génica de células stem normales y tumorales comparten similitudes con los perfiles de expresión génica de células que atraviesan por TEM[51]. Esto genera un panorama más amplio respecto al

origen de diferentes tipos de tumores, ya que aún no es claro si derivan de células que han sufrido una TEM o si estos tumores representan una expansión de células stem pre-existentes que expresan marcadores de TEM[43].

Si el crecimiento tumoral y las metástasis son conducidas por una pequeña población de células stem tumorales, esto podría explicar el por qué fallan las terapias que normalmente son capaces de erradicar tumores sólidos. Aunque las drogas disponibles actualmente son capaces de disminuir la capacidad metastásica de ciertos tumores, estos efectos son generalmente temporarios en los pacientes oncológicos[46].

Dado que las células stem tumorales que atraviesan una TEM son un un blanco terapéutico prometedor, en la actualidad varios estudios están enfocados en realizar un paneo de compuestos químicos para identificar agentes con toxicidad selectiva contra estas células[52].

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 2

CÁNCER DE MAMA

CÁNCER DE MAMA

LA GLÁNDULA MAMARIA

La mama es una glándula túbulo-alveolar de secreción externa, considerada como glándula sudorípara modificada en cuanto a su estructura y función. Embriológicamente, deriva de la cresta neural epidérmica. El desarrollo morfológico y funcional de la glándula mamaria normal, tanto en humanos como en ratones, ocurre principalmente durante el período post-natal, e implica el pasaje a través de distintos estadios, comenzando en la pubertad y continuando durante la preñez.

Al llegar a la pubertad la mama crece y se desarrolla. El desarrollo ocurre por efecto de las hormonas Estrógeno y Progesterona secretadas por el ovario.

Durante la pubertad se constata la elongación de los conductos mamarios, el aumento de la altura de las células y del grosor del epitelio, y el inicio de la formación de pequeños botones epiteliales (futuros lobulillos) a partir de los ductos terminales. De forma concomitante se observa el aumento de la densidad tejido conjuntivo periductal. Con la estimulación hormonal cíclica continúa el crecimiento tanto del estroma como del parénquima (incluido mayor desarrollo de los lobulillos), lográndose progresivamente una distribución espacial armónica que culmina con las características propias de la mama en el adulto. En etapas iniciales, el incremento de la grasa determina la aparición del botón mamario, lo cual sirve, a su vez, de matriz o soporte para el futuro crecimiento del parénquima glandular. Los Estrógenos actúan preponderantemente estimulando los conductos lactíferos, mientras que la Progesterona produce crecimiento en los alvéolos.

Así, la glándula mamaria humana está formada por 5 a 12 sistemas independientes de ductos lactíferos arborizantes o lóbulos separados entre sí por tejido conectivo y adiposo[53]. Cada uno de estos lóbulos consiste en una unidad funcional abierta a la superficie del pezón que lleva a un ducto lactífero. Éstos se ramifican en ductos epiteliales terminales que culminan en una estructura lóbulo-alveolar llamada lobulillo[54] (Figura 2.I).

Tanto en humanos como en ratón, el árbol mamario ductal está formado por unidades funcionales básicas, histológicamente constituidas por dos tipos celulares principales: una capa interna de células secretorias luminales (LEP) y una capa externa, contráctil de células mioepiteliales (MEP). Además existen células basales, presumiblemente células progenitoras de mioepiteliales y células stem[53,54]. Las células MEP, ubicadas entre el estroma y el lumen, se encuentran en un sitio ideal desde donde pueden controlar diversos aspectos fundamentales de la función luminal, principalmente aquellos relacionados con la respuesta a diferentes señales ya sean endocrinas o parácrinas[55,56,57] (Figura 2.I).

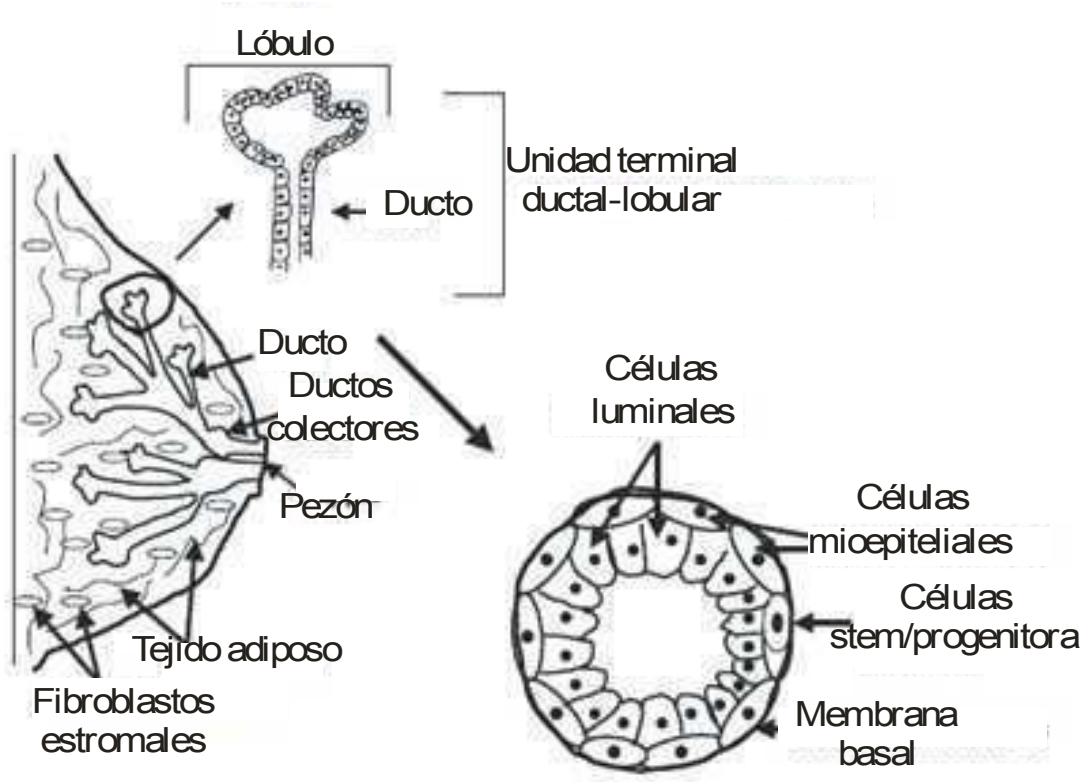


Figura 2.I. Estructura de la glándula mamaria. Adaptado de Dimri y colaboradores[58]. La figura esquematiza la disposición de los principales componentes celulares de la mama humana.

EL CÁNCER DE MAMA

Dentro de la patología tumoral, el cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor incidencia en la población femenina y con mayor tasa de mortalidad en los países occidentales. Las estadísticas demuestran que 1 de cada 8 mujeres puede, en algún momento de su vida, padecer dicha enfermedad[59]. El cáncer de mama es un importante problema de salud pública. En la Argentina, cada año, mueren aproximadamente 5.400 mujeres y se estima que se diagnostican alrededor de 17.000 casos nuevos[60,1]. En relación a la mortalidad en general, los tumores malignos ocupan la segunda causa de muerte, en mujeres de todo el mundo. Al analizar la distribución de los sitios tumorales más frecuentes en mujeres, se observa que el cáncer de mama ocupa el primer lugar, lo que representa el 20,3% de las muertes por tumores malignos[61].

Debido a estos datos, la patología oncológica mamaria ha sido y continúa siendo centro de numerosos estudios que involucran quimioprevención, agentes etiológicos y tratamiento. Resulta importante destacar que la reducción en la tasa de mortalidad por cáncer mamario puede ser explicada, casi en su totalidad, por los avances realizados en el diagnóstico temprano[62].

Además, existen otras evidencias en relación a la disminución del riesgo de desarrollar cáncer de mama: Primero, algunos estudios indican que poblaciones que migran de áreas de bajo riesgo hacia áreas de alto riesgo de cáncer de mama, empiezan a desarrollar tumores de mama con una incidencia similar a la del nuevo país habitado en sólo una o dos generaciones. Segundo, sólo una pequeña proporción de todos los cánceres de mama están relacionados a la herencia genética o a la exposición a agentes físicos y químicos del ambiente. Tercero, estudios poblacionales demostraron que modificaciones en el estilo de vida han sido asociados con un menor riesgo de adquisición de cáncer de mama. Los principales factores de riesgos modificables son inactividad física, sobrepeso, abuso de bebidas alcohólicas y la dieta[5].

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES MAMARIOS

El carcinoma mamario representa un grupo de tumores que muestra un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clínica. La clasificación histológica actual de los carcinomas de mama no refleja la heterogeneidad de los tumores en su comportamiento biológico, ni permite identificar los pacientes que presentarán mejores respuestas frente a las diferentes modalidades terapéuticas. Actualmente se asume que, la diversidad clínica y pronóstica de carcinomas de mama que son semejantes y homogéneos en cuanto a sus factores pronósticos clásicos, se establece a nivel molecular, al expresar distintos genes que les confieren variabilidad biológica y pronóstica[63].

El avance de las tecnologías de análisis genómico ha permitido clasificar los carcinomas de mama en cinco subtipos[64]:

- Luminal A
- Luminal B
- HER2-positivo
- Basal
- Similar a la mama normal

Los carcinomas de mama tipo luminal son los subtipos con mejor pronóstico y se caracterizan por expresar el gen del receptor estrogénico (ER), genes asociados y queratinas de bajo peso molecular (Citoqueratinas 7, 8 y 18), de forma similar al epitelio luminal de los conductos mamarios. Al expresar receptores de estrógenos, estos tumores pueden tratarse con tamoxifeno (modulador selectivo del receptor de Estrógeno, agonista en mama) o inhibidores de la enzima aromatasa (bloquea la transformación de Testosterona en Estrógenos), pero muestran una baja respuesta a la quimioterapia neoadyuvante[65].

El carcinoma de mama HER2-positivo muestra expresión aumentada de genes asociados a c-erbB-2 y suele asociarse a otros marcadores de mal pronóstico,

incluyendo alteraciones en genes como topoisomerasa II alfa, GATA4. Alrededor del 50% de estos pacientes responden al tratamiento con trastuzumab (anticuerpo monoclonal contra el receptor HER2, impidiendo la proliferación celular)[65].

El subtipo basal se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas características de la capa basal (Citoqueratinas 5/6 y 17) y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Estos tumores suelen presentar mutaciones en el gen supresor de tumor p53, sobre-expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se caracterizan por la ausencia de expresión del receptor de estrógenos y de genes relacionados y de HER2. Este subtipo se asocia a la mutación en el gen supresor de tumor BRCA1 (*Breast Cancer 1,* Cáncer de mama 1) y presenta el comportamiento más agresivo a pesar de su alta sensibilidad a la quimioterapia[65,66].

Dentro de los tumores humanos de fenotipo basal (o *Basal like*) se puede incluir a los llamados “triple negativos”: ER-, PR-, HER2-. Es decir que se caracterizan por la falta de expresión de los receptores de estrógeno y progesterona, así como la falta de expresión o amplificación de HER2. Los tumores triple negativo conforman aproximadamente el 10-24% de todos los casos de cáncer de mama en el mundo, y generalmente se presentan en las pacientes más jóvenes y en pacientes con mutaciones en el gen BRCA1[67].

El término cáncer de mama triple negativo es un término clínico que se correlaciona con la clasificación molecular pero no puede ser usado para definir ninguno de los subtipos moleculares antes definidos. Por varias razones los tumores de mama triple negativos han captado la atención de patólogos y oncólogos. Esto es porque se ha reportado que estos tumores son generalmente más agresivos y con mayor probabilidad de formar metástasis[68,69]. A diferencia de otros cánceres de mama, los tumores triple negativo son resistentes a las terapias actuales que tienen como blanco HER2, tales como trastuzumab, terapias hormonales con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa.

El carcinoma de mama de tipo normal comparte características del tejido mamario normal, muestra una fuerte expresión de genes normalmente expresados en el tejido adiposo y baja expresión de genes epiteliales luminales[65].

Aunque actualmente se considera que el análisis de los perfiles de expresión génica constituye la mejor forma de clasificar los carcinomas de mama, su uso se encuentra limitado debido al costo de las técnicas empleadas y la dificultad de aplicarlas en material parafinado[70].

CÉLULAS STEM MAMARIAS

Las células stem normales y tumorales han sido identificadas en la glándula mamaria en base a la expresión combinada de algunos marcadores de superficie tales como Sca-1, $CD24^-$, CD 49f[71], $ALDH^+$ [72], $CD44^+$, $CD133^+$ [73]. Aún hoy en día no se puede definir un grupo de marcadores que caractericen completamente una población de células stem, dado que todos los marcadores reportados en la actualidad son compartidos también por células progenitoras parcialmente diferenciadas e incluso por células totalmente diferenciadas y lo que varía entre las distintas sub-poblaciones es el grado de expresión de estos marcadores. Por ello, se considera que el marcador final que determina la característica de célula stem mamaria es la capacidad de generar una glándula mamaria completa *in vivo*, demostrando así su potencial de auto-renovación, así como su habilidad para diferenciarse a todos los tipos celulares que conforman la glándula mamaria[71] (Figura 2.II)

FIGURA 2.II. MODELO DE LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN TUMORAL BASADA EN LA TEORÍA DE LA CÉLULAS STEM TUMORALES. MODIFICADO DE MICHAIL SHIPITSIN Y KORNELIA POLYAK[74].

IMPORTANCIA DE LOS MODELOS TUMORALES MAMARIOS

En los últimos años, el uso de estrategias genéticas ha permitido el desarrollo de múltiples modelos murinos de cáncer de mama capaces de imitar algunas de las condiciones humanas. Estos modelos proveen una herramienta única para el estudio de

comportamiento tumoral, así como de biomarcadores de relevancia clínica de la enfermedad temprana[75]. La mayor parte de los estudios experimentales de esta patología se realizan empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos, que son inoculadas en ratones. Alternativamente, los tumores son inducidos en ratones por radiación, carcinógenos químicos o arreglos genéticos.

El cultivo celular se ha erigido en una herramienta irremplazable en la identificación de los mecanismos celulares y moleculares que operan en la carcinogénesis y en el estudio de la biología tumoral. Las células tumorales en cultivo muestran rasgos típicos, que las distinguen de las células normales del mismo origen y se asocian con sus principales propiedades biológicas.

En muchos tumores mamarios coexisten células mioepiteliales normales con células luminales neoplásicas. Las células mioepiteliales cumplen una función fundamental en el desarrollo de las patologías tumorales mamarias ya que no solo son capaces de modular la proliferación, invasión y angiogénesis de las células luminales, sino que además se ha descripto la existencia de mioepiteliomas[76,77]. Se especula que las células mioepiteliales tumorales actuarían creando un microambiente favorable para la progresión tumoral, pero poco se conoce acerca de los mecanismos involucrados en la interacción entre ambos componentes celulares[78,79].

Si bien los modelos *in vitro* que se utilizan para el estudio del cáncer de mama son extremadamente útiles, la mayor parte de los mismos están constituidos por un único tipo celular por lo que los mismos no son del todo representativos de la fisiología normal ni alterada de la glándula mamaria[80]. Además, la mayoría de los modelos murinos existentes son incapaces de generar metástasis en el ganglio drenante, una de las características más representativas de esta patología.

En el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” se han desarrollado diferentes modelos experimentales murinos de cáncer mamario para estudiar la progresión tumoral. Así, para llevar adelante este proyecto se cuenta con la línea celular LM38, derivada del tumor mamario murino transpantable M38 que surgió espontáneamente en una hembra BALB/c del bioterio del Instituto. Esta línea celular tumoral mamaria murina es capaz de

metastatizar en ganglio drenante y pulmón. Además, presenta células epiteliales luminales (LEP) rodeadas por células mioepiteliales (MEP)[56], componentes celulares críticos del epitelio glandular mamario (Figura 2.III).

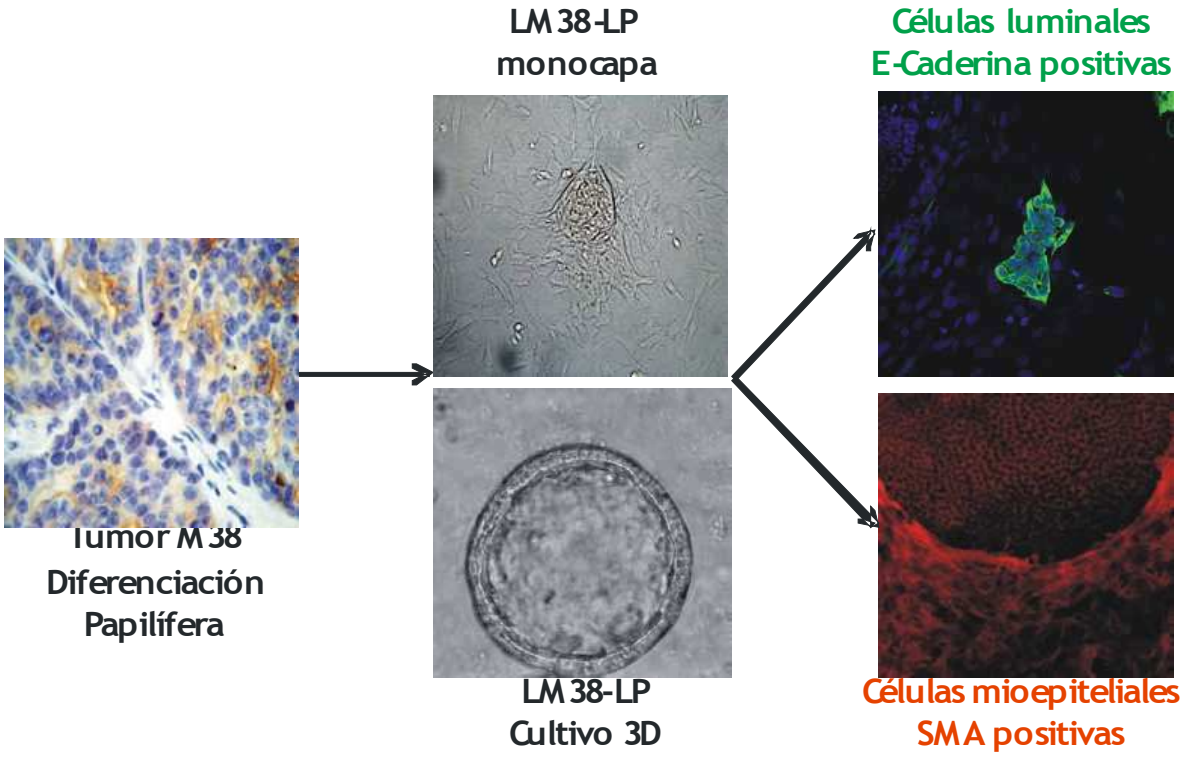


Figura 2.III. Esquema resumiendo algunas de las características de la línea celular tumoral mamaria murina LM38-LP.

Debido a que con los sucesivos pasajes LM38 mostró una variación en su fenotipo, se definieron dos sub-líneas: LM38-LP (repique bajo, pasajes del 7 al 20) y LM38-HP (repique alto, pasajes del 55 a 65). Mientras que la primera presenta poblaciones celulares similares a las del tumor parental, en la línea LM38-HP se perdieron casi completamente las células MEP quedando compuesta principalmente por células pequeñas ahusadas que no forman islotes. A partir de la LM38-LP, mediante el método de dilución límite, se obtuvieron varios clones similares formados por células ahusadas grandes de características MEP de los que se eligió para su caracterización el LM38-D2. Por el método utilizado nunca se logró aislar un clon de células LEP ya que

siempre se obtuvieron clones que rápidamente se diversificaban en los fenotipos anteriormente descriptos.

In vivo, la línea LM38-LP produce tumores con un patrón histológico y un comportamiento biológico idénticos al tumor parental M38. Las principales propiedades de las diferentes sublíneas establecidas a partir de LM38, se resúmen en la tabla 2.I

	LM38-LP	**LM38-HP**	**LM38-D2**
Tumorigénesis	20/20 (100%)	6/20 (33%)	20/20 (100%)
Latencia (Días)	5 (5-19)	19 (19-61)	24,5 (18-69)
Tasa de crecimiento (mm/día)	0,22 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,02
Metástasis pulmonares	20/20 (100%)	3/6 (50%)	2/20 (10%)
Metástasis ganglionares	11/20 (55%)	1/6 (16%)	0/20 (0%)
Metástasis experimentales	40,5 (9-80)	0 (0-3)	0 (0-1)

TABLA 2.I. PROPIEDADES *IN VIVO* DE LAS LÍNEAS CELULARES LM38-LP, LM38-HP Y LM38-D2 DERIVADAS DEL TUMOR M38[56].

Los resultados observados en la Tabla 2.I nos sugieren que el comportamiento biológico de los tumores está dado por la cooperación entre distintas poblaciones celulares y que es necesario conocer dichas interacciones para controlar su desarrollo con diferentes estrategias terapéuticas.

Además, el modelo LM38-LP tiene similitud con el tumor mamario humano de fenotipo basal, muchas veces asociados a los tumores triple negativo (ER-, PR- HER2-), de difícil tratamiento en la clínica ya que si bien responden a antraciclinas y taxanos aún así tienen alto riesgo de recaída. Es decir que LM38-LP constituye un modelo preclínico de gran importancia.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 3

RETINOIDES. CARACTERÍSTICAS Y USO EN LA CLÍNICA

EL SISTEMA RETINOIDE

VÍA CLÁSICA DEL SISTEMA DEL ÁCIDO RETINOICO

La vitamina A es un compuesto liposoluble esencial para la formación, el desarrollo y el mantenimiento de muchos tejidos tales como la piel, los huesos, y la vasculatura, así como para la promoción de la buena visión y la respuesta inmunológica. La vitamina A circula en sangre como retinol y la forma *trans* del ácido retinoico, ATRA, es el principal metabolito activo de esta vitamina. Así, el ATRA es esencial en el control del desarrollo, la proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares[81], incluyendo células embrionarias y adultas (Figura 3.I).

Figura 3.I. Representación gráfica de las principales funciones naturales de los diversos retinoides.

En la mayor parte de los animales, los retinoides provienen de la dieta como retinil éster y/o del β-caroteno de las plantas, y no pueden ser sintetizados *de novo*. En sangre, el retinol forma un complejo con la proteína sérica de unión al retinol de 21 kDa (RBP4). El retinol es liberado desde la proteína RBP4 a las células blanco al interactuar con un receptor de membrana con sitio de unión para RBP4, codificado por el gen STRA6. Además de la correcta expresión y funcionalidad de STRA6, se requiere de la acción de lecitina/retinol acil-transferasa, que es la enzima responsable de la esterificación del retinol, para la captación y la acumulación del mismo en las células. En humanos, mutaciones en STRA6 resultan en una amplia variedad de malformaciones congénitas, incluyendo anoftalmia, defectos cardíacos, hipoplasia pulmonar y retraso mental entre otros. Dentro de la célula existen varias enzimas responsables de la conversión del retinol a retinil éster o retinaldehido y subsecuentemente en ácido retinoico: forma *trans* (ATRA) o 9-*cis*[82] (Figura 3.II).

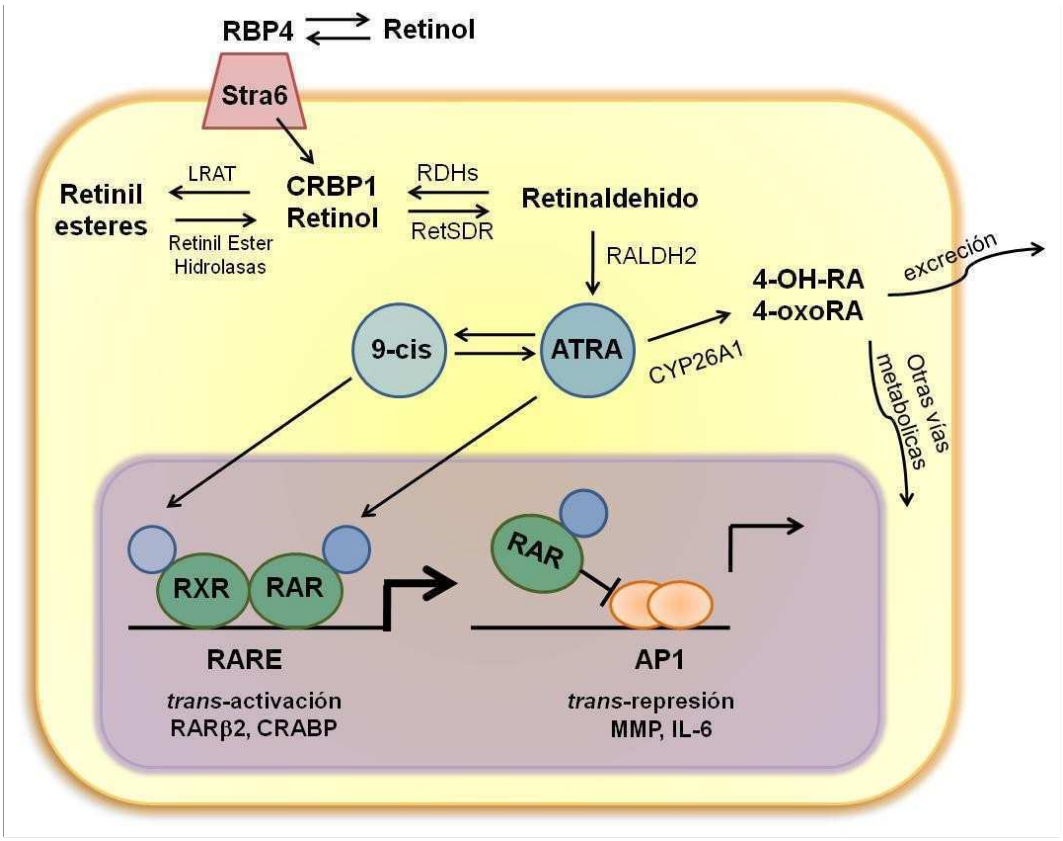


Figura 3.II. Representación gráfica de los principales eventos de la activación de la vía clásica del ácido retinoico.

Los efectos de los retinoides están mediados principalmente por receptores retinoideos que pertenecen a la familia de receptores nucleares. Estos receptores incluyen a los receptores de ácido retinoico (*Retinoic Acid Receptors,* RARs, para los isómeros ATRA y 9-*cis* de ácido retinoico) y a los receptores rexinoideos (*Rexinoid Acid Receptors,* RXRs, sólo para el isómero 9-*cis*). Cada tipo de receptor presenta varios subtipos (α,β y γ) y, a la vez cada uno de ellos puede sufrir *splicing* alternativo generando distintas isoformas con distintas propiedades regulatorias y funcionales[83]. RARα presenta un patrón de expresión ubicuo en adultos y altamente distribuido en tejidos embrionarios. Por otro lado, la expresión de RARβ se encuentra más limitada en adultos, expresándose principalmente en riñón, adrenal, médula espinal, músculo y próstata[84].

Como la mayoría de los receptores nucleares, los RARs presentan una estructura modular compuesta por 6 regiones conservadas A-F (Figura 3.III).

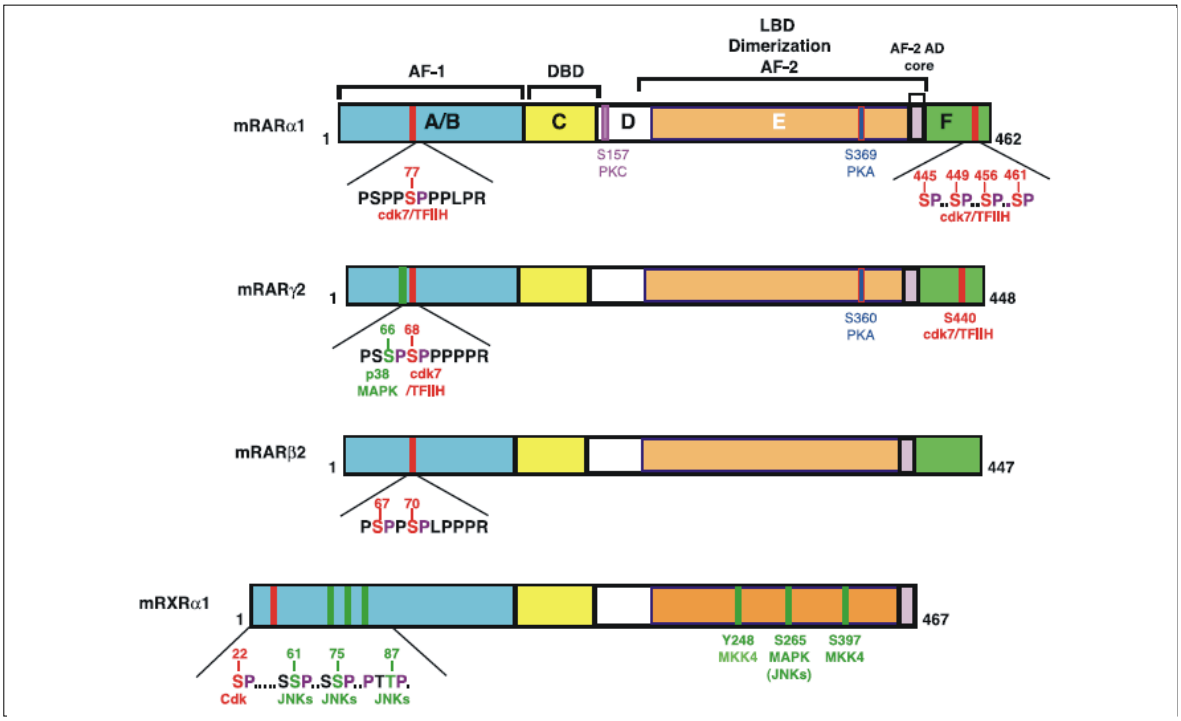


Figura 3.III. Representación esquemática de los dominios funcionales y los principales sitios de fosforilación de los receptores nucleares de ácido retinoico. Adaptado de Bastien, Rochette-Egly[85].

La región C se encuentra altamente conservada y es la que porta el dominio de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), el cual le confiere la capacidad de reconocer en forma específica secuencias particulares del genoma. La región E es la segunda región más conservada y es donde se encuentra el dominio de unión al ligando (*Lingand Binding Domain,* LBD). Es un dominio altamente complejo que contiene un bolsillo de unión al ligando, el principal dominio de dimerización y la función de *trans*-activación dependiente de ligando (AF-2). El extremo N-terminal o A/B contiene el sitio con la función de activación transcripcional independiente de ligando (AF-1), susceptible a múltiples fosforilaciones que pueden regular la actividad transcripcional del receptor[85]

así como su capacidad para interactuar con moléculas que integran otras vías de señalización.

Mientras que los receptores RARs forman dímeros con los receptores RXRs, los RXRs pueden formar heterodímeros con un amplio rango de receptores nucleares, incluyendo receptores de hormona tiroidea, de vitamina D, de andrógenos, PPAR y receptores huérfanos[82]. De esta manera, los receptores retinoideos pueden funcionar como una plataforma capaz de integrar múltiples estímulos celulares y generar respuestas muy diversas.

Los pasos posteriores a la unión del ligando a su receptor nuclear son ampliamente conocidos. Esto permite el diseño de moléculas que presentan selectividad para RAR, RXR o incluso para los diferentes isotipos de RARs, además de agonistas y antagonistas específicos. La tabla 3.I muestra algunos retinoides sintéticos empleados como agonistas o antagonistas específicos para algunos receptores retinoideos.

Receptor Retinoideo	**Agonista**	**Antagonista**
Pan-RAR	LGD1550	LG100815
RARα	AM580	BMS614, Ro41-5253
RARβ	BMS641, BMS453	LE135, CD2665

RARγ	SR11254	SR11253, CD2665
Pan-RXR	BMS649, LGD1268	LG100754, LG101208

Tabla 3.I. Se muestran algunos de los retinoides sintéticos más utilizados como agonistas o antagonistas específicos para diferentes receptores retinoideos.

La búsqueda de moduladores selectivos para los diferentes isotipos de receptores retinoideos persigue primero, reducir la toxicidad asociada con las terapias basadas en retinoides actualmente; segundo, conseguir respuestas biológicas más específicas; tercero, definir mejor el rol fisiológico de cada isotipo de receptor retinoideo respecto a fenómenos como proliferación, diferenciación y apoptosis; y cuarto, clarificar el potencial de RXR como blanco terapéutico en vista a que el mismo se encuentra involucrado en diversas vías de señalización intracelulares.

Estos receptores nucleares funcionan como factores de transcripción activados por ligando y pueden regular la transcripción de una amplia variedad de genes implicados en proliferación y desarrollo. Una característica que los receptores retinoideos comparten con todos los receptores nucleares es que pueden interactuar con múltiples proteínas co-activadoras y co-represoras, alterando el estado de los dominios regulatorios de los genes blanco[86].

En ausencia de ligando, los receptores RARs/RXRs se encuentra principalmente en el núcleo celular unidos a secuencias de ADN específicas altamente compactadas. En respuesta a la activación por ligando, los complejos RAR/RXR liberan los co-represores y reclutan múltiples co-activadores, incluyendo complejos remodeladores de la cromatina dependientes de la adenosina trifosfato (ATP), y proteínas que poseen actividad de histona acetiltransferasa. Existen múltiples evidencias que sugieren que el reclutamiento diferencial de co-activadores y co-represores por parte de los RARs podría ser la base molecular para las diferentes actividades biológicas exhibidas por los retinoides[87].

Por otro lado, los receptores nucleares, entre ellos los RARs y RXRs, presentan actividad de transrepresión, que se caracteriza por la habilidad de reprimir factores de transcripción tales como AP1 y NFκB en múltiples tipos celulares. Algunos ligandos de los receptores retinoideos son capaces de exponer esta actividad represora, la cual parece ser la base de los efectos terapéuticos como agentes anti-inflamatorios y/o anti-proliferativos[88].

El complejo AP1 regula la expresión de varios genes involucrados en la transformación oncogénica y la proliferación celular, tales como los genes que codifican metaloproteasas, VEGF y TGFβ. Además, se sabe que muchas células requieren de la activación de AP1 para la promoción tumoral *in vivo*[88].

Los receptores retinoideos se unen como heterodímeros RAR/RXR a regiones específicas del ADN llamadas "elementos respondedores al ácido retinoico": RARE[89]. Los sitios RARE han sido identificados en los promotores de un gran número de genes blanco. Algunos genes que presentan estos elementos codifican para el receptor de ácido retinoico RARβ2 (implicado en procesos de diferenciación y apoptosis), el citocromo CYP26 (vinculado al metabolismo del ATRA), las proteínas transportadoras de retinol CRBP I y CRBP II y en múltiples genes Hox[89]. La vía clásica de activación de los receptores de ácido retinoico es también conocida como "vía genómica". En la misma el retinoide se une al heterodímero RXR-RARα1, esta unión gatilla una señal de liberación de co-represores y de reclutamiento de co-activadores y enzimas que modifican las histonas para permitir los cambios conformacionales necesarios para la transcripción del ADN[90]. Así, una vez activo, el receptor RARα1 es capaz de inducir la transcripción de algunos de los genes que contienen algún sitio RARE en su promotor (Figura 3.II).

VÍAS NO GENÓMICAS DEL SISTEMA DEL ÁCIDO RETINOICO

En los últimos años se han reportado nuevas formas de regulación de los receptores retinoideos, así como nuevas funciones. Estudios recientes demostraron que los receptores de ácido retinoico pueden integrar múltiples cascadas de fosforilación. Por

lo que además de sus clásicos efectos transcripcionales, los RARs pueden mediar acciones rápidas independientes de la transcripción, como es la activación de la vía de transducción de señales del fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) o la vía de MAPK[91]. Más aun, diferentes retinoides pueden mediar vías de señalización distintas de aquellas reguladas por los receptores RARs. Un ejemplo de esto es la capacidad del ATRA para modular la vía de señalización AMPc-PKA, la cual puede conducir a la diferenciación celular independientemente de la activación de receptores RARs.

Los efectos rápidos del ácido retinoico independientes de su actividad clásica transcripcional juegan un rol importante en diferentes contextos fisiológicos normales y/o alterados. El descubrimiento de estos “efectos no-genómicos” del ácido retinoico y/o RARs quita peso a la idea de que sólo aquellas células que expresan RARs funcionales (con capacidad de reconocer sitios RAREs) son capaces de responder a los retinoides [83,85], ampliando aun más el panorama de acción de estas moléculas.

RETINOIDES Y CÁNCER

Debido a su rol en la regulación del crecimiento y diferenciación celular en modelos preclínicos, los retinoides naturales y sintéticos están siendo ampliamente evaluados en ensayos clínicos para el tratamiento y prevención del cáncer.

Uno de los principales mecanismos por el cual el ácido retinoico es capaz de modular la progresión del ciclo celular es el aumento de la tasa de proteólisis de proteínas claves en la regulación del ciclo celular, como ciclina D1[82]. Esta regulación negativa en la estabilidad de una proteína no se limita sólo a ciclina D1, sino que afecta a diversas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. De todas formas, en algunos tipos de cáncer se puede observar una sobre-expresión de ciclina D1, esto podría contribuir a una resistencia a los efectos anti-proliferativos del ácido retinoico[92]. Además, el ácido retinoico contribuye al arresto del ciclo celular mediante el aumento de la expresión y la estabilidad post-traduccional de algunos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, incluyendo p21 y p27[93].

Mediante estudios en animales se pudo establecer que una dieta deficiente en vitamina A aumenta la incidencia de tumores espontáneos e inducidos[94]. De todas maneras, en la actualidad esto es discutido debido a los resultados altamente variables entre diferentes tumores.

Si bien los estudios en fase I y II con diversos retinoides analizados (especialmente ATRA y retinol) en pacientes con cáncer, han alcanzado resultados controvertidos, es bien conocida la importancia de los retinoides como agentes quimiopreventivos, además de existir protocolos clínicos ya validados para leucemias (tumores líquidos)[95,96]. El efecto más conocido de los retinoides a nivel clínico es sobre la Leucemia Promielocítica Aguda (*acute promyelocytic leukemia*, APL), la cual es consecuencia de la traslocación del gen que codifica para el receptor RARα[96]. En los pacientes con APL, el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando del gen de RARα se encuentran fusionados con el extremo N-terminal del gen PML (leucemia promielocítica), el resultado es una proteína de fusión llamada PML-RARα[97,98] (Figura 3.IV).

Figura 3.IV. Fenómenos asociados a la Leucemia Promielocítica Aguda. A) La traslocación de los cromosomas 15 y 17 dan lugar a la proteína de fusión PML-RARα. B) La proteína PML-RARα junto con RXR y PU1 se une a sitios RARE y recluta co-represores. C) El tratamiento con ATRA o trióxido arsénico (ATO) media la degradación del complejo PML-RARα, el cual es reemplazado por el heterodímero RARa-RXR, que recluta co-activadores e induce la transcripción de genes blanco. Modificado de Saeed, et. al[99].

Esta proteína de fusión interfiere con la *trans*-activación del receptor RARα al homodimerizar o heterodimerizar con RXR. Sin embargo, PML-RARα es una proteína respondedora a ligando, por lo que el tratamiento con ácido retinoico resulta en la remisión parcial a completa de la enfermedad en pacientes con APL. Básicamente, las terapias de tratamiento con ácido retinoico permiten la reactivación de cascadas de señalización normales que se encontraban alteradas en estas células tumorales[100].

Sin embargo, la vía de señalización de los retinoides generalmente se encuentra comprometida en ciertos carcinomas[82]. Esto incluye la observación de algunos estudios histopatológicos donde se demostró que RARs específicos, como lo son las isoformas inducibles RARβ2 y RARα2, están inhibidas en cáncer[101,102]. Varios estudios han demostrados que RARβ2 puede actuar como un supresor tumoral, lo cual es apoyado por el hecho de que la expresión de RARβ2 se encuentra alterada en muchos tejidos neoplásicos, como en carcinomas de pulmón, de cabeza y cuello o cáncer de mama[103,104]. En muchos carcinomas la falta de expresión de RARβ2 no se debe a una mutación en el gen que codifica para el receptor, sino a una alteración en el estado de metilación del promotor de este gen. Este hecho sugiere que la reactivación farmacológica del promotor de RARβ2 puede ser posible mediante el empleo de agentes desmetilantes e inhibidores de enzimas desacetilasas.

La evidencia experimental sugiere que los retinoides afectan la expresión génica tanto en forma directa, activando y/o reprimiendo genes específicos, como indirecta, interfiriendo con diferentes vías de transducción de señales. El ácido retinoico inhibe el crecimiento celular y promueve la diferenciación celular, por lo que la activación farmacológica de determinados RARs puede presentar un efecto anti-tumorigénico[105].

La inducción de apoptosis es una característica única del fenretinide, el retinoide más estudiado en ensayos clínicos de quimioprevención de cáncer de mama debido a su acumulación selectiva en el tejido mamario[106]. A pesar de que en la actualidad y con resultados poco claros, ya se está evaluado el potencial terapéutico de varios retinoides en diversos tipos de tumores sólidos como en el cáncer de mama, donde es utilizado junto con tamoxifeno como prevención del cáncer contralateral en pacientes pre-menopáusicas (fase II)[81,82], poco se conoce sobre el rol de este sistema en la progresión de los tumores sólidos[107,108,109,110]. Se ha demostrado que la proteína citosólica transportadora de retinol CRBP I, que regula la biosíntesis del ácido retinoico, está inhibida en algunos cánceres de mama y en otros tumores humanos[111,112,113]. Mira-y-Lopez y colaboradores han demostrado que inactivando en homocigosis algunas de las isoformas de los receptores RARs en ratones, aumenta la susceptibilidad de éstos a adquirir cáncer de mama. Además, los mismos autores demostraron que la activación

específica del receptor RARα y la inactivación de RARγ puede ser un efectivo agente terapéutico contra el cáncer de mama[114].

Por otro lado, existen pocos trabajos sobre el rol de los retinoides como reguladores de la migración, invasión y la metástasis. Algunas de las proteasas importantes en este proceso incluyen al activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), su receptor (uPAR) y las metaloproteasas (MMPs). Algunos autores han demostrado que el ácido retinoico inhibe la MMP-9 y de esta manera reduce el fenotipo metastásico[113]. Otros, sin embargo, demuestran que los retinoides aumentan la producción de uPA en los tumores mamarios[107], lo que se relaciona con un fenotipo celular más invasivo, generando resultados muy variables y confusos respecto a los mecanismos de acción de los retinoides en tumores sólidos. Otra consideración para el estudio de los efectos de los retinoides sobre células tumorales es la interacción célula-célula, incluyendo interacciones entre células luminales-mioepiteliales e interacciones célula-estroma, que juegan un papel importante en la cascada metastásica, a través de moléculas de adhesión, integrinas, y cadherinas[108,109]. Se ha demostrado que los retinoides regulan la expresión de genes que codifican para estas proteínas incluyendo la laminina y cadherina-E[110], lo que afectaría la interacción de la célula con su entorno.

Por último, resta considerar la idea de la existencia de una pequeña sub-población de células stem tumorales responsables de la formación de tumores. Los tratamientos contra el cáncer contemplan la inducción de apoptosis de las células tumorales, así como la inducción de la diferenciación en forma irreversible de células del nicho stem. Debido a que el ácido retinoico es el principal regulador de la diferenciación de células stem embrionarias, es razonable considerar el uso de retinoides naturales y sintéticos para el estudio de terapias contra células stem tumorales.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es investigar el papel de la vía del sistema del ácido retinoico en el comportamiento metastásico del tumor mamario murino LM38-LP compuesto por células luminales (LEP) y mioepiteliales (MEP), empleando estudios *in vivo* e *in vitro*, y estrategias farmacológicas y genéticas.

Hipótesis: La interacción entre los componentes luminales y mioepiteliales puede estar alterada en el cáncer de mama, induciendo a una desregulación de componentes del sistema del ácido retinoico. Estas alteraciones le confieren ventajas a la célula tumoral en la cascada metastásica.

Así, la reversión de las alteraciones en el sistema del ácido retinoico podría reducir el comportamiento metastático de estas células tumorales.

Objetivos particulares:

Objetivo 1: Analizar si las diferentes sub-poblaciones celulares de la línea LM38-LP (LEP/ MEP) difieren en los componentes moleculares del sistema del ácido retinoico y su modulación por retinoides.

Objetivo 2: Estudiar *in vitro* los mecanismos implicados en la inhibición de la proliferación y sobrevida ejercida por los retinoides; analizando si el tratamiento con retinoides induce efectos diferentes en las sub-poblaciones LEP/MEP en relación a las propiedades analizadas.

Objetivo 3: Estudiar *in vitro* el efecto de los retinoides sobre algunos procesos implicados en la diseminación metastásica en la línea celular LM38-LP y sus principales componentes celulares.

Objetivo 4: Determinar la existencia de una posible subpoblación de células stem/progenitoras en la línea celular LM38-LP

Objetivo 5: Valorar *in vivo* e *in vitro*, la participación de los receptores retinoides más involucrados en crecimiento y progresión tumoral, mediante el análisis de crecimiento, invasividad y capacidad metastásica de sublíneas de LM38-LP modificadas o no genéticamente.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

TUMOR

El adenocarcinoma M38 surgió en forma espontánea en una hembra BALB/c del bioterio del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". El tumor es transplantable en forma s.c. en ratones singeneicos generando adenocarcinomas con diferenciación papilífera, capaz de metastatizar en nódulo linfático drenante y en pulmón. A partir del tumor M38 se establecieron varias líneas celulares continuas. La sub-línea de repique bajo LM38-LP contiene dos componentes celulares principales hasta el pasaje 30 en cultivo. Las dos sub-poblaciones de los cultivos de LM38-LP fueron caracterizadas antigénicamente como células luminales y mioepiteliales. La sub-línea de repique alto LM38-HP está compuesta principalmente por células epiteliales pequeñas y ahusadas. Por otro lado, por dilución clonal de las células LM38-LP se estableció el clon LM38-D2 que sólo contiene grandes células mioepiteliales. Aunque las tres líneas celulares fueron tumorigénicas cuando fueron inoculadas en ratones singeneicos, las mismas mostraron marcadas diferencias en la latencia, incidencia y tasa de crecimiento del tumor primario, así como en su habilidad para desarrollar metástasis en pulmón y/o nódulos linfáticos de la región[56]. Ver "Importancia de los modelos tumorales mamarios", capítulo 2.

MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE LA LÍNEA CELULAR LM38-LP

La línea celular LM38-LP es mantenida en Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mix F-12 (D-MEM F-12) con HEPES (Gibco) suplementado con 2 mM de glutamina, 80µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal bovino (SFB, Bioser, Buenos Aires, Argentina), a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de dióxido de carbono gaseoso. Los pasajes sucesivos son realizados por tripsinización de monocapas subconfluentes (0,25% de tripsina y 0,02% de EDTA en PBS sin Ca2+ ni Mg2+) dos veces semanales. Periódicamente se determinó que las células estuvieran libres de micoplasma mediante la tinción durante 10 minutos con 1µg/ml DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol diclorohidrato, Sigma) seguida de la observación en microscopio de epifluorescencia.

RETINOIDES Y DOSIS

Ácido *All-trans* Retinoico (ATRA, Calbiochem) 1μM, 9-cis RA (Sigma) 1μM, Retinol (Sigma) 1μM, Agonista de RARα AM580 200nM (BIOMOL), Antagonista de RARα Ro41-5253 (BIOMOL) 2μM

Todos los compuestos fueron diluidos en dimetil sulfóxido (DMSO, vehículo).

SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES LUMINAL Y MIOEPITELIAL

Monocapas subconfluentes de células LM38-LP, tratadas o no con retinoides, se despegaron con una solución EDTA 2mM/PBS. Luego de un lavado con PBS, se resuspendieron $2{,}5.10^6$ células en 1 ml de medio completo con el agregado de 12,5 μl de anticuerpo (2,5 μg anticuerpo cada $2{,}5.10^6$ células) contra Caderina-E (Santa Cruz) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 900 rpm, el pellet obtenido fue lavado con Buffer I (0,1% Albúmina Bovina Sérica en 2 mM EDTA/PBS) y se repitió la centrifugación. Se resuspendieron las células en Buffer I con 25 μl de inmunopartículas magnéticas (Dynabeads M-280 Sheep Anti Rabbit, Invitrogen) y se incubaron por 20 minutos a 4°C. Luego, la suspensión celular fue transferida a un nuevo tubo y se le agregó 1 ml de Buffer I. Se colocó este tubo en un magneto inclinado durante 1 minuto para permitir el pegado de las inmunopartículas magnéticas. Se recogió el sobrenadante (población negativa, células MEP) sin retirar el tubo del magneto y se lavó el tubo repetidas veces con Buffer I. Las células unidas a las inmunopartículas magnéticas fueron resuspendidas en Buffer I (población positiva, células LEP).

RT-PCR Y PCR

La transcripción de los receptores RAR y RXR fue analizada por RT-PCR. Para ello, el ARN de células LM38-LP tratadas o no con retinoides por 48 hs fue obtenido empleando "*Purescript RNA isolation kit*" (Gentra). Luego se obtuvo el cDNA correspondiente utilizando *iScript cDNA Syntesis kit* (Bio Rad). Los productos de PCR fueron obtenidos usando cebadores (*primers*) para los siguientes ARNm:

ARNm	Secuencias	Procedencia
h/mRARα1	**Sentido:** 5'GCCAGGCGCTCTGACCACTC-3'	Arthur Zelent[115]
	Anti sentido: 5'-AGCCCTTGCAGCCCTCACAG-3'	
h/mRARα2	**Sentido:** 5'-ACTCCGCTTTGGAATGGCTCAAAC-3'	Arthur Zelent[115]
	Anti sentido: 5'-AGCCCTTGCAGCCCTCACAG-3	
mRARβ2	**Sentido:** 5'-ATGGAGTTCGTGGACTTTTCTGTG-3'	Laboratorio del Dr. Eduardo
	Anti sentido: 5'-CTCGCAGGCACTGACGCCAT-3'	Farias (*Mount Sinai, School Of Medicine, New York*)
CRBP I	**Sentido:** 5'-TTGTGGCCAAACTGGCTCCA-3'	Laboratorio del Dr. Eduardo
	Anti sentido: 5'-ACACTGGAGCTTGTCTCCGT-3'	Farias (*Mount Sinai, School Of Medicine, New York*)
p27	**Sentido:** 5'-AGAACACAAAACTGACACCC-3'	Laboratorio del Dr. Eduardo
	Anti sentido: 5'-AAATGGGTTCTCATGAACTG-3'	Farias (*Mount Sinai, School Of Medicine, New York*)

WESTERN BLOT

Con el fin de evaluar mediante Western blot la expresión y modulación de moléculas implicadas en la progresión del ciclo celular, apoptosis o sobrevida celular ante el tratamiento retinoide, se prepararon lisados de células LM38-LP. A tal efecto se sembraron $3x10^5$ células LM38-LP en placas de 100 mm con medio completo por triplicado. Luego de 24 horas este medio fue reemplazado por los correspondientes tratamientos. Finalmente las células tratadas durante 48 hs fueron lisadas en solución de Tritón 0,1% en PBS suplementado con inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Sigma), en agitación por 40 minutos a 4ºC. Los lisados celulares fueron sonicados y el contenido proteico fue determinado utilizando el método de Bradford (Bio-Rad). Cincuenta microgramos de lisado total fueron diluidos en buffer de siembra conteniendo 100 mM Tris pH 6,8, 10% glicerol v/v, 50 mg/ml SDS, 0.5 mg/ml de azul de bromofenol y 5% de β-mercaptoetanol. Las muestras fueron calentadas a 100ºC por 2 minutos

antes de sembrar en geles de Acrilamida al 10% (SDS-PAGE-Laemmli). Los geles fueron corridos en buffer 0,25 M Tris, 2 M Glicina y 1% SDS a pH 8,3. Las proteínas corridas en los geles fueron transferidas a membranas de nylon (PVDF, Amersham) utilizando un transferidor líquido (Bio-Rad). Las membranas fueron incubadas en buffer de bloqueo (5% caseína en 0.1% Tween-20 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (T.A.). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos específicos (ver tabla a continuación), a 4ºC toda la noche (ON). Finalmente, luego de lavados con PBS/Tween fueron expuestas a los correspondientes anticuerpos secundarios (1:5000) conjugados a peroxidasa. El revelado se realizó por quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se cuantificaron por densitometría empleando el programa Gel Pro Analyzer. Los valores obtenidos se expresaron en Unidades Arbitrarias (UA) y se normalizaron en función a las UA de actina. Los controles de inespecificidad fueron realizados omitiendo el primer anticuerpo.

Anticuerpo	Dilución	Especie	Empresa
Ciclina B1	1:500	Ratón	Santa Cruz
Ciclina D1	1:500	Ratón	Santa Cruz
p27	1:500	Conejo	Santa Cruz
RARβ2	1:500	Conejo	Santa Cruz
RARα1	1:500	Ratón	Santa Cruz
RARα2	1:500	Conejo	Santa Cruz
Bax	1:500	Ratón	Cell Signaling
Actina	1:500	Ratón	BD
Tubulina	1:500	Ratón	Cell Signaling
Fosfo-Akt	1:500	Conejo	Cell Signaling
Akt	1:500	Conejo	Cell Signaling
Fosfo-Erk	1:500	Ratón	Santa Cruz
Erk	1:500	Ratón	Santa Cruz

ENSAYO DE GENES REPORTEROS

ACTIVIDAD RARE LUCIFERASA

Para determinar la funcionalidad de los RARs, se llevó a cabo un ensayo de transfección con una construcción RARE-luciferasa usando un plásmido que expresa *firefly* luciferasa río abajo del promotor artificial DR5 conteniendo la secuencia RARE (elemento respondedor al ácido retinoico). Se resuspendieron $2,5x10^5$ células de la línea LM38-LP o de sus componentes separados LEP/MEP en OPTIMEM (Gibco) y se transfectaron con una mezcla del plásmido reportero DR5 (1 μg) y el plásmido control de expresión constitutiva SV-40 conteniendo Renilla luciferasa (0,01 μg) en presencia de 3 μl de Fugene (Roche) en OPTIMEM. Luego, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Transcurridas 24 hs de la transfección, las células fueron tratadas con retinoides durante 48 hs y luego se realizó la medición de la actividad luciferasa empleando un luminómetro.

ACTIVIDAD AP1 LUCIFERASA

Para determinar el efecto de tratamiento con retinoides sobre la actividad de promotores con sitios AP1, se llevó a cabo un ensayo de transfección transiente con un plásmido reportero que expresa firefly luciferasa río debajo de un promotor artificial conteniendo la secuencia AP1. Se resuspendieron $2,5x10^5$ células de la línea LM38-LP en OPTIMEM (Gibco) y se transfectaron con una mezcla del plásmido AP1-luciferasa (1 μg) y el plásmido control SV-40 conteniendo Renilla luciferasa (0,01 μg) en presencia de 3 μl de Fugene (Roche) en OPTIMEM. Luego, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Transcurridas 24 hs de la transfección, las células fueron tratadas con retinoides durante 48 hs y luego se realizó la medición de la actividad luciferasa empleando un luminómetro.

CAPACIDAD PROLIFERATIVA

Se evaluó la capacidad proliferativa de las células LM38-LP en presencia o ausencia de retinoides. Para ello se sembraron $5x10^4$ células por triplicado en placas de 35 mm (Nunc) con medio completo en presencia o no de diferentes retinoides. Se evaluó el

crecimiento por recuento de las células vivas en cámara de Neubauer en presencia de Azul Tripán a las 48, 96 y 144 horas de tratamiento.

ENSAYO DE CLONOGENICIDAD

Se sembraron 100.000 células LM38-LP por placa de 35 mm y se las trató durante 5 días con ATRA, Retinol, Ro41-5253 y sus combinaciones. Transcurrido este tiempo las células pre-tratadas se levantaron con tripsina y 500, 1000 y 1500 de estas células de cada grupo se sembraron por cuadruplicado en placas de 35 mm. La mitad de las placas continuaron los tratamientos durante 5 días más, mientras que la otra mitad fue mantenida con medio completo. Las colonias fueron fijadas con formol neutro y teñidas con Cristal Violeta. Se contaron las colonias mayores de 20 células bajo lupa.

CULTIVO DE ESFEROIDES

Se sembraron suspensiones monocelulares de 2.10^5 células en 1 ml de medio completo en placas de 12 pocillos (Greiner BioOne) previamente cubiertas con 250 μl/pocillo de Poly-Heme (solución madre 50 mg/ml en metanol, para la solución de uso se realiza una dilución 1:5 en etanol, Sigma) para impedir el pegado de las células a la superficie. Los cultivos de esferoides, tratados o no con retinoides, se observaron por contraste de fase en un microscopio invertido y se tomaron fotografías a distintos tiempos.

CITOMETRÍAS

Para determinar el efecto de los retinoides sobre la distribución en el ciclo celular de la línea celular LM38-LP, monocapas celulares tratadas o no con retinoides por diferentes tiempos, fueron levantadas por tripsinización, lavadas con PBS y fijadas con etanol 70%. Después de la tinción con 100 μg/ml de ioduro de propidio, las muestras fueron examinadas en un citómetro BD FACS CANTO y analizadas con los programas Diva y Flowjo (Becton Dickinson y Ashland).

INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPÍA CONFOCAL

Se sembraron $2x10^4$ células en portaobjetos divididos en 8 pocillos (*labteks*, BD Biosciences). Luego de 24 hs, las células sembradas fueron tratadas o no con retinoides durante 5 días. Posteriormente las monocapas fueron fijadas y permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% frío durante 10 minutos a 4ºC. Luego de lavados con PBS-Glicina se incubaron con buffer de bloqueo (solución de lavado IF (5 g de BSA, 10 ml de Tritón X-100, 2 ml de Tween en 500 ml de PBS) + 10% suero). Las células fueron incubadas ON a 4ºC con los anticuerpos primarios (ver tabla a continuación) en buffer de bloqueo. Luego de lavar con solución de lavado IF, las células recibieron el anticuerpo secundario (1:400, Alexa fluor, Molecular Probes) en buffer de bloqueo por 1 hora a T.A. Luego, las células fueron incubadas con DAPI (1:2000) durante 10 minutos a T.A., lavadas con PBS y montadas con *Prolong anti-fade* (Molecular Probes, Invitrogen). Las fotografías fueron tomadas con microscopio confocal (Leica TCS SP5 DM) o con microscopio de epifluorescencia Nikon (Eclipse E400; Nikon, Tokio, Japón), usando una cámara digital Coolpix Nikon.

Anticuerpo	Dilución	Especie	Empresa
Actina de músculo liso	1:200	Ratón	Santa Cruz
P-Akt	1:200	Conejo	Cell Signaling
p27	1:200	Conejo	Santa Cruz
P-Rb	1:200	Ratón	Cell Signaling
Caderina-E	1:200	Ratón	BD

CULTIVOS 3D EN MEMBRANA BASAL RECONSTITUIDA (MATRIGEL)

Se resuspendieron $4x10^5$ células/400 μl de DMEM F12 con 2% SFB y 2% Matrigel (Matriz extracelular, BD), la suspensión monocelular fue sembrada sobre un portaobjeto multicámaras (*labteks*, BD Biosciences) conteniendo 80 μl de Matrigel. Se comenzó el tratamiento con retinoides al tercer día de cultivo, cuando se pudo detectar la formación de colonias, y se mantuvo este tratamiento durante dos días más. Las células fueron fijadas con p-formaldehído 2% durante 20 minutos a T.A. Los cultivos en 3D, tratados o

no con retinoides, se observaron con contraste de fase en un microscopio invertido y se tomaron fotografías para analizar morfología y marcadores de sobrevida.

ENSAYO DE SENESCENCIA

Para realizar este ensayo se utilizó el kit de Detección de Senescencia (*Senescence Detection Kit*, BioVision) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron 5000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. Las células fueron tratadas con ATRA, retinol, AM580, Ro41-5253, ATRA + Ro41-5253 o vehículo por diferentes tiempos. Una vez finalizados los tratamientos se removió el medio de cultivo y se lavó con PBS. Las células fueron fijadas con 0,5 ml de Solución Fijadora (Biovision) durante 15 minutos a T.A. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con 1ml de PBS y posteriormente se agregaron a cada pocillo 0,5 ml de solución de tinción (470 µl de *Solución para tinción*, 5 µl de *Suplemento para tinción* y 25 µl de 20 mg/ml de X-Gal en DMSO, por pocillo). Se incubó la placa O.N a 37ºC en estufa sin gaseo. Finalizada la incubación, se removió la solución de tinción, y luego de un lavado con PBS se montaron con 1 ml de PBS-Glicerol (1:1). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon (Eclipse E400; Nikon, Tokio, Japón) de contraste de fase, usando una cámara digital Coolpix Nikon.

EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

Para estudiar el efecto del tratamiento a diferentes tiempos con retinoides sobre la muerte celular, se realizó una tinción con Anexina-V y se evaluó de dos formas, por citometría y microscopía de fluorescencia.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células fueron tratadas durante 2, 3, 4 y 5 días con ATRA o vehículo. Luego, las mismas fueron levantadas y lavadas con PBS. El pellet celular fue resuspendido en Anexina-binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, y 2,5 mM CaCl2, pH 7,4) a una concentración de $1x10^6$ células/ml, obteniendo 100 µl por ensayo. A cada 100 µl de suspensión celular se le agregó 5 µl de Anexina-V conjugada a Alexa-Fluor 488 y 2 µl

ioduro de propidio en concentración 100 μg/ml. Las células fueron incubadas durante 15 minutos a T.A. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 400 μl de Anexina-binding buffer, se mantuvieron en hielo. Las muestras fueron analizadas con un citómetro BD FACS CANTO y analizadas con los programas Diva y Flowjo (Becton Dickinson y Ashland).

MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Luego de tratar a las células LM38-LP crecidas en *labteks* (BD Biosciences) por diferentes tiempos, las mismas fueron lavadas con PBS. Se añadieron 100 μl de Anexina-binding buffer, 1 μl de Anexina-V conjugada a Alexa-Fluor 488 y 2 μl de ioduro de propidio en cada pocillo. Las células fueron incubadas por 15 minutos a T.A. Se lavaron los pocillos con Anexina-binding buffer, los *labteks* fueron montados con Prolong anti-fade (Molecular Probes), evaluados y fotografiados con un microscopio Nikon (Eclipse E400, Nikon, Tokio, Japón) invertido, usando una cámara digital Coolpix Nikon.

FORMACIÓN DE MAMOSFERAS POR CÉLULAS STEM TUMORALES

Una suspensión monocelular de la línea LM38-LP fue sembrada en placas de baja adhesión a una concentración de $1x10^4$ células por pocillo con 2 ml de medio para cultivo de mamosferas libre de suero (DMEM F12, 20 ng/ml FGF, 10 ng/ml EGF, B27 sin vitamina A de Invitrogen)[116], en presencia o ausencia de ATRA. Las mamosferas formadas fueron observadas por contraste de fase en un microscopio invertido y se tomaron fotografías.

Por otro lado estas células fueron disgregadas y cultivadas en condiciones normales de cultivo de la línea LM38-LP para inducir la diferenciación de las células seleccionadas.

PREPARACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

La actividad del Activador de Plasminógeno tipo Uroquinasa (uPA) y de metaloproteasas (MMPs) fue evaluada en los medios condicionados (MC) de células modificadas o no genéticamente para el silenciamiento o sobre-expresión de diferentes

RARs. Monocapas crecidas en placas 12 pocillos fueron tratadas con distintos retinoides durante 5 días, y luego fueron lavadas con PBS. Se agregaron 500 µl medio sin suero y se incubaron las células por 24 horas más. Se recolectó el MC, las monocapas fueron lisadas con PBS/Tritón 1%, y se determinó el contenido proteico (Bio-Rad Protein Assay). Las muestras de MC fueron alicuotadas y guardadas a -20ºC y se usaron sólo una vez luego de su descongelación.

ZIMOGRAFÍAS

Las metaloproteasas (MMP) secretadas se analizaron mediante zimografía cualitativa. Las muestras de MC se corrieron en geles 9% SDS conteniendo 1 mg/ml gelatina, en condiciones no desnaturalizantes. Luego de realizar la corrida electroforética, el gel se lavó durante 30 minutos con una solución 2,5% Tritón X-100 y se incubó en buffer conteniendo 0.25 M Tris-HCl pH 7.4, 1 M NaCl, and 25 mM CaCl2 durante 48 a 37ºC. Se tiñó el gel empleando el colorante Comassie Blue (0,1% Comassie R-250, 10% ácido acético y 30% metanol) para detectar las bandas de degradación, que fueron cuantificadas empleando el programa Gel Pro Analyzer. Los datos se expresan en unidades arbitrarias y fueron relativizados al contenido proteico de los lisados celulares

CASEINÓLISIS RADIAL

La actividad de uPA secretada se determinó mediante caseinólisis radial sembrando 10 µl de MC en geles de agarosa con caseína adicionados con plasminógeno (Caseína 33 mg/ml, Buffer Tris-Cl 0,2 M pH 8, Plasminógeno 2 µg/ml, Agarosa 2,5%). En estos geles, además, se realizó una curva estándar con Uroquinasa purificada a partir de 25 UI/ml y diluciones seriadas al medio (1,20 mg de Uroquinasa purificada equivalen a 1000 UI/ml). Se incubó durante 48 horas en cámara húmeda a 37º. Se midieron los halos de degradación obtenidos y se analizó la actividad de los medios condicionados empleando la curva estándar. Estos resultados fueron relativizados al contenido proteico de los lisados celulares.

ENSAYO DE MIGRACIÓN

Se evaluó la capacidad migratoria de las células LM38-LP tratadas o no con retinoides, mediante el ensayo de “Sanación de Herido” o “*Wound Healing*”. Para ello se practicaron heridas de aproximadamente 400µm de ancho a monocapas

subconfluentes de células LM38-LP. Las células se lavaron con PBS e incubaron con DMSO, ATRA, Retinol, Ro41-5253, o ATRA más Ro41-5253. En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 2% de SFB. A tiempo cero de incubación, se procedió a tomar registros fotográficos de diferentes áreas de las heridas. Se repitió el registro fotográfico de las mismas áreas a las 6 y 10 horas. La capacidad migratoria se cuantificó utilizando el programa Image Pro Plus, calculando el porcentaje del área ocupada respecto de la herida original.

ENSAYO DE INVASIÓN EN CÁMARAS *TRANSWELL*

Para analizar la capacidad invasiva de la línea LM38-LP o de sus componentes LEP/MEP separados, se realizó un ensayo de invasión en cámaras *transwells*. El lado inferior de las membranas contenidas en las cámaras (poros de 8 μM) fue cubierto con 0,1% de gelatina y en el lado interno de la cámara se colocaron 100 μl de Matrigel (BD) en una concentración final de 2 mg/ml. En cada pocillo de una placa de 24 pocillos se colocaron 16 mg de Fibronectina (Sigma) en 0,5 ml de medio sin suero a modo de quimoatractante. En la cámara superior se sembraron por triplicado $1x10^5$ células y se incubaron O.N en estufa gaseada. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron fijadas con formol neutro y se eliminaron aquellas células que no fueron capaces de invadir utilizando un hisopo sobre el lado superior de la membrana. Las membranas fueron teñidas con DAPI, lavadas con PBS y montadas sobre un portaobjetos utilizando Prolong anti-*fade* (Molecular Probes, Invitrogen). Se consideraron invasivas aquellas células que luego de invadir la capa de Matrigel, lograron pasar a través de los poros y se adhirieron a la cara inferior del filtro. El recuento se realizó bajo microscopio de fluorescencia en campos de 400X. (Eclipse E400, Nikon).

CAPACIDAD ADHESIVA

Las células LM38-LP creciendo en monocapa fueron pre-tratadas o no con ATRA 1μM durante 5 días. Luego, las monocapas fueron levantadas por tripsinización y las células incubadas durante 2 hs a T.A. para su recuperación. Se sembraron $1x10^5$ células/pocillo

por triplicado en placas de 24 pocillos cubiertas con una capa de BSA 1% (Sigma), Fibronectina (0,1% Sigma) o Colágeno I (*labtek* con Colágeno I, BD), con medio suplementado con 2% de SFB, con o sin ATRA. Una vez transcurridos 30 minutos de incubación a 37ºC en estufa gaseada, las células no adheridas fueron removidas realizando suaves lavados con PBS. Las células adheridas fueron levantadas por tripsinización y la cuantificación de las mismas fue llevada a cabo contando en cámara de Neubauer. La tasa de adhesión fue calculada como el número de células adheridas/total de células sembradas.

ANÁLISIS DE MARCADORES DE CÉLULAS STEM/PROGENITORAS TUMORALES

Para evaluar la actividad Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) conjuntamente con otros marcadores de células stem/progenitoras, células LM38-LP fueron sembradas en placas de 100 mm y tratadas con DMSO, ATRA, Retinol o AM580 durante 3, 4 o 5 días. Fue utilizado el kit Aldefluor (Aldagen, StemCell Technologies) y se siguieron las instrucciones del fabricante: se levantaron las células y se resuspendieron en Aldefluor Buffer Assay (Aldagen) en una concentración de $1x10^6$ células/ml más anticuerpos contra CD133 o CD24 (1µl de anticuerpo por tubo) como otros marcadores de células stem o progenitoras. Para cada grupo experimental se usaron dos tubos, uno con el inhibidor de ALDH, DEAB, como control y otro sin el inhibidor. Debido a la cantidad importante de fluorescencia residual durante el ensayo, el inhibidor permite determinar la tinción positiva real.

Una vez añadido o no el DEAB a cada ml de suspensión celular, se agregaron 5 µl de sustrato ALDEFLUOR activado. Las muestras fueron incubadas en un baño a 37ºC durante 30 minutos. Las células fueron centrifugadas y los pellets lavados con 1 ml de buffer Aldefluor. Luego, se resuspendieron las células en 1 ml de buffer Aldefluor. Las muestras fueron analizadas con un citómetro BD FACS CANTO y analizadas con los programas Diva y Flowjo (Becton Dickinson y Ashland).

ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DE UN PANEL DE GENES INVOLUCRADOS EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMÁTICA EN PCR EN TIEMPO REAL (QPCR)

Se sembraron células LM38-LP en placas de 100 mm y se trataron con ATRA o vehículo por 48 horas. Finalizado el tratamiento se procedió a la separación de los componentes LEP y MEP como se mencionó anteriormente. Luego se purificó el ARN de los dos componentes sometidos a los diferentes tratamientos empleando el kit de purificación *RNeasy Mini Kit* (catálogo número 74104, Qiagen).

A continuación se procedió con la eliminación del ADN genómico, la transcripción reversa y la qPCR según lo indicado por el proveedor (*RT^2 First Strand Kit*, catálogo número 330401; *RT^2 Profiler PCR Array Format D*, PAMM-090A-2 EMT; Qiagen).

Los resultados obtenidos fueron analizados con *PCR Array Data Analysis Software* de www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php.

GENERACIÓN DE LAS SUBLÍNEAS DERIVADAS DE LM38-LP POR TRANSFECCIÓN ESTABLE, PARA EL SILENCIAMIENTO O SOBRE-EXPRESIÓN DE DIFERENTES RARs

Para analizar la importancia de cada clase de receptor de ácido retinoico, se generaron diferentes sub-líneas de LM38-LP por transfección estable. Así se generaron sub-líneas que sobre-expresan RARα1, RARβ2, RARγ1, RARγ2. Se utilizó el vector pSV2Neo (marcador de resistencia: G418) sin la secuencia codificante para los receptores como control (plásmido vacío). Para ello, se resuspendieron $1x10^6$ células LM38-LP en OPTIMEM (Gibco) y se transfectaron en suspensión en presencia de 3 μl de Fugene (Roche) con un 1 μg de plásmido pSV2Neo conteniendo la secuencia correspondiente en el sitio múltiple de clonado (MCS) río abajo de un promotor fuerte y con una región de resistencia a Neomicina como marcador de selección eucariota. Luego, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Transcurridas 48 horas de la transfección, las células fueron tratadas con 200 μg/ml del agente de selección G418, que se agregó al medio completo de estas sub-líneas cada 48 horas.

Por otro lado, se generaron sub-líneas transfectadas con vectores conteniendo shARN capaz de silenciar a los receptores RARα, RARβ, RARγ. Se utilizó el vector pSM2c (marcador de resistencia: Puromicina) vacío como control. Se resuspendieron $1x10^6$ células LM38-LP en OPTIMEM (Gibco) y se transfectaron en suspensión en presencia de 3 μl de Fugene con un 1 μg de plásmido pSM2c conteniendo la secuencia correspondiente a cada shARN en el sitio múltiple de clonado (MCS) río debajo de un promotor fuerte y una región de resistencia a Puromicina como marcador de selección eucariota. Luego, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Transcurridas 48 horas de la transfección, las células fueron tratadas con 3 μg/ml del agente de selección Puromicina, este agente se agregó al medio completo de estas sub-líneas cada 48 horas.

ANIMALES

Para los estudios in vivo, se utilizaron ratones hembras endocriados de 2-4 meses de edad, obtenidos del Bioterio del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". Los animales son mantenidos de acuerdo con la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" del NIH. La comida y bebida fue administrada ad libitum.

CRECIMIENTO TUMORAL Y CAPACIDAD METASTÁSICA ESPONTÁNEA

Ratones BALB/c fueron inoculados en forma ortotópica con $2x10^5$ células de la línea LM38-LP o de las sub-líneas derivadas por transfección estable silenciando o sobre-expresando los distintos RARs. Cuando los tumores fueron palpables (aproximadamente a los 7 días post inoculación con tumores originados por células LM38-LP y unos 14 días con las sub-líneas derivadas de la transfección), los animales fueron implantados en forma subcutánea con un pellet de liberación lenta conteniendo o no, 10 mg de ATRA. El tratamiento se mantuvo por dos semanas y media y dos veces por semana se midieron los tamaños tumorales usando un calibre. Se calculó el volumen tumoral como: $[(\text{diámetro menor})^2 \times \text{diámetro mayor}]/2$, para establecer la tasa de crecimiento. Una vez finalizado el tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Los tumores extraídos fueron utilizados en estudios histopatológicos para evaluar la

morfología, diferenciación e invasión local. Para estudiar la presencia de metástasis espontáneas, se removieron los pulmones y se evaluaron el número y tamaño de las metástasis espontáneas bajo lupa.

Para determinar si las mamosferas formadas por una sub-población de células (enriquecidas en stem/progenitoras) de la línea LM38-LP son capaces de reconstituir el tumor formado por la línea completa, ratones BALB/c fueron inoculados con 100 células provenientes de mamosferas disgregadas. A las tres semanas los ratones fueron sacrificados y se removieron los tumores para su posterior análisis histopatológico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos al menos tres veces. La significancia entre grupos fue calculada utilizando los test t-Student, ANOVA o Chi cuadrado, según se indica. El U-test no paramétrico de Mann Whitney fue utilizado para analizar las diferencias en la capacidad metastásica. Se consideró significativo un valor de $p<0.05$.

RESULTADOS

CAPÍTULO 5

OBJETIVO 1:

Analizar si las diferentes sub-poblaciones celulares de la línea LM38-LP (LEP/ MEP) difieren en los componentes moleculares del sistema del ácido retinoico y su modulación por retinoides.

SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES LEP Y MEP DE LA LÍNEA CELULAR LM38-LP

Haciendo uso de la expresión diferencial de la molécula de adhesión Caderina-E, se logró separar de manera transiente los principales componentes celulares de la línea LM38-LP. Las células así obtenidas deben ser usadas en el mismo día ya que transcurridas 24 horas de incubación, se reconstituye la línea celular mixta LM38-LP en ambas sub-poblaciones separadas.

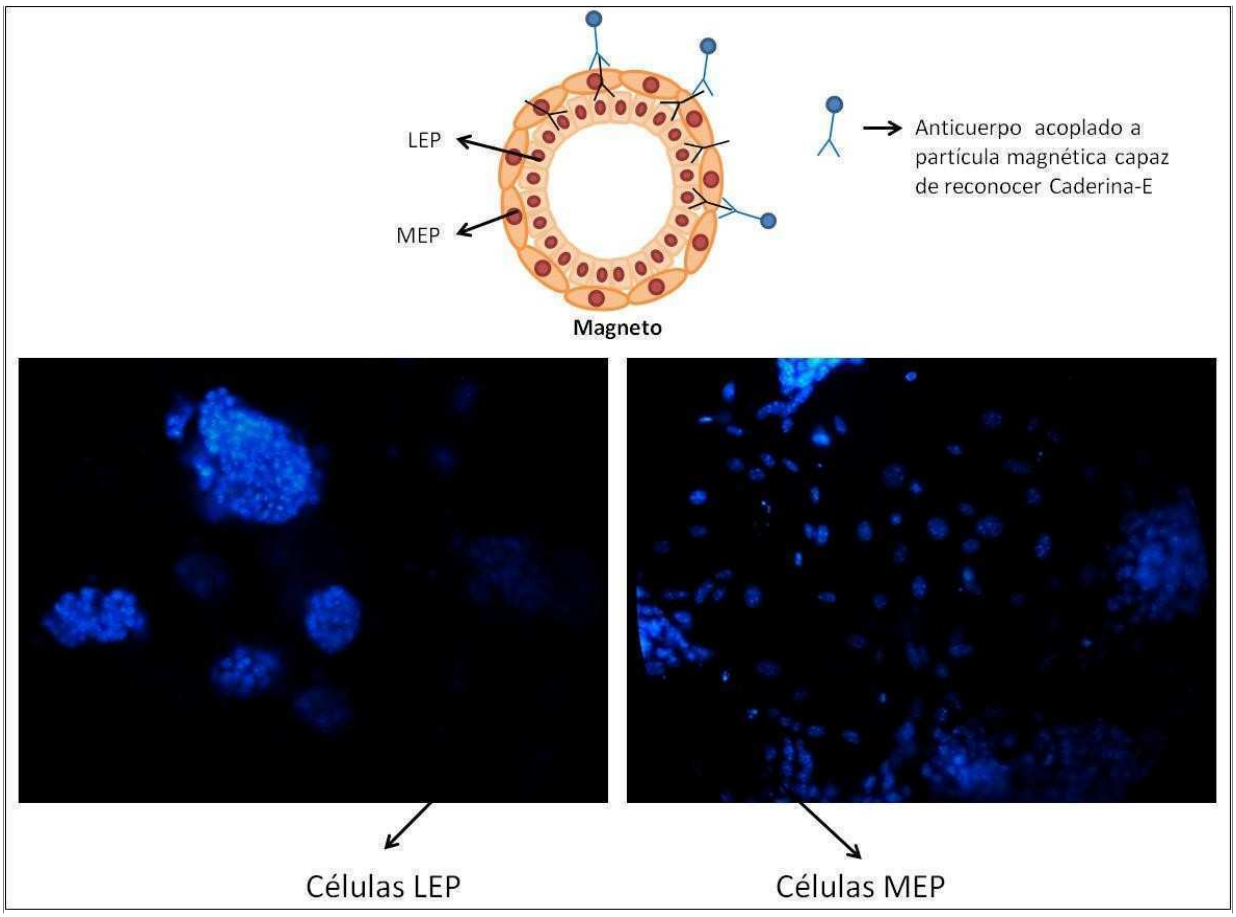


Figura 5.I. La figura esquematiza la técnica de la separación de las sub-poblaciones celulares LEP y MEP. Por microscopía de fluorescencia (400X) se pudo diferenciar los grandes núcleos de las células MEP de las agrupaciones de núcleos más pequeños que conforman las colonias LEP. Figura representativa.

EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DE LOS PRINCIPALES RECEPTORES DEL SISTEMA RETINOIDEO.

La línea celular mamaria murina LM38-LP está compuesta principalmente por dos compartimientos celulares caracterizados antigénicamente[56], uno epitelial-luminal (LEP) y otro mioepitelial (MEP). Con el fin de determinar si esta línea es un buen modelo para el estudio de la regulación de la diseminación de tumores sólidos murinos por el sistema del ácido retinoico y sus receptores, se analizó por RT-PCR la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm) de las principales isoformas de los receptores RARs en los dos compartimientos de la línea LM38-LP tratada con ATRA o con vehículo (DMSO) durante 48 horas. Además, la misma técnica fue empleada para analizar la funcionalidad de los receptores indirectamente, dado que el tratamiento con ATRA induce la transcripción de algunas de las isoformas RARs y otras moléculas de la vía, como RARβ2 o CRBP-I, que presentan sitios RARE en su promotor.

Se pudo determinar que la línea celular LM38-LP transcribe las principales isoformas de los receptores del sistema retinoide. En la figura 5.II.A se observa que el tratamiento con ATRA induce un aumento en los niveles de ARNm de RARα2, RARβ2 y CRBP-I sólo en el compartimiento LEP, lo que sugiere que este compartimento respondería al tratamiento con ATRA activando la vía clásica de señalización del sistema retinoide.

Por otro lado, empleando la técnica de Western blot, se estudió además la expresión de las principales isoformas RARs y de la proteína transportadora CRBP-I. Se determinó que la línea LM38-LP expresa las principales isoformas de receptores retinoideos y el tratamiento con ATRA induce un aumento en los niveles proteicos de la isoforma RARβ2 y de la proteína CRBP-I (Figura 5.II.B).

ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES DEL SISTEMA RETINOICO.

Con el fin de analizar la funcionalidad de los receptores por una técnica directa, se realizó un ensayo de genes reporteros "*firefly* luciferesa" bajo el control de un promotor inducible conteniendo sitios RAREs. Las células fueron tratadas por 48 horas con ATRA o con retinol, a fin de establecer si las células son capaces de metabolizar el precursor retinoideo, y luego se determinó la actividad luciferasa tanto en la línea bi-celular LM38-LP, como en sus principales componentes celulares LEP y MEP en forma individual. En la figura 5.II.C observamos que el tratamiento con ATRA o con retinol triplica la actividad luciferasa de la línea mixta y de su componente LEP separado (*$p<0,05$, T-test), sugiriéndonos que este compartimiento de la línea responde activando la transcripción de genes con secuencia RARE en su promotor. Por otro lado, el tratamiento con ATRA no induce la actividad luciferasa en el componente MEP de la línea, lo que sugiere que este compartimiento no responde al tratamiento con ATRA activando la vía clásica de respuesta o incluso que podría ser insensible al mismo.

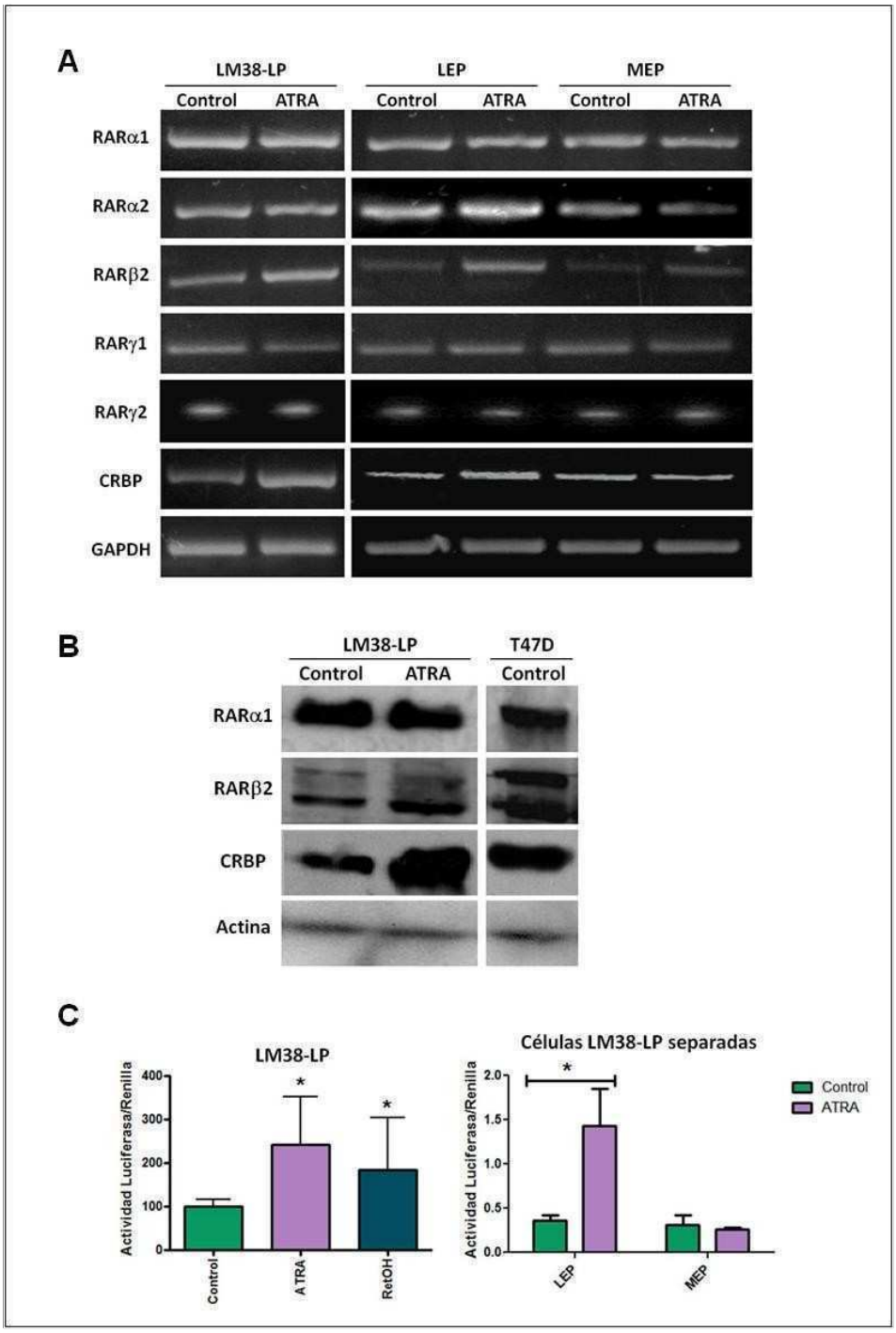


Figura 5.II. Expresión y funcionalidad de los principales componentes del sistema retinoico. A) RT-PCR para RARα, RARβ, RARγ y CRBP-I en la línea LM38-LP y en sus componentes LEP Y MEP. Figura representativa de cuatro experimentos independientes B) Western blot para la detección de RARα, RARβ y CRBP-I. La línea T47 fue utilizada como control positivo. Figura representativa

de tres experimentos independientes. C) Ensayo de actividad luciferasa para confirmar la funcionalidad de los RARs. Figura representativa de cuatro experimentos independientes.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 5

En la primer parte de este trabajo demostramos que la línea celular LM38-LP compuesta por dos principales poblaciones celulares, células LEP y MEP, expresa las principales isoformas de los receptores de ácido retinoico y que los mismos son funcionales. Es interesante destacar que al analizar la funcionalidad de los receptores, sólo el componente LEP presentó un aumento en los niveles de los ARNm correspondientes a RARβ2 y CRBP-I, así como un aumento en la actividad luciferasa controlada por sitios RAREs. Estos resultados nos sugieren que, frente al tratamiento retinoideo, la población LEP actuaría activando la vía clásica del sistema, en la cual el ATRA se une al receptor RARα1 activando la posterior transcripción de genes bajo la regulación de promotores con sitios RARE. Mientras que, frente al mismo tratamiento, el componente MEP podría ser insensible, o bien respondería a través de una vía de señalización alternativa.

Esto convierte a la línea celular LM38-LP en un excelente modelo de estudio porque nos permite analizar el papel del sistema retinoideo en diferentes tipos celulares de cuya interacción depende el comportamiento *in vivo*. Además, podría ayudar a comprender la variabilidad de las respuestas al tratamiento retinoideo observadas en la clínica.

RESULTADOS

CAPÍTULO 6

OBJETIVO 2:

Estudiar *in vitro* los mecanismos implicados en la inhibición de la proliferación y sobrevida ejercida por los retinoides; analizando además, si el tratamiento con retinoides induce efectos diferentes en las sub-poblaciones LEP/MEP en relación a las propiedades analizadas.

EFECTO DEL TRATAMIENTO RETINOIDE SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

Se sabe que el ácido retinoico induce una inhibición en la capacidad proliferativa de células normales y algunas células tumorales[117]. Por ello, el siguiente objetivo fue ver si la línea celular LM38-LP, además de presentar receptores funcionales de ácido retinoico, responde al tratamiento retinoideo modificando su capacidad proliferativa. Con este fin, las células fueron tratadas con diferentes retinoides a distintos tiempos y se analizó el efecto de los mismos contando el número de células vivas.

En nuestro modelo tumoral el tratamiento retinoideo disminuyó en forma significativa el número de células vivas a partir del cuarto día de tratamiento (Figura 6.I). Además, el hecho de que el tratamiento con retinol disminuya el número de células vivas, nos sugiere que la línea celular LM38-LP es capaz de metabolizar el mismo correctamente.

Por otro lado, observamos que el tratamiento con el retinoide 9-*cis* también es capaz de afectar la proliferación de esta línea celular, pero lo hace con una eficacia menor que el ATRA. Esto puede deberse a que, como se explicó anteriormente, el ATRA se une a los receptores RAR y RXR pero 9-*cis* se une sólo a los receptores RXRs. Así, para la formación del heterodímero RAR/RXR se requiere de la presencia de ATRA, mientras que 9-*cis* no es esencial para este efecto, pero sí lo es para la formación de los homodímeros de RXRs.

Figura 6.I. Ensayo de crecimiento *in vitro* de la línea celular LM38-LP frente al tratamiento con diferentes retinoides. El efecto sobre el crecimiento se determinó por recuento de células vivas. La figura representa los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. Se grafican medias y desvíos de cada grupo. ANOVA, significancia *p<0,05.

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN EN EL CICLO CELULAR FRENTE AL TRATAMIENTO CON RETINOIDES

Cómo ya se demostró, los retinoides disminuyen en forma significativa la capacidad proliferativa de la línea LM38-LP, por lo que el siguiente paso de este trabajo fue determinar los mecanismos que conducen a este efecto biológico.

Las células LM38-LP tratadas con distintos retinoides o vehículo, fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la distribución de estas células en el ciclo celular. Se pudo determinar que el tratamiento con ATRA induce un arresto en fase G0/G1 (Figura 6.II) y que este efecto es revertido cuando se agrega el antagonista de RARα, Ro41-5253.

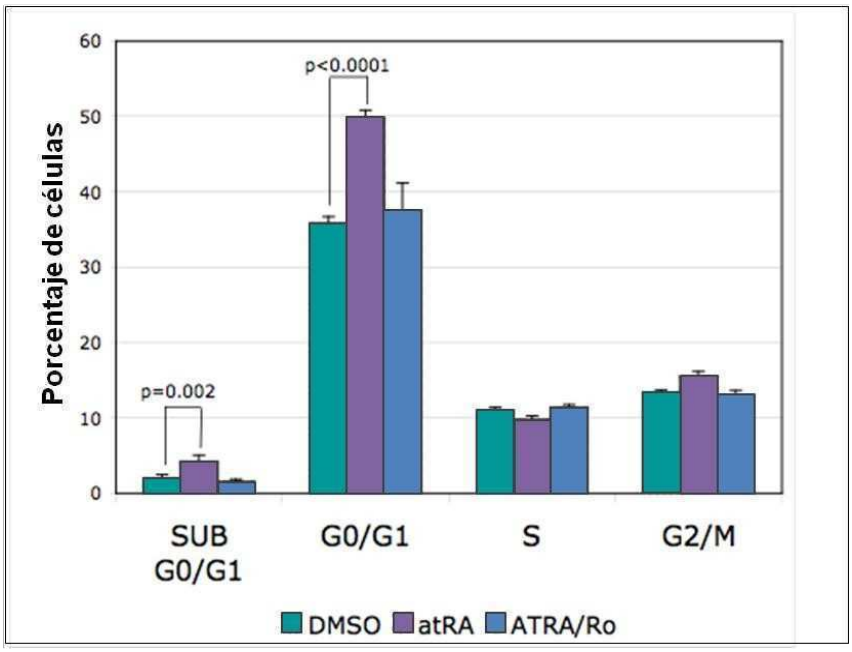


Figura 6.II. Análisis de distribución en el ciclo celular de la línea LM38-LP por citometría de flujo. El ATRA induce un arresto en G0/G1 dependiente en parte de RARα. Figura representativa de tres experimentos independientes. T-test *p< 0,05.

EFECTO DEL TRATAMIENTO RETINOIDE SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON EL CONTROL DEL CICLO CELULAR

Para estudiar los mecanismos implicados en la inhibición del crecimiento ejercido por los retinoides, lisados celulares de LM38-LP tratados y no tratados con ATRA durante 48 horas fueron analizados por Western blot. Se observó que el tratamiento retinoide disminuye los niveles de expresión de las ciclinas D1 y B1, moléculas involucradas en la progresión del ciclo celular (Figura 6.III). Por otro lado, el mismo tratamiento indujo un aumento en los niveles de expresión de p27, proteína inhibidora de quinasas dependiente de ciclinas (CDK), clave en la regulación del ciclo celular.

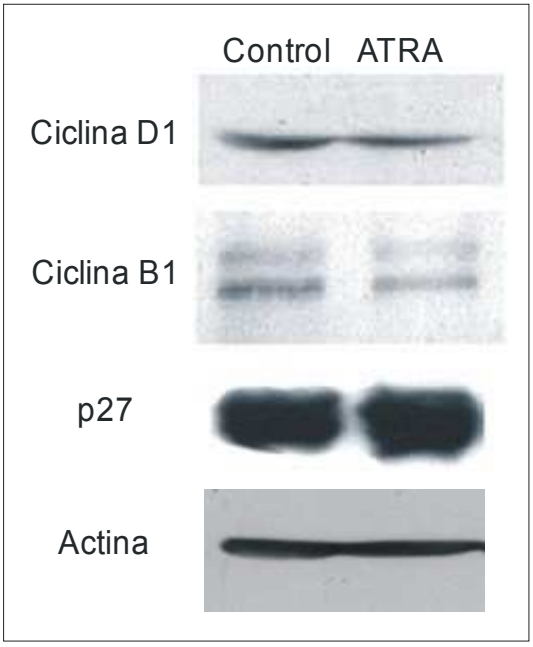


Figura 6.III. Western blot para moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular. Figura representativa de tres experimentos independientes.

Por otro lado, se realizaron inmunofluorescencias contra p27 y el marcador de proliferación pRb fosforilado (P-pRb) sobre monocapas de las células LM38-LP tratadas o no con ATRA. Se observó que, en condiciones basales (ausencia de tratamiento), un porcentaje de la población de células MEP presentaba acumulación nuclear de p27. Además, fue posible detectar marcación positiva para P-pRb principalmente en el compartimiento LEP. El tratamiento con ATRA indujo un aumento de la proporción de células MEP positivas para p27 nuclear y una disminución de marcación para P-pRb en

el centro de los islotes LEP, mientras que las células que bordean a los mismos y contactan con las MEP mantenían su positividad para P-pRb (Figura 6.IV).

Figura 6.IV. Inmunofluorescencia y microscopía confocal contra p27 (rojo) y p-PRb (verde). 200X. Figura representativa de tres experimentos independientes.

EFECTO DEL TRATAMIENTO RETINOIDE SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS RELACIONADAS A VÍAS REGULADORAS DE SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el fin de determinar si moléculas claves implicadas en la regulación de la proliferación y supervivencia celular se ven afectadas por el tratamiento con distintos retinoides, se estudió por Western blot la expresión de Akt y Erk fosforilados (P-Akt y P-Erk). Se pudo determinar que la línea LM38-LP tratada durante 48 hs con retinoides presenta una disminución significativa en los niveles de expresión de P-Akt y P-Erk, efecto que se ve potenciando por el tratamiento con el agonista de RARα, AM580 (Figura 6.V.A).

Para determinar cuál era la sub-población de la línea LM38-LP implicada en la disminución de los niveles de P-Akt, se hizo uso de la técnica de inmunofluorescencia sobre monocapas y microscopía confocal. Pudo observarse, en forma basal, que la expresión de P-Akt estaba limitada a un grupo de células ubicadas en el borde externo del compartimiento LEP de la línea (Figura 6.V.B). Estos resultados fueron corroborados en cultivos 3D en Matrigel, los que son más representativos de la situación del tumor *in vivo*. En estas condiciones, la línea presentó expresión de P-Akt principalmente en la capa celular externa de las colonias. Estos niveles de expresión disminuyeron cuando la línea fue tratada con retinoides durante 2 días (Figura 6.V.C). El efecto de los retinoides sobre la activación de la vía de supervivencia fue revertido por el antagonista de RARα, Ro41-5253.

Figura 6.V. A) Western blot contra moléculas implicadas en la regulación de la proliferación y sobrevida celular. Los retinoides disminuyen la forma fosforilada activa de Akt y Erk. Figura representativa de tres experimentos independientes. B) Inmunofluorescencia y microscopía confocal para P-Akt y SMA de la línea LM38-LP en monocapa (400X). Figura representativa de tres experimentos independientes C) Inmunofluorescencia y microscopía confocal para P-Akt de células LM38-LP en 3D (400X). Figura representativa de dos experimentos independientes.

ESTUDIO DE LA SENESCENCIA INDUCIDA POR RETINOIDES

Muchos modelos murinos empleados para el estudio del cáncer han sido utilizados para demostrar que la senescencia se encuentra asociada con estadios pre-malignos de la transformación neoplásica y se la relaciona con la prevención de la progresión tumoral. Por ello, las drogas capaces de inducir senescencia representan una gran oportunidad para aumentar el arsenal de terapias contra el cáncer[19].

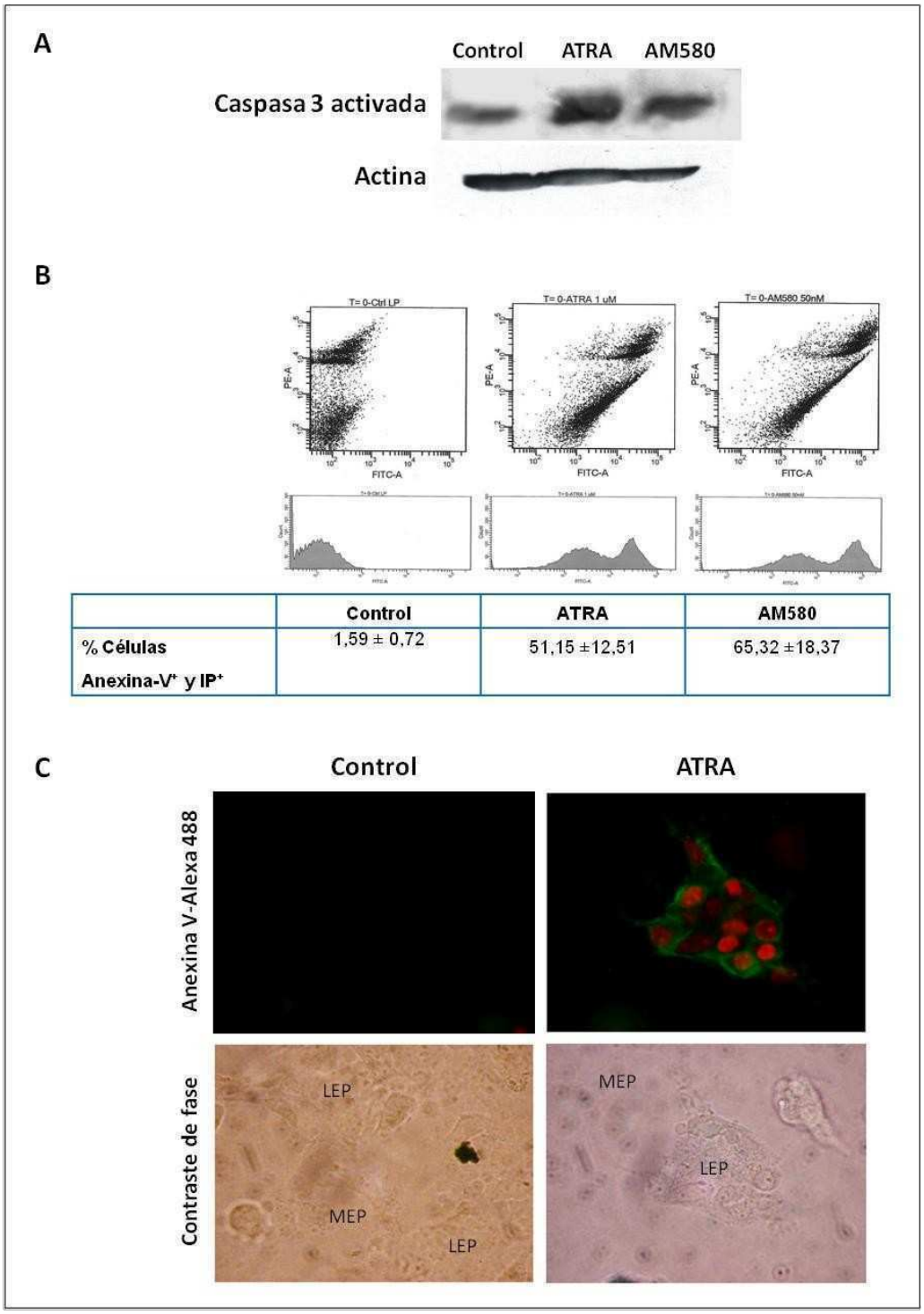
Por lo tanto, analizamos si el tratamiento con retinoides inducía senescencia en las células LM38-LP y cuál de sus componentes celulares era el más implicado. El aumento de la actividad de SA-β-Galactosidasa es usado como marcador de células senescentes, por lo que se realizó un ensayo cualitativo de actividad esta enzima. Para ello, células LM38-LP fueron tratadas con retinoides por diferentes tiempos. Se pudo observar que la línea LM38-LP presenta basalmente pocas células con actividad SA-β-Galactosidasa en el compartimiento MEP. Los tratamientos con retinoides (ATRA, retinol y AM580) mostraron un aumento en la cantidad de células con marcación positiva para este marcador de senescencia. Este efecto es revertido cuando se agrega el antagonista de RARα Ro41-5253 (Figura 6.VI).

Figura 6.VI. Ensayo de actividad SA-β-Galactosida (200X). La tinción azul indica las células con actividad SA-β-Galactosida. Figura representativa de cuatro experimentos independientes.

EFECTO DEL TRATAMIENTO RETINOIDE SOBRE LA APOPTOSIS

Trabajos previos publicados por diversos grupos determinaron que el ácido retinoico puede disminuir la tasa de crecimiento celular al inducir apoptosis[117]. Por Western blot pudimos determinar que el tratamiento con ATRA durante 48 horas induce un aumento de los niveles de expresión de la caspasa 3 activada (Figura 6.VII.A). La inducción de apoptosis frente al tratamiento con ATRA y retinol en nuestra línea celular fue corroborada por un ensayo de detección de células apoptóticas con Anexina-V conjugada con Alexa fluor 488 y citometría de flujo. Mediante este ensayo determinamos que el tratamiento de 3 días con ATRA induce un aumento en el número de células apoptóticas; el mismo resultado se obtuvo al tratar las células con el agonista de RARα, AM580 (Figura 6.VII.B).

Con el fin de determinar si este efecto ocurre en forma diferencial entre los principales componentes de nuestro modelo, las células LM38-LP fueron tratadas con vehículo o ATRA por diferentes tiempos. Una vez finalizados los tratamientos, las células fueron incubadas con Anexina V y Ioduro de Propidio y fueron observadas en microscopio de epifluorescencia. Pudimos determinar que el tratamiento con ATRA por 48 horas indujo apoptosis principalmente en las células LEP (Figura 6.VII.C). Sin embargo, al quinto día de tratamiento, se observaron algunas células apoptóticas también en el compartimiento MEP (datos no mostrados).



	Control	ATRA	AM580
% Células Anexina-V⁺ y IP⁺	1,59 ± 0,72	51,15 ±12,51	65,32 ±18,37

Figura 6.VII. A) Western blot contra caspasa 3 activada en lisados de células LM38-LP bajo distintos tratamientos retinoides. B) Análisis por citometría de flujo para Anexina-V en células LM38-LP con tratamiento retinoide. *p<0,05, T-test, n=4. C) Inmunofluorescencia sobre monocapa

con Anexina-V, la doble marcación con IP (rojo) y Anxina (verde) indica células en apoptosis. (200X). Figuras representativas de tres experimentos independientes.

EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

CAPACIDAD CLONOGÉNICA DE LA LÍNEA CELULAR LM38-LP

El ensayo de clonogenicidad es un método experimental de diferenciación *in vitro* que puede sugerir el grado de malignidad de una línea celular tumoral. Consiste en determinar la proporción de una población celular capaz de sobrevivir y proliferar al ser sembrada en baja densidad. Para establecer si los retinoides afectan este parámetro, células LM38-LP creciendo en monocapa fueron pre-tratadas durante 5 días con vehículo o diferentes retinoides. Transcurridos los 5 días las células se sembraron en diluciones clonales. Sólo la mitad de los grupos experimentales siguieron recibiendo el tratamiento retinoide, mientras que al resto se lo mantuvo sólo con medio completo.

Pudimos observar una sub-población correspondiente a un 4% de la línea celular LM38-LP, que presenta capacidad clonogénica y que esta proporción no es modificada por los distintos tratamientos retinoideos (Figura 6.VIII). Este resultado sugiere que en la línea LM38-LP existe una sub-población resistente a este tratamiento y que este efecto no se ve modificado por la inhibición farmacológica del receptor RARα.

Figura 6.VIII. Ensayo de clonogenicidad de la línea LM38-LP en presencia de diversos retinoides. La figura muestra los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. Se indica como "con tratamiento" aquellas células que mantuvieron tratamiento retinoide durante todo el ensayo y como "sin tratamiento" aquellas que fueron pre-tratadas sólo 5 días previos al ensayo. T-test.

EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE LA FORMACIÓN DE ESFEROIDES DE CÉLULAS LM38-LP

La capacidad de formar esferoides en suspensión es un rasgo característico de las células tumorales cultivadas a partir de tumores sólidos. Este tipo de agregados celulares permiten crear un modelo tridimensional compatible con las características reales que presentan las células malignas de los tumores.

Mientras que los esferoides formados por células de la línea LM38-LP en situación control fueron grandes y de morfología heterogénea, el tratamiento con retinoides mostró un marcado efecto inhibitorio del tamaño (Figura 6.IX).

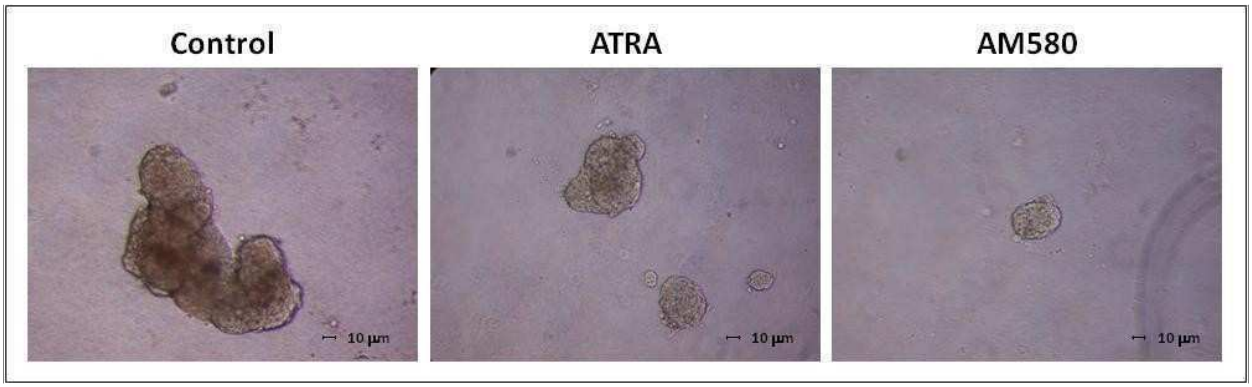


Figura 6.IX. Cultivo de esferoides bajo distintos tratamientos en condiciones independientes de anclaje de células LM38-LP (200x). Figura representativa de tres experimentos independientes.

EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE LA LÍNEA CELULAR LM38-LP. CULTIVOS 3D EN MATRIGEL

El cultivo celular en 3D, en presencia de Matrigel (matriz extracelular reconstituida) permite que las células cultivadas embebidas en Matrigel se comporten de manera similar a como lo hacen en su tejido de origen, pudiendo interactuar con una matriz extracelular artificial.

Se estudió el efecto de los retinoides sobre la diferenciación celular de cultivos en Matrigel. Para ello suspensiones monocelulares de la línea LM38-LP fueron sembradas en Matrigel, y luego tratadas con el agregado de vehículo, ATRA, retinol, Ro41-5253 o sus combinaciones. Se evaluó el tipo de colonias formadas por microscopía de contraste de fase.

Se pudo observar que en situación control las colonias formadas son grandes y presentan un lúmen aparente, mientras que el tratamiento con retinoides induce la formación de colonias más pequeñas y con un lúmen más evidente (Figura 6.X).

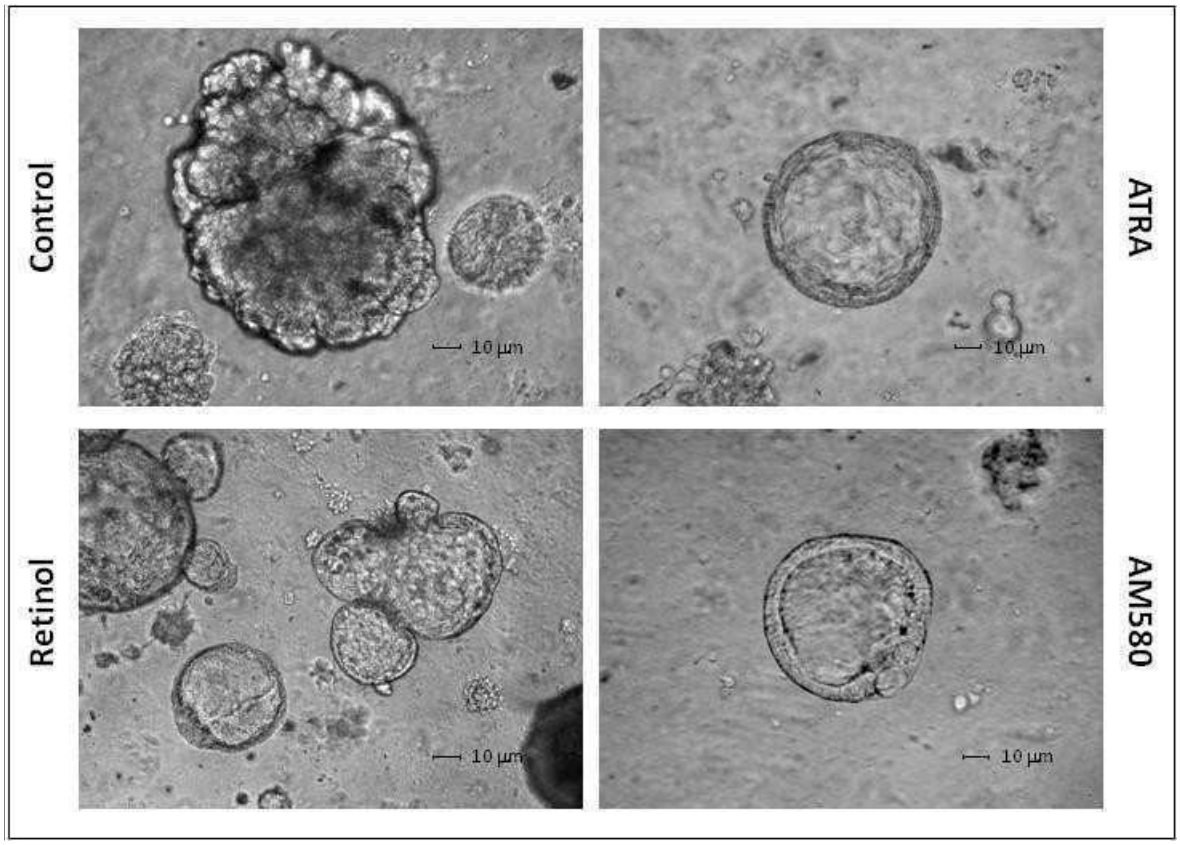


Figura 6.X. Efecto de los retinoides en la formación de colonias de la línea LM38-LP en cultivos 3D. Microscopía de contraste de fase. El tratamiento con Ro41-5253 presentó efectos muy variados entre los diferentes experimentos. Figura representativa de tres experimentos independientes (200X).

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 6

En este capítulo se quiso determinar algunos de los mecanismos implicados en la inhibición del crecimiento celular por parte de los retinoides.

Confirmamos que el tratamiento con retinoides disminuye la capacidad proliferativa de la línea LM38-LP tal como ha sido reportado por otros autores en múltiples tipos celulares[81,83,117]. Observamos que el efecto es más marcado con los tratamientos con ATRA y retinol que con el 9-*cis* en cuanto a la inhibición de la proliferación. Esto podría deberse a que en condiciones normales, los niveles de expresión de 9-*cis* son muy bajos, un aumento en estos niveles por el agregado exógeno impactaría en el funcionamiento del heterodímero RAR/RXR favoreciendo la formación de los homodímeros, por lo que el efecto anti-proliferativo del ATRA se vería disminuido. Por otro lado, hay que considerar que RXR es un receptor altamente promiscuo y que su activación con 9-*cis* puede favorecer la interacción con otros receptores distintos a los RARs[84].

Observamos que el tratamiento con ATRA induce un arresto en fase G0/G1 en la línea celular LM38-LP y que este efecto estaría siendo mediado en parte por la activación del receptor RARα. La línea celular LM38-LP tiene dos poblaciones mayoritarias con diferente ploidía[56], por lo que se puede decir que el pico en G1 observado frente al tratamiento retinoide en este trabajo, corresponde sólo a la sub-población de células LEP. En otro trabajo se vio que el compartimiento MEP no se arresta en una fase en particular[118]. Esto nos sugiere que el componente LEP sería el principal implicado en el arresto del ciclo celular, y lo haría activando la vía clásica de activación del sistema.

Por otro lado, observamos que en condiciones basales el componente MEP de la línea celular se encuentra, en su mayoría, arrestado dado los altos niveles de marcación contra p27 nuclear. En las mismas condiciones, la marcación de P-pRb dio cuenta de que la mayor parte de las células que integran el componente LEP se encuentran proliferando en condiciones basales de cultivo. Cuando las células fueron tratadas con

ácido retinoico pudimos observar un aumento de la proporción de células MEP arrestadas, mientras que las células LEP dejan de ciclar. Algunos autores han reportado que el tratamiento con ATRA induce el arresto del ciclo celular por un aumento en los niveles de p27 nuclear, aunque el gen que codifica esta proteína no presenta sitios RARE en su promotor[119]; por lo que la inducción de p27 es indirecta. Es interesante destacar que, como se mencionó anteriormente, la población MEP no parecería activar la vía clásica de respuesta al ácido retinoico, pero aún así responde a este tratamiento activando posibles vías alternativas que llevan, entre otros efectos, a un marcado arresto del ciclo celular.

Frente al tratamiento retinoideo sólo una sub-población de células relativamente pequeñas y ahusadas, que se encuentran bordeando los islotes de células LEP, permanecen ciclando. Esta población parecería ser resistente a la inhibición de la proliferación en respuesta al tratamiento con ATRA ya que la expresión de Akt fosforilado se encuentra restringida a esta sub-población celular. Estos resultados además podrían tener relación con el pequeño porcentaje de células insensibles al acido retinoico evaluadas mediante del ensayo de clonogenicidad. Este 4% de células no respondedoras y capaces de formar colonias, nos indicaría además que son más indiferenciadas.

La senescencia es un mecanismo presente en tumores pre-malignos, y la progresión hacia un fenotipo maligno requiere de evadir la senescencia[18]. En nuestro trabajo observamos que el tratamiento con retinoides induce senescencia principalmente en el compartimiento MEP de la línea LM38-LP.

Hace tiempo se ha reportado que los retinoides inducen apoptosis en diversos tipos celulares, incluyendo células tumorales[120]. En este trabajo no sólo observamos por distintas técnicas que el tratamiento con ATRA induce apoptosis en la línea celular tumoral LM38-LP, sino que por microscopía pudimos determinar que este efecto ocurre de manera diferencial viéndose afectado principalmente el compartimiento LEP de la línea.

Muchos agentes químicos que presentan actividad quimiopreventiva son capaces de mediar el proceso de diferenciación en muchas células pre-malignas y malignas. Los retinoides se encuentran entre los agentes diferenciadores más estudiados en el mundo[121]. Por ello quisimos analizar si el tratamiento retinoideo era capaz de modular la morfología de los esferoides y colonias en Matrigel formadas por las células LM38-LP. Observamos que los retinoides generaron agrupaciones celulares más organizadas, pequeñas y con un lúmen evidente tanto en células crecidas en suspensión, como sobre una matriz extracelular artificial, conduciendo así a un fenotipo más diferenciado.

Estos resultados sugieren que nuestro modelo celular respondería al tratamiento retinoideo de manera muy heterogénea, ya que los principales componentes de la línea responden en forma diferencial a este tratamiento y existe una sub-población insensible al mismo.

RESULTADOS

CAPÍTULO 7

OBJETIVO 3:

Estudiar *in vitro* el efecto de los retinoides sobre algunos procesos implicados en la diseminación metastásica en la línea celular LM38-LP y sus principales componentes celulares.

ACTIVIDAD DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA (UPA) Y DE METALOPROTEASAS

La invasión y la metástasis son eventos claves en la progresión tumoral, en los cuales se encuentran implicadas muchas moléculas, entre ellas las proteasas. Éstas desempeñan un papel importante en etapas tempranas de la carcinogénesis, en la invasión, en fenómenos asociados como la angiogénesis y en la metástasis, principalmente por su capacidad para degradar componentes de la matriz extracelular. Las proteasas son también moléculas de señalización que modulan a otras moléculas, formando cascadas de señalización que en conjunto determinan parte del potencial maligno[122].

Para evaluar el rol de los retinoides sobre efectos biológicos relacionados con la diseminación metastásica como la secreción de proteasas activas capaces de modificar la matriz extracelular, se realizaron ensayos de caseinólisis radial (actividad uPA) y zimografías para MMP-9. Para ello la línea celular LM38-LP fue tratada durante 5 días con vehículo, ATRA, retinol, el antagonista de RARα Ro41-5253 y sus combinaciones.

Tanto ATRA como retinol fueron capaces de inhibir la actividad de uPA y MMP-9 secretadas al medio de cultivo. Sorpresivamente el antagonista de RARα Ro41-5253 se comportó en forma similar a un retinoide agonista, inhibiendo también la actividad proteásica secretada. (Figura 7.I)

Figura 7.I. A) Ensayo de caseinólisis radial para cuantificar la actividad uPA secretada en el medio condicionado de la línea LM38-LP sometida al tratamiento con retinoides. Los valores se expresan como UI (Unidades Internacionales por μg de proteína) B) Actividad de MMP-9 soluble de la línea LM38-LP determinada por zimografías. Los valores se expresan como UA (Unidades Arbitrarias por μg de proteína). *$p<0,05$ ANOVA. Las figuras muestran los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GEN REPORTERO AP1-LUCIFERASA

Como se observó anteriormente, los retinoides inhibieron la actividad de las proteasas secretadas (uPA y MMP-9) y sorprendentemente el antagonista Ro41-5253 tuvo un efecto similar al ATRA. Teniendo en cuenta que los retinoides, a través de los RARs, *trans*-reprimen sitios AP1 y que los genes de MMPs y uPA están bajo este control, hemos empleado un gen reportero AP1-luciferasa con el fin de confirmar si Ro41-5253 es capaz de *trans*-reprimir a estos promotores. En la figura 7.II se puede observar que el antagonista de RARα induce una disminución de la actividad AP1-luciferasa tal como lo hicieron el resto de los retinoides.

Figura 7.II. Ensayo de actividad AP1-luciferasa. El gen de luciferasa se encuentra bajo la regulación de un promotor conteniendo sitios AP1. *p<0,05 ANOVA. Figura representativa de tres experimentos independientes.

EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE LA MIGRACIÓN DE LA LÍNEA LM38-LP

La capacidad migratoria de las células tumorales es un efecto biológico de suma importancia en cuanto a la diseminación metastásica. Por ello, se determinó el efecto del tratamiento retinoideo sobre la capacidad migratoria de la línea LM38-LP. Así, a monocapas subconfluentes de estas células pre-tratadas con vehículo, ATRA, retinol, Ro41-5253 o ATRA más Ro41-5253 se les realizó una herida de aproximadamente 400 μm de ancho y se analizó la capacidad de las células para cubrir la herida. Pudimos determinar que a las 10 horas de realizada la herida en las monocapas, sólo el tratamiento con ATRA disminuyó significativamente la capacidad migratoria de la línea celular LM38-LP (Figura 7.III.A). Este efecto no se vio afectado por la presencia del antagonista de RARα. Además, para determinar cuál era el componente celular implicado en este efecto se realizó un experimento similar donde por inmunofluorescencia pudimos observar que las células MEP, positivas para actina de músculo liso, eran las ubicadas en el frente de migración (Figura 7.III.B).

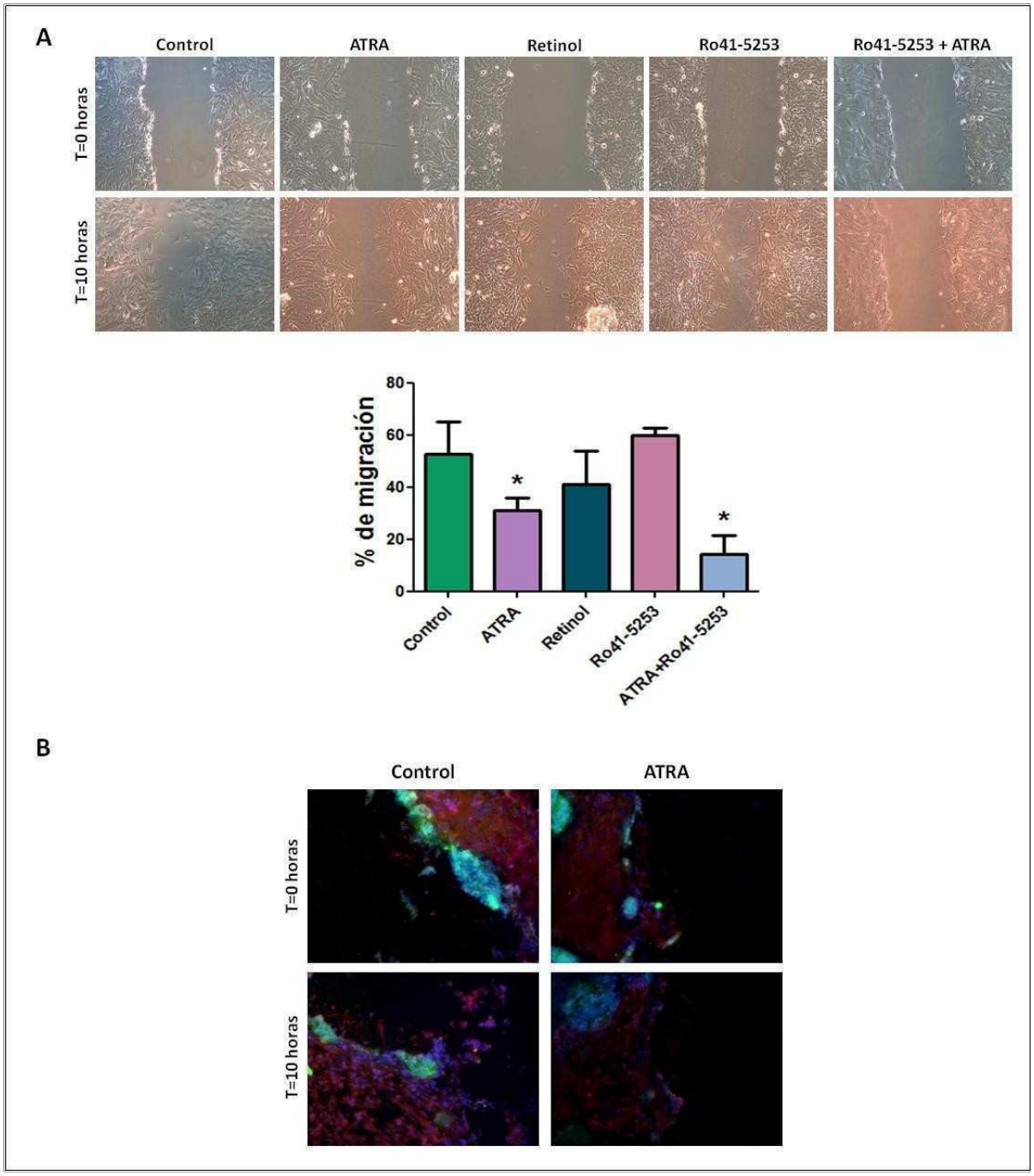


Figura 7.III. Ensayo de migración en herida para determinar la capacidad migratoria de la línea LM38-LP sometida al tratamiento con diferentes retinoides. A) El gráfico indica el porcentaje de migración a las 10 horas de tratamiento. Las fotos corresponden a la monocapa a distintos tiempos del tratamiento retinoide B) Inmunofluorescencia del ensayo de migración, se observa actina de músculo liso (rojo) y Caderina-E (verde). *p<0,05 ANOVA. Figura representativa de tres experimentos independientes.

EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE LA CAPACIDAD INVASIVA DE LA LÍNEA CELULAR LM38-LP

La capacidad invasiva de las células tumorales es otra etapa esencial de la diseminación metastásica. Empleando canastas tipo "*transwells*" cubiertas con Matrigel, estudiamos la capacidad invasiva de las células LM38-LP y de sus componentes LEP y MEP. De esta forma se pudo determinar que el tratamiento con ATRA disminuye la capacidad invasiva de las células MEP y de la línea mixta LM38-LP, mientras que el mismo tratamiento parece no afectar al componente LEP que prácticamente no es invasivo (Figura 7.IV).

Figura 7.IV. Ensayo de invasión en cámaras *transwell*. *p<0,05 ANOVA. La figura muestra los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE LA CAPACIDAD ADHESIVA DE LA LÍNEA CELULAR LM38-LP

Como otro fenómeno de gran importancia de la cascada metastásica, estudiamos la modulación de la capacidad adhesiva a algunos componentes de la matriz extracelular de la línea celular LM38-LP frente al tratamiento con ácido retinoico. Así, observamos que el tratamiento con ATRA aumentó la capacidad adhesiva de la línea mixta LM38-LP tanto a Fibronectina como a Seroalbúmina bovina (BSA), utilizada como proteína control (Figura 7.V). Por otro lado, al analizar los dos principales componentes celulares de esta línea, pudimos determinar que el tratamiento con ATRA mostró un aumento en la adhesión a Fibronectina sólo en el componente MEP. Además, este mismo tratamiento aumenta la adhesión a Colágeno I en todas las poblaciones estudiadas, aunque lo hace en forma más marcada en LM38-LP y en la población MEP (Figura 7.V).

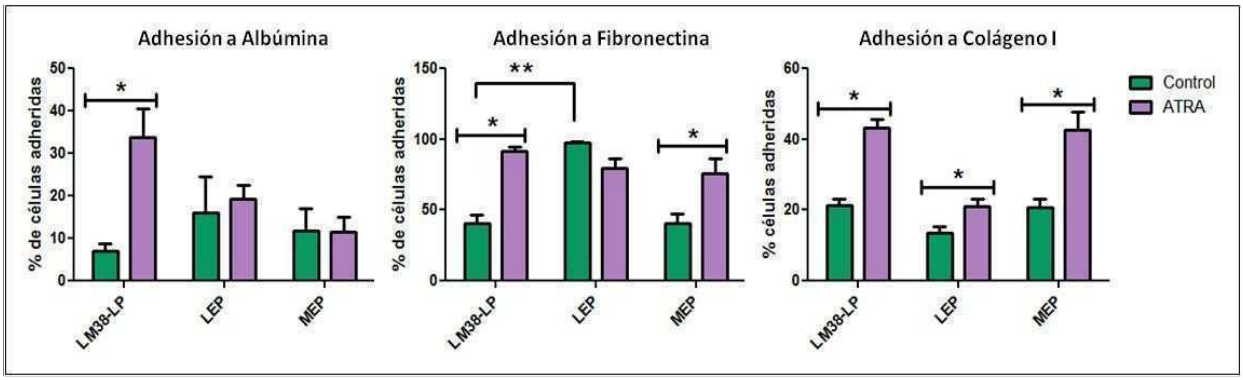


Figura 7.V. Ensayo de adhesión a algunos componentes de la matriz extracelular. El tratamiento con ATRA induce un aumento de la capacidad adhesiva, principalmente en el componente MEP. *p<0,05 ANOVA. Las figuras muestran los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE ALGUNOS GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMÁTICA

Los resultados previos nos permitieron determinar que el ácido retinoico modula en forma diferencial algunos de los eventos claves de la diseminación metastásica, pareciendo ser el componente MEP el más implicado en la progresión tumoral.

En la transición epitelio-mesenquimática (TEM), las células epiteliales pierden algunas estructuras relacionadas a la adhesión celular, modulando su polaridad y modificado la organización de su citoesqueleto. Las células comienzan a aislarse, a movilizarse y a presentar resistencia a la apoptosis. El fenómeno de TEM puede observarse durante la formación del mesodermo y la cresta neural en embriones de distintas especies[123]. Por otro lado, el proceso de TEM es inducido durante la progresión tumoral y la formación de metástasis[25].

Debido a la heterogeneidad celular de los tumores de mama, es probable que la contribución de un proceso como la TEM a la progresión tumoral varíe mucho entre los diferentes tipos de tumores.

Para evaluar el efecto del ATRA sobre la modulación en los niveles de transcripción de algunos genes implicados en la TEM, se llevó a cabo el análisis por PCR en tiempo real de un panel de 84 genes implicados en este proceso. El mismo se realizó analizando por separado los componentes LEP y MEP de la línea LM38-LP pre-tratada o no con ATRA.

Los resultados preliminares obtenidos nos sugieren que el tratamiento con ATRA inhibiría varios de los genes analizados, principalmente en el compartimiento LEP (Tabla 7.I).

La siguiente tabla representa la modulación de transcripción de un gen por el tratamiento con ATRA. Los valores se representan como “veces sobre el control”.

Genes	LEP	MEP	Funciones más relevantes	Referencia
Ahnak	-----	3.6	Rol en la adhesión celular. En la membrana plasmática, regula la organización del citoesqueleto de actina	124
Akt1	-9.9	-----	Sobrevida celular	18
Bmp1	-----	3.1	Diferenciación celular	123
Col1a2	-----	4.7	Adhesión celular y organización del citoesqueleto	4
Egfr	-37.0	-----	Crecimiento y proliferación celular	11
Foxc2	-19.2	-----	Factor de transcripción implicado en la activación de la TEM. Se correlaciona con la capacidad de formar metástasis a distancia	125
Fzd7	-127.7	-----	La disminución de su expresión disminuye la sobrevida, invasión y capacidad metastásica de células de cáncer de colon	126
Ilk	-3.6	-----	Capaz de promover la tumorigénesis en células de neuroblastoma. Rol en la inducción de la transición epitelio-mesenquimática	127, 128
Itga5	-64.5	-----	Promueve la migración de células de cáncer de mama. Además, modula migración e invasión.	129, 130
Itgb1	-----	3.9	Modula componentes del citoesqueleto, afectando la migración, invasión y adhesión celular	3
Jag1	-131.2	3.3	Proteína asociada a la capacidad metastásica de células mamarias tumorales. Su sobreexpresión se encuentran asociada a un mal pronóstico en cáncer de mama	131, 132

Mmp2	-88.3	-3.2	Altera la organización de las ME y las membranas basales. Aumentada en numerosos tumores	11
Mmp3	-3.7	-----	Altera la organización de las ME y las membranas basales. Aumentada en numerosos tumores	11
Mmp9	-318.4	-7.7	Altera la organización de las ME y las membranas basales. Aumentada en numerosos tumores	11
Mst1r	-192.9	-----	Su sobreexpresión lleva a la formación de tumores	133
Notch1	-41.9	-----	Rol crítico en el mantenimiento del balance entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis.	134
Ptk2	-15.1	-----	Relacionada con la invasión tumoral y sobrevida. Se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama y de colon altamente invasivos y metastásicos	135
Smad2	-25.1	-----	Media la señal del factor de crecimiento TGF-beta, por lo que regula procesos celulares como proliferación, apoptosis y diferenciación	9
Stat3	-83.4	-----	Controla un amplio rango de procesos celulares, incluyendo proliferación celular, oncogénesis y metástasis	136, 137
Steap1	-11.3	-----	Sobreexpresado en cáncer de mama y es regulado negativamente por 17-β-estradio en células MCF-7	138
Tgfb1	-18.2	-----	Regula proliferación, diferenciación, adhesión, migración y otras funciones celulares	11
Tmem132a	-569.2	-----	Importante factor de sobrevida celular	139
Twist1	-21.3	-----	De importancia en la regulación de la TEM. Su regulación negativa disminuye la capacidad migratoria e invasiva de algunas células tumorales	140, 141
Vcan	-232.5	-----	Funciona como marcador predictivo de recaída y presenta un impacto negativo en la tasa de sobrevida	142
Vim	4.1	-----	Asociada a la capacidad migratoria de las células	143
Wnt11	-294.6	-----	Se encuentra implicado en múltiples vías de acción que pueden producir respuestas muy variables, afectando procesos como proliferación y migración celular	144, 145, 146
Wnt5a	-46.2	-----	Se encuentra implicado en múltiples vías de acción que pueden producir respuestas muy variables, afectando procesos como proliferación y migración celular	147, 148

Tabla 7.I. Resumen de los genes implicados en la transición epitelio-mesenquimática modulados por el tratamiento con ácido retinoico. En azul y con valores negativos se indican las veces que

ese gen se encuentra regulado negativamente (ATRA frente a situación control), en rojo las veces que se encuentra regulado positivamente.

De los resultados ilustrados en la tabla, puede observarse que el componente LEP de la línea LM38-LP, responde al tratamiento retinoide regulando negativamente genes implicados en proliferación y sobrevida (como Fzd7, Mst1r, Tmem132a, Vcan y Wnt11), así como genes involucrados en migración, invasión y diseminación metastásica (como Jag1, Mmp9 y Wnt11).

Por otro lado, en la sub-población MEP sólo encontramos que el tratamiento retinoide aumenta los niveles de ARNm implicados en diferenciación, modulando negativamente los implicados en migración e invasión (como Mmp2 y 9).

En síntesis, estos resultados representan un paneo general que deberá ser confirmado por otras técnicas, aunque por el momento nos sugieren que el ácido retinoico inhibiría la progresión tumoral de la línea celular LM38-LP mediante la regulación diferencial de genes implicados en la transición epitelio-mesenquimática en los principales compartimientos celulares de la línea.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 7

En este capítulo del trabajo presentado pudimos determinar que el tratamiento con ácido retinoico afecta procesos claves implicados en la diseminación metastásica en forma diferencial entre los componentes LEP y MEP de la línea celular LM38-LP.

El tratamiento con ATRA, e incluso con el antagonista de RARα (Ro41-5253) induce una disminución en la actividad de las proteasas uPA y MMP-9 secretadas. Diversos autores[149] han reportado resultados similares al obtenido con Ro41-5253, sugiriendo que los mecanismos que regulan la actividad *trans*-represiva de los RARs son, de alguna manera, diferente a aquellos que regulan la *trans*-activación. Esta observación se basa en que existen retinoides que son incapaces de activar la respuesta clásica mediada por los RARs, pero sin embargo reprimen la actividad de AP1[149]. Muchas de las señales extracelulares y de las vías de transducción de señales convergen en el factor de transcripción AP1, un miembro de la familia de oncogenes Fos y Jun, que podría proveer un mecanismo para explicar el aumento de la expresión de MMPs en tumores malignos[150].

Por otro lado, el tratamiento retinoideo disminuye las capacidades migratorias e invasivas de la línea celular, principalmente modulando al componente MEP de la misma. Observamos que el tratamiento con ATRA induce un aumento en la capacidad adhesiva de la línea LM38-LP tanto a Colágeno como a Fibronectina y que este efecto también ocurrió en forma diferencial.

Una limitación de los estudios clínicos actuales es la imposibilidad de determinar si el fenotipo indiferenciado de un grupo celular se debe a la falta de diferenciación o a un proceso activo de TEM durante la progresión tumoral[151]. El análisis preliminar de un conjunto de genes implicados en la transición epitelio-mesenquimática nos confirma que el tratamiento con ácido retinoico modula la transcripción de estos genes en forma diferencial entre los dos compartimientos celulares. Siendo que las células LEP responden inhibiendo la mayoría de estos genes, mientras que el componente MEP activaría aquellos que conducen a mayor diferenciación (estos resultados deben ser validados por otras técnicas).

RESULTADOS

CAPÍTULO 8

OBJETIVO 4:

Determinar la existencia de una posible subpoblación de células stem/progenitoras en la línea celular LM38-LP.

ESTUDIO DE LA EXISTENCIA DE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS STEM/PROGENITORAS EN LA LÍNEA CELULAR LM38-LP

La Aldehido Deshidrogenasa 1 (ALDH1) es una enzima detoxificante responsable de la oxidación de aldehídos intracelulares. Esta enzima podría tener un rol en la diferenciación temprana de las células stem por su participación en la oxidación de retinol a ácido retinoico[72]. Se ha demostrado que las células stem presentan alta actividad de ALDH1; por lo que su actividad, junto con algunos marcadores de superficie, es usada como marcador de células stem/progenitoras. Por citometría de flujo pudimos detectar que, en condiciones basales, existe una subpoblación correspondiente al 4%, aproximadamente, en la línea celular LM38-LP que presenta alta actividad ALDH1. El tratamiento de monocapas de la línea celular LM38-LP con ATRA o con el agonista específico de RARα AM580 disminuyó significativamente el porcentaje de estas células (Figura 8.I). También se analizó, en forma conjunta, la proporción de células con los marcadores de células stem mamarias $CD44^+$, $CD133^+$ y $CD24^-$ obteniéndose resultados similares (datos no mostrados).

	Control	ATRA	AM580
% células ($ALDH^{hi}$, $CD24^{mid}$ o $CD133^{+}$)	4,37 ± 0,89	1,62 ± 0,73	1,48 ± 0,76

Figura 8.I. Análisis de citometría de flujo de células marcadas contra antígenos de células stem/progenitoras. Aproximadamente, el 4,37% de las células de la línea LM38-LP expresa marcadores de células stem mamarias. Figura representativa de 5 experimentos independientes.

Estos resultados junto con la observación de que la línea celular LM38-LP presenta una pequeña sub-población de células clonogénicas (aproximadamente del 4%) con cierta resistencia al efecto inhibitorio de la proliferación inducido por el tratamiento con retinoides, dan cuenta de la posible existencia de una población de células stem/progenitoras.

Para corroborarlo, hemos realizado un ensayo de cultivo de mamosferas (Figura 8.II). Para ello, se cultivaron en suspensión células LM38-LP, en muy baja concentración, en un medio selectivo para células stem/progenitoras. Se observó la formación de agregados constituidos por un número relativamente pequeño de células (de aproximadamente 20-30 células). Estos grupos celulares fueron disgregados e incubados nuevamente en suspensión, con medio selectivo a baja densidad celular. El proceso se repitió hasta asegurar la obtención de mamosferas formadas a partir de una única célula (Figura 8.II).

Figura 8.II. Esquema representativo de los ensayos utilizados con células con características stem/progenitoras. Adaptado de Dontu et. al.[116]

De esta manera determinamos que la línea LM38-LP presenta una sub-población de células capaces de formar mamosferas y que las mismas sufren un cambio en su morfología cuando son tratadas con ATRA o con AM580 (Figura 8.III.A).

En otro experimento, las mamosferas fueron disgregadas y sembradas en baja concentración, bajo las condiciones de cultivo normales para la línea LM38-LP, con el objetivo de evaluar si una célula proveniente de mamosfera tenía la capacidad de regenerar la línea mixta *in vitro*. Así, observamos que una única célula proveniente de mamosfera fue capaz de regenerar la línea celular mixta LM38-LP con sus dos componentes celulares principales, confirmando la existencia de una población de células stem/progenitoras mamarias bipotenciales (Figura 8.III.B).

Figura 8.III. Determinación *in vitro* de la existencia de células stem/progenitoras. A) La línea LM38-LP presenta una población de células capaces de formar mamosferas, las que sufren un cambio en su morfología al ser tratadas con retinoides (microfotografía en contraste de fase, X400). B) Cultivo en adhesión con medio completo de las mamosferas disgregadas a distintos tiempos. *Contraste de fase a 5, 7 y 12 días de cultivo (X400).* Figura representativa de 3 experimentos independientes.

Para determinar *in vivo* si la sub-población de células aisladas mediante el cultivo de mamosferas a partir de la línea celular LM38-LP era capaz de dar origen al mismo tumor que la línea completa, ratones BALB/c fueron inoculados con 100 células provenientes de las mamosferas previamente disgregadas o con $2x10^5$ células LM38-LP como control. Las células fueron inoculadas en forma ortotópica en la mama de los ratones y se comparó el crecimiento tumoral, la capacidad de formar metástasis espontáneas a distancia y la histología de los tumores formados.

Determinamos que las células provenientes de las mamosferas disgregadas son capaces de formar tumores en la mama del ratón tal como lo hace la línea mixta LM38-LP, pero con una tasa de crecimiento menor (Figura 8.IV.A). Al analizar la capacidad de formar metástasis espontáneas, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones inoculados con células provenientes de mamosferas y aquellos inoculados con la línea celular completa (Figura 8.IV.B). El análisis histopatológico determinó que los tumores formados a partir de mamosferas disgregadas presentan características histológicas muy similares a aquellos formados por la línea celular mixta LM38-LP

(Figura 8.IV.C) y el tumor original M38[56]. Estos resultados confirmarían la existencia de la sub-población stem/progenitora en la línea LM38-LP, capaz de reconstituir la línea con sus principales componentes celulares tanto *in vitro* como *in vivo*.

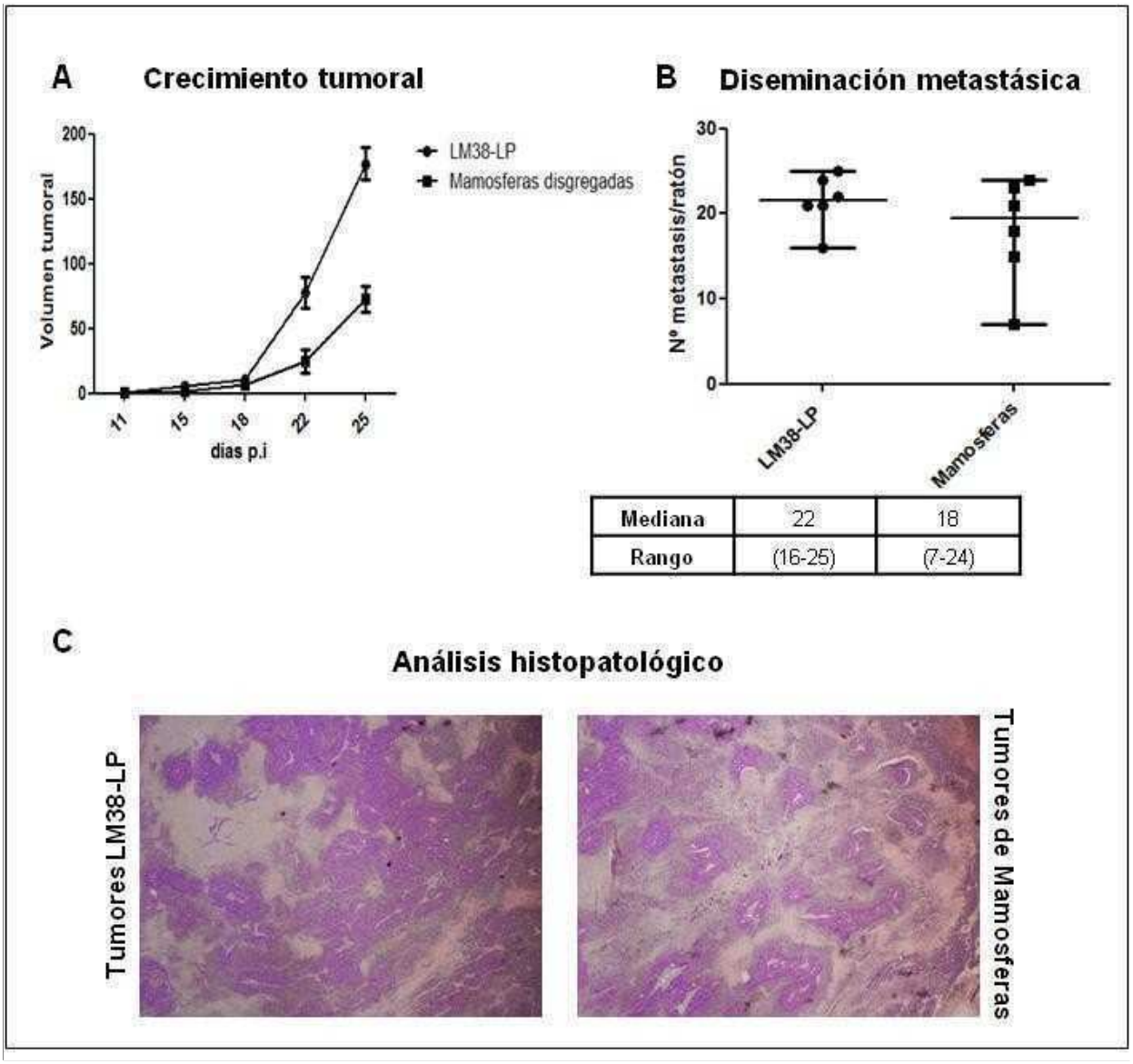


Figura 8.IV. Determinación *in vivo* de la existencia de la sub-población con características stem/progenitoras en la línea LM38-LP. A) Curva de crecimiento tumoral de células provenientes de mamosferas y de la línea mixta LM38-LP. B) Metástasis pulmonares espontáneas. Se grafica el número de nódulos pulmonares por ratón. Se indica la mediana y rango de cada grupo. Mann Whitney, NS. C) Histopatología de los tumores mamarios ortotópicos. Tanto los obtenidos por

inoculación de células de mamosferas como de la línea LM38-LP presentaron similares características de adenocarcinomas papilíferos diferenciados. (Hematoxilina y Eosina. 200X.)

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 8

Las células stem tumorales presentan la capacidad de auto-renovación y de diferenciarse, aún en forma aberrante, dando lugar a una población heterogénea de células tumorales. Las células parcialmente diferenciadas constituyen la mayor parte de la masa tumoral, pero no son el componente tumorigénico, debido a su limitado potencial proliferativo[75].

Los resultados presentados en este capítulo indican que la línea celular LM38-LP presenta un grupo de células bipotenciales parcialmente resistentes a los retinoides y capaces de regenerar la línea celular mixta original a partir de una única célula tanto *in vitro* como *in vivo*. La presencia de una población stem/progenitora en la línea celular LM38-LP abre un nuevo panorama en el uso de la línea celular LM38-LP como modelo de estudio. Por un lado, la presencia de células stem/progenitoras puede explicar la existencia de una sub-población con capacidad clonogénica y con aparente resistencia al tratamiento retinoideo. Por otro lado, la presencia de este grupo de células con características de stem/progenitoras, además de sus dos principales componentes celulares LEP y MEP, convierte a la línea celular LM38-LP en un interesante modelo para el estudio del cáncer de mama, ya que la misma presentaría importantes similitudes con los tumores mamarios humanos observados en la clínica.

El hallazgo de esta sub-población parcialmente indiferenciada, junto al hecho de que el tratamiento retinoideo ejerce sus efectos en forma diferencial en la línea celular estudiada, podría explicar los resultados tan variados y controversiales observados en los distintos pacientes frente al uso de diversos análogos retinoideos.

RESULTADOS

CAPÍTULO 9

OBJETIVO 5:

Valorar *in vivo* e *in vitro*, la participación de los receptores retinoides más involucrados en crecimiento y progresión tumoral, mediante el análisis de crecimiento, invasividad y capacidad metastásica de sublíneas de LM38-LP modificadas o no genéticamente para algunas moléculas del sistema del ácido retinoico.

GENERACIÓN DE SUB-LÍNEAS DERIVADAS DE LM38-LP POR TRANSFECCIÓN ESTABLE

Con el fin de determinar la importancia de los distintos receptores de ácido retinoico, se generaron por transfección estable diferentes sub-líneas de LM38-LP que sobre-expresan los receptores RARα1, RARβ2, RARγ1 o RARγ2; o que presentan silenciados los receptores RARα, RARβ o RARγ, mediante shARN específicos. Una vez realizada la transfección, se recolectaron todas las células resistentes al agente de selección correspondiente a fin de generar sublíneas representativas de la línea mixta. Se confirmó la sobreexpresión o el silenciamiento de los diferentes receptores por PCR (Figura 9.I.A) y por Western blot (no mostrado).

Las sub-líneas generadas presentaron una morfología diferente a la de la línea parental LM38-LP. En todos los casos las células fueron más pequeñas y ahusadas (Figura 9.I.B), por lo que se las caracterizó por inmunofluorescencia contra Caderina-E (marcador del componente LEP) y contra actina de músculo liso o SMA (marcador del componente MEP). Sorprendentemente observamos que todas las sub-líneas generadas presentaban marca positiva sólo para SMA (Figura 9.I.C), y que esta marcación no es modificada con el tratamiento con ATRA.

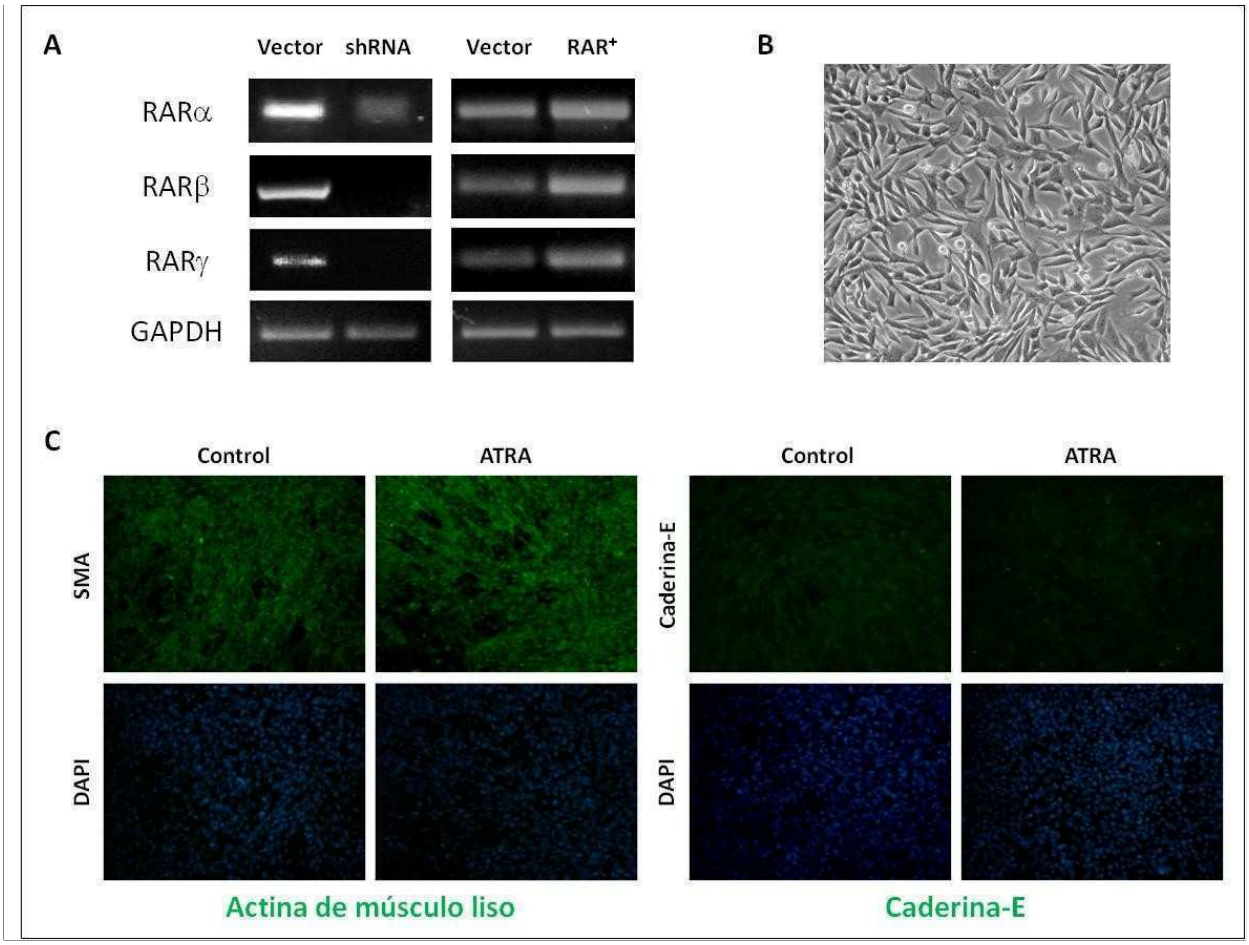


Figura 9.I. Generación de sub-líneas que presentan silenciados o sobre-expresados algunos receptores RARs por transfección estable. A) La transfección fue confirmada por RT-PCR. B) Monocapa sub-confluente representativa de las sub-líneas generadas. Estas sub-líneas están constituidas por células pequeñas ahusadas. C) Inmunofluorescencia para SMA o Caderina-E en monocapas de sub-líneas de LM38-LP transfectadas en forma estable. Microscopía de epifluorescencia (200X).

PAPEL DE LOS DIFERENTES RARs SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL *IN VIVO* FRENTE AL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO

Con el fin de determinar si el tratamiento con ATRA afecta el crecimiento tumoral y/o la capacidad metastásica de la línea LM38-LP modificada o no por transfección estable, se realizaron ensayos inoculando estas sublíneas en ratones BALB/c en forma ortotópica. En todos los casos, cuando los tumores fueron palpables se aplicó el tratamiento retinoideo en forma de pellet subcutáneo de liberación lenta (10 mg/ratón) durante tres semanas (final del experimento).

Pudimos observar que el tratamiento con ATRA disminuyó el volumen tumoral de los ratones portadores de tumor LM38-LP en forma significativa a partir de los siete días de tratamiento (Figura 9.II.A). El mismo tratamiento indujo una disminución del número de metástasis espontáneas en pulmón (Figura 9.III.B), sin afectar otros órganos.

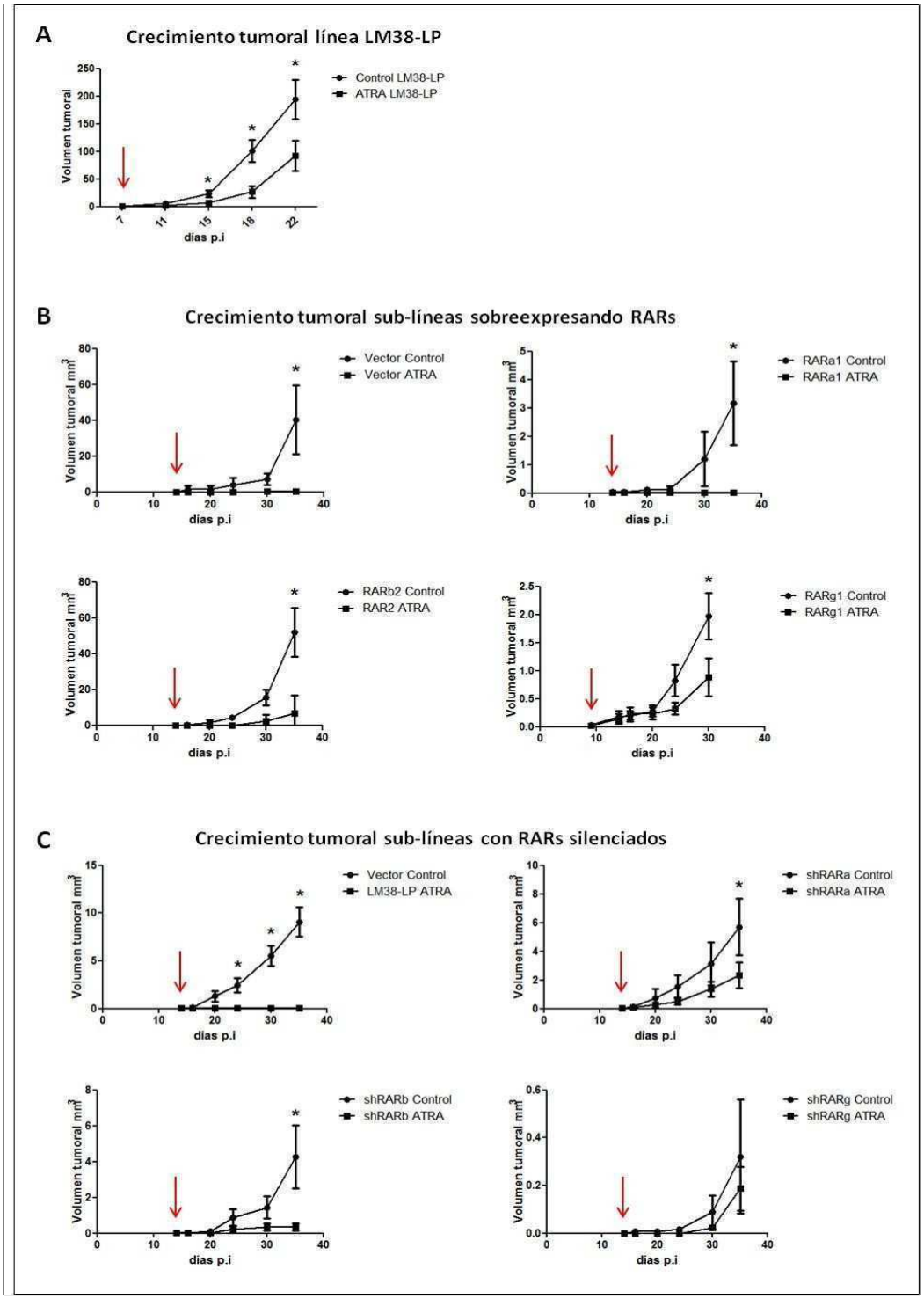


Figura 9.II. Efecto del ATRA sobre el crecimiento tumoral en ratones singeneicos. A) En la figura se esquematizan las curvas de crecimiento tumoral en ratones inoculados en forma ortotópica con células LM38-LP, o B) las sub-líneas que presentan los diferentes RARs sobre-expresados o

C). Silenciados. n=10 ratones por grupo experimental. ANOVA. *p<0,05. Las figuras esquematizan los resultados obtenidos en 2 experimentos independientes.

Pudimos observar que los tumores desarrollados a partir de la inoculación de células LM38-LP modificadas ya sea para la sobreexpresión o silenciamiento de los diferentes RARs, tuvieron un período de latencia mayor que los desarrollados por la línea mixta. Estos tumores se hicieron palpables a los 14 días post-inóculo, momento en el cual se inició el tratamiento retinoide a través de pellet de liberación lenta (igual esquema q para la línea mixta)

La figura 9.II.B muestra las curvas de crecimiento para los tumores desarrollados por las sub-líneas que sobreexpresan los diferentes isotipos de RARs. Podemos observar que en todos los casos, (incluso en las transfectadas con el vector vacío) el crecimiento tumoral fue menor que en el alcanzado por la línea mixta. Los tumores que sobreexpresan RARβ se comportan en forma similar a las transfectados sólo con el vector (control) incluso en cuanto a su respuesta a la inhibición del crecimiento frente al tratamiento con ATRA, donde los tumores prácticamente no crecieron.

Además, los tumores desarrollados a partir de células modificadas para la sobreexpresión de las isoformas RARα1 y RARγ1 presentaron un crecimiento hasta veinte veces menor que en la situación control (vector vacio) y si bien ambos respondieron al tratamiento retinoide inhibiendo el crecimiento, este efecto fue fuertemente marcado en los tumores que sobreexpresan la isoforma inducible RARα1, donde casi no hubo crecimiento tumoral bajo tratamiento (Figura 9.II.B).

Por otro lado, los tumores desarrollados por las células LM38-LP silenciadas para los isotipos RARα, RARβ y RARγ o tranfectadas con el control vacío (control), también mostraron un crecimiento mucho menor que el alcanzado por la línea mixta (Figura 9.II.C).

Pudimos observar que los tumores shRARα y los shRARβ, tuvieron un comportamiento similar tanto en la situación control (sin tratamiento) como frente al tratamiento retinoide. Basalmente, los tumores shRARα y shRARβ, alcanzaron un crecimiento menor de hasta aproximadamente el 50% a los transfectados con el vector vacío y

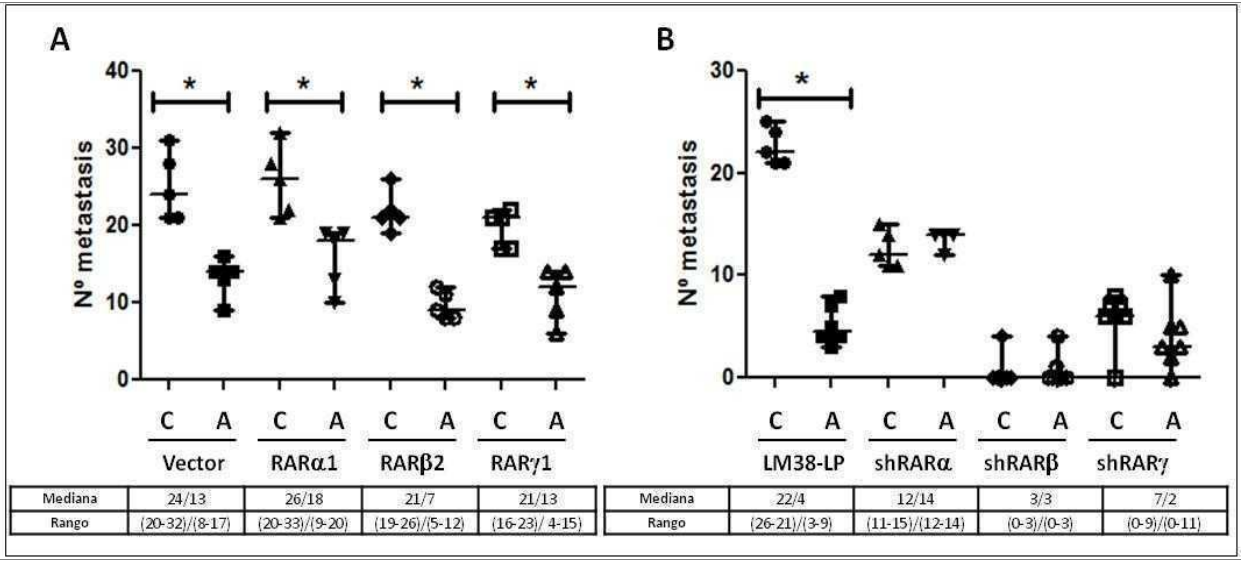
respondieron al ATRA con una inhibición del crecimiento de 3 y 4 veces aproximadamente respectivamente. (Figura 9.II.C).

Fue muy interesante notar que los tumores que presentaban silenciados el receptor RARγ, tuvieron un crecimiento muy lento, permaneciendo como “palpables” durante todo el experimento (95% menor que el control) y sin respuesta al tratamiento retinoide. (Figura 9.II.C).

Respecto a la diseminación metastásica, pudimos observar que la línea mixta LM38-LP responde al tratamiento retinoide, con una marcada disminución del número de las metástasis pulmonares y que el grupo de ratones inoculados con las sub-líneas transfectadas con vector vacío, mostraron similar comportamiento (Figura 9.III.A). El vector vacío utilizado como control para la sobreexpresión de los RARs presentó resultados similares que el vector vacío utilizado como control del silenciamiento de los RARs, por lo que se muestra sólo uno de los resultados.

Todos los tumores que sobreexpresaban algunos de los isotipos RAR, mostraron el mismo comportamiento que el control tanto en forma basal, como en cuanto a la reducción del número de metástasis frente al tratamiento con ATRA (Figura 9.III.A).

Sin embargo, en los grupos experimentales de ratones que portaban tumores silenciados para alguno de los RARs, se pudo observar que basalmente el número de metástasis fue notablemente menor sin modificarse ante el tratamiento con ATRA, incluso para aquellos tumores shRARγ, que no habían alcanzado desarrollo del tumor primario (Figura 9.III.B).



	Vector	RARα1	RARβ2	RARγ1
Mediana	24/13	26/18	21/7	21/13
Rango	(20-32)/(8-17)	(20-33)/(9-20)	(19-26)/(5-12)	(16-23)/ 4-15)

	LM38-LP	shRARα	shRARβ	shRARγ
Mediana	22/4	12/14	3/3	7/2
Rango	(26-21)/(3-9)	(11-15)/(12-14)	(0-3)/(0-3)	(0-9)/(0-11)

Figura 9.III. En la figura se esquematiza el número de metástasis totales por pulmón de cada grupo experimental. A) Número de metástasis espontáneas generadas por la línea celular LM38-LP y las sub-líneas generadas al silenciar receptores RARs. B) Número de metástasis espontáneas generadas por los tumores que sobre-expresan los receptores RARs. Mann Whitney. *p<0,05. Las figuras esquematizan los resultados obtenidos en 2 experimentos independientes.

ACTIVIDAD DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA (UPA) Y DE MMP-9

Para analizar la importancia de la expresión de los distintos receptores RARs respecto a algunos efectos biológicos relacionados con la diseminación metastásica, se realizaron ensayos de caseinólisis radial (actividad uPA) y zimografías (MMP-9) con las diferentes sub-líneas que presentan sobreexpresados o silenciados los distintos receptores RARs, tratadas o no con ATRA.

Pudimos observar que las sub-líneas que presentan silenciados los distintos receptores RARs no presentan actividad uPA ni MMPs solubles, y que el tratamiento con ATRA no modifica este comportamiento (datos no mostrados).

Por otro lado, las sub-líneas que sobreexpresan los RARs se comportan de igual manera que la línea mixta LM38-LP, presentando una elevada actividad uPA secretada,

que disminuye frente al tratamiento retinoide (Figura 9.II.A). Similares resultados fueron obtenidos al analizar la actividad MMP-9 (Figura 9.II.B).

Figura 9.II. A) Determinación de la actividad uPA secretada por caseinólisis radial. Los valores se expresan como UI (Unidades Internacionales por μg de proteína). B) Determinación de la actividad MMP-9 secretada por la técnica de zimografía. Los valores se expresan como UA (Unidades Arbitrarias por μg de proteína). *p<0,05, ANOVA. Figuras representativas de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en este capítulo pueden resumirse en la siguiente tabla:

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 9

En esta sección del trabajo presentado pudimos determinar que en la línea celular LM38-LP la expresión de todos los RARs sería necesaria para el crecimiento y progresión tumoral de la misma.

Es interesante notar que la transfección estable de las células LM38-LP con cualquiera de los vectores empleados, da lugar a sub-líneas morfológicamente diferentes respecto de la línea parental. Como se explicó anteriormente, la línea celular LM38-LP está compuesta por dos compartimientos principales (luminal y mioepitelial), pero además demostramos la existencia de una sub-población con características stem/progenitora, lo que puede generar a un gradiente de células que se encuentran en diferentes estadíos de diferenciación, dando lugar a una gran variedad celular. Estos tipos celulares pueden presentar diferentes eficiencias de transfección; así, al transfectar en forma estable y exponer las células a un agente de selección, podríamos haber seleccionado un grupo de sub-poblaciones celulares con las características observadas en este capítulo.

Por otro lado, estas sub-líneas generadas por transfección presentan un crecimiento *in vivo* considerablemente más lento que el presentado por la línea LM38-LP. Asimismo, si bien los volúmenes tumorales generados por células transfectadas eran muy pequeños, incluso a veces no evidentes, estas sub-líneas fueron capaces de generar metástasis espontáneas a distancia.

El receptor RARβ2 es considerado el principal responsable de ejercer los efectos pro-apoptóticos y diferenciadores del ácido retinoico, por lo que su expresión puede ser considerada como factor clave para la respuesta frente al tratamiento con retinoides para conducir al tumor hacia un fenotipo menos maligno. Sin embargo, el silenciamiento de este receptor conduce al desarrollo de tumores muy pequeños con poca capacidad metastásica. La respuesta encontrada sobre la inhibición del crecimiento frente al tratamiento retinoide da cuenta que otros receptores retinoideos también son importantes para conducir a este efector en el sitio primario.

Por otra parte, la sobreexpresión del receptor constitutivo RARα1 conduce al desarrollo de tumores muy pequeños, metastásicos y respondedores a la terapia con ATRA. Este receptor estaría, en nuestro modelo, ampliamente involucrado tanto en crecimiento tumoral como en la diseminación metastásica, ya que su ausencia, lo transforma en poco respondedor al tratamiento retinoide.

Los tumores que no expresan RARγ no crecen localmente pero conservan su capacidad de dar metástasis. Tal como se indicara en la bibliografía, este receptor participaría sobre todo del crecimiento del tumor primario.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo tuvo como objetivo investigar el papel del sistema del Ácido Retinoico en el comportamiento metastásico del tumor mamario murino LM38-LP compuesto por células luminales (LEP) y mioepiteliales (MEP), para lo cual se emplearon estudios *in vivo* e *in vitro*, y estrategias farmacológicas y genéticas

Nosotros hipotetizamos que la interacción entre los componentes LEP y MEP podría estar alterada en el cáncer de mama, induciendo a una desregulación de componentes del sistema del Ácido Retinoico, de manera que estas alteraciones le conferirían ventajas a la célula tumoral en la cascada metastásica.

La línea murina LM38-LP resulta un excelente modelo para el estudio de diversos aspectos biológicos relacionados a la progresión de los tumores de mama con características basales (en especial los denominados tripes negativos) y además es una buena herramienta para el desarrollo de estudios pre-clínicos en cáncer de mama, dado que la misma presenta los principales componentes celulares de la glándula mamaria tales como células luminales, células mioepiteliales y un probable compartimiento de células stem/progenitoras[44,56].

El ATRA es el retinoide natural más abundante y ha sido estudiado durante muchos años. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de linfoma, leucemia, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, neuroblastoma y glioblastoma. Su uso más efectivo hasta el momento se observó en el tratamiento de la Leucemia Promielocítica Aguda[96].

En los últimos años, el uso de los retinoides en el tratamiento y/o prevención del cáncer ha tenido resultados controversiales. Mientras ha resultado sumamente efectivo en el tratamiento de la Leucemia Promielocítica Aguda, no se han obtenidos similares resultados para el tratamiento de los tumores sólidos. Sin embargo, se los utiliza con éxito como quimopreventivos[152].

Teniendo en cuenta que la glándula mamaria está compuesta por dos tipos mayoritarios de células, las epiteliales y las células mioepiteliales que rodean a las anteriores, se especula que estas últimas actuarían creando un microambiente favorable para la progresión tumoral, pero poco se conoce acerca de los mecanismos involucrados en la interacción entre ambos componentes[55,56,57]. Considerando tanto la ubicación espacial de ambos componentes celulares así como también las posibles modificaciones genéticas adquiridas en las células transformadas, es de esperar que cada sub-población responda en forma diferencial ante el mismo tratamiento. Más aún, este comportamiento diferencial podría explicar en parte por qué varios tipos de tumores mamarios presentan resistencia o menor respuesta a los tratamientos convencionales.

El hecho que esta línea exprese los principales receptores de Ácido Retinoico y que los mismos sean funcionales la convierte en una herramienta muy útil para el análisis del papel de sistema del ácido retinoico en la progresión maligna en cáncer mamario. Por otro lado, la capacidad de la línea celular LM38-LP para responder al tratamiento con retinol nos sugiere que esta línea presenta los componentes responsables de metabolizar el retinol a ATRA intactos.

En este trabajo pudimos observar que la línea celular LM38-LP expresa los principales receptores de ácido retinoico en forma diferencial. Mientras que los dos componentes celulares de la línea son capaces de transcribir el gen que codifica para RARα1, las formas inducibles por ATRA, RARα2 y RARβ2, sólo fueron evidentes en el compartimiento LEP.

En relación a la funcionalidad de los RARs, ésta fue demostrada no solo mediante un ensayo con el gen reportero RARE-luciferasa, sino también porque el tratamiento con ATRA indujo un evidente aumento en los niveles de ARNm para RARβ2 y CRBP-I, ambos genes blanco de RARs activados. Cabe aclarar que en la vía clásica del sistema retinoideo, RARα1, que se encuentra expresado en forma constitutiva en las células, se activa una vez unido a su ligando y es capaz de transcribir a sus genes blanco[90,153].

Este conjunto de resultados pertenecientes al primer objetivo de este trabajo, fue el primer indicio que sugería que solamente el componente LEP podría estar actuando a través de la forma clásica o genómica del sistema retinoide, ya que el componente MEP tendría alterada esta parte del sistema (no aumenta los niveles de RARα2 ni RARβ2 frente al tratamiento con retinoides).

De todas maneras, si bien el componente MEP no responde de la misma manera, a lo largo de este trabajo observamos que el tratamiento con ATRA modula varios comportamientos biológicos en este compartimiento, lo que nos permite plantear la hipótesis de que el componente MEP de la línea LM38-LP respondería al tratamiento retinoideo por una vía alternativa no genómica.

Hace tiempo se demostró que los retinoides presentan un efecto inhibitorio del crecimiento[154]. Los retinoides son esenciales en el control del desarrollo, la proliferación y diferenciación celular[81]. Uno de los principales mecanismos por el cual el ácido retinoico es capaz de regular el crecimiento celular es mediante la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular[82]. Al tratar la línea LM38-LP con diferentes retinoides pudimos comprobar que las células respondieron con la inhibición de proliferación celular. Esta inhibición del crecimiento puede ser explicada en parte por un arresto del ciclo celular en G0/G1[155,156], tal como pudimos observar por citometría de flujo y Western blot contra algunas moléculas relacionadas con la regulación del ciclo celular. Los efectos del ATRA sobre estos parámetros fueron inhibidos en presencia del antagonista de RARα, Ro41-5253, lo que sugiere que este efecto estaría siendo mediado por la activación de dicho receptor, estando implicada la vía clásica de acción del ácido retinoico[153].

Varios autores han demostrado que los tumores de mama que expresan receptores de estrógeno (RE) funcionales son más sensible al efecto inhibitorio del crecimiento del ATRA, debido a la correlación positiva con el receptor RARα. Mientras que la mayor parte de los tumores RE negativos son resistentes al tratamiento retinoideo[109,157,158]. Pero nuestra línea celular LM38-LP es RE negativo[56], expresa RARs funcionales, al menos en uno de sus compartimientos celulares, siendo una línea celular sensible al

tratamiento retinoide, aunque con una respuesta heterogénea al mismo entre sus diferentes componentes celulares.

Por otro lado, los retinoides modularon los niveles de expresión de Erk fosforilado, proteína implicada en la regulación de la mitogénesis, y de Akt fosforilado, implicada en vías regulatorias de la supervivencia celular, en la línea celular LM38-LP. Estos resultados sugieren que estas vías de señalización estarían implicadas en la inhibición del crecimiento ejercida por los retinoides. Al mismo tiempo, esta inhibición estaría mediada por la activación de la vía clásica de respuesta al ácido retinoico, dado el marcado efecto inducido por el agonista de RARα, AM580. Mediante inmunofluorescencia pudimos discernir que la expresión de Akt fosforilado está limitada a una sub-población celular que bordea los islotes de células LEP, y que permanece insensible frente al tratamiento con ATRA.

La inhibición del crecimiento celular ejercida por los retinoides también puede ser explicada por la inducción de senescencia principalmente en el componente MEP de la línea celular LM38-LP. Es interesante destacar que muchos de los genes implicados en la inducción de senescencia no presentan sitios RARE en sus promotores[19,159], lo que implicaría que algunos genes pueden ser regulados por los retinoides de manera indirecta. Este hecho es coherente con la idea de que los retinoides inducen senescencia en el compartimiento MEP de LM38-LP a través de vías alternativas de acción del ácido retinoico.

En condiciones basales el compartimiento MEP de la línea celular LM38-LP se encuentra en su mayoría arrestado en el ciclo celular tal como se evidenció, a través de la técnica de microscopía confocal, por el gran número de células mioepiteliales con marcación positiva para p27 nuclear. En las mismas condiciones, la mayor parte del compartimiento LEP se encuentra ciclando y presenta marca positiva para P-pRb. Frente al tratamiento con ATRA, el arresto del ciclo celular en el componente MEP se hizo más evidente al mismo tiempo que la población LEP dejó de proliferar. Sólo un grupo de células que delimitan el compartimiento LEP mantuvieron su positividad para P-pRb, sugiriendo que permanecían ciclando aún después del tratamiento retinoideo, lo que nos permite hipotetizar que sería una pequeña sub-población resistente a los

retinoides. En su conjunto estos resultados nos indican además que aun en condiciones basales, los diferentes componentes de la línea celular actúan en forma diferencial.

Por último, con el fin de explicar los mecanismos implicados en la inhibición del crecimiento mediada por retinoides, pudimos determinar que el tratamiento con ATRA durante 3 días induce apoptosis únicamente en el compartimiento LEP. Transcurridos más de 4 días de tratamiento, comienza a observarse apoptosis también en el compartimiento MEP.

El arresto del crecimiento celular mediado por retinoides puede conducir a la diferenciación terminal así como a la apoptosis[120]. La apoptosis es un importante proceso fisiológico para el desarrollo normal y la homeostasis tisular. La inducción de la apoptosis puede representar un importante mecanismo por el cual los retinoides inhiben el crecimiento de las células tumorales. Por ello, la alteración de la actividad de los receptores retinoideos puede conducir a la supresión de la apoptosis y resultar en la acumulación patológica de células aberrantes y formación de tumores. Ciertos análisis de expresión génica han revelado que el ácido retinoico induce la expresión de varios genes pro-apoptóticos, incluyendo caspasa 7 y caspasa 9. Mientras que la caspasa 7 una respuesta indirecta a la señal de ácido retinoico, la caspasa 9 es un blanco directo para RAR y contiene un sitio RARE funcional en su segundo intrón[160]. Algunos autores han reportado que los retinoides pueden promover apoptosis de las células de cáncer de mama mediante la inducción del receptor RARβ2[161]. Estos datos concuerdan con nuestros resultados, donde el tratamiento con ATRA indujo apoptosis principalmente en el compartimiento LEP, la sub-población que frente al tratamiento retinoide es capaz de inducir la expresión de RARβ2.

En resumen, los resultados de esta primer parte nos sugieren que el ácido retinoico inhibe el crecimiento de la línea celular LM38-LP por diversos mecanismos que actúan en forma diferencial sobre los diferentes compartimientos celulares que componen la línea. Por un lado, la inducción de senescencia del componente MEP; por otro lado, la inhibición del ciclo celular, arresto y posterior inducción de la apoptosis del componente

LEP. A partir de estos primeros ensayos es interesante destacar la existencia de una población de células pequeñas y ahusadas con un comportamiento muy distinto al de los dos componentes principales de la línea. Esta tercera población es la única que frente al tratamiento con ATRA permanecería proliferando y que en condiciones basales expresa altos niveles de Akt fosforilado.

Por otro lado, la capacidad clonogénica de la línea celular, el cultivo de células en 3D y la formación de esferoides brindan una herramienta de estudio más cercana a la fisiología real de la mama y el cáncer en este órgano[162]. Los ensayos de clonogenicidad realizados dan cuenta de la existencia de una sub-población de aproximadamente el 4% de la línea celular LM38-LP con capacidad clonogénica y aparentemente resistente al tratamiento con retinoides. La capacidad de formar esferoides es un rasgo característico de las células provenientes de tumores sólidos, y la heterogeneidad morfológica de estos esferoides es un parámetro indirecto de la malignidad del tumor, asociada al grado de desdiferenciación del mismo[163]. La línea LM38-LP no sólo es capaz de formar estos esferoides “bicelulares” y parcialmente polarizados, sino que además puede formar colonias en Matrigel a partir de una suspensión monocelular. En situación control, las células que componen a la línea LM38-LP forman esferoides con cierto grado de diferenciación, un lumen en formación y células LEP y MEP según se demostró anteriormente[56]. En Matrigel se forman colonias grandes, algo desorganizadas y con escaso lúmen. En ambos tipos de cultivos, cuando las células fueron tratadas con distintos retinoides, forman colonias y esferoides más pequeños, más organizados y con lúmen aparente. El efecto de los retinoides sobre la diferenciación celular ya ha sido demostrado anteriormente en el desarrollo embrionario y en algunos cultivos de células tumorales por varios autores[164,165]. Así, podemos concluir que los diferentes retinoides ensayados en este trabajo ejercerían también un efecto diferenciador sobre gran parte de las células de la línea LM38-LP crecidas en suspensión o en una matriz extracelular artificial reconstituida. Se requieren más estudios para confirmar el efecto diferenciador de los retinoides en este sistema bicelular.

Otro de los objetivos de este trabajo fue determinar el efecto del ácido retinoico sobre algunos parámetros implicados en la diseminación metastásica, tratando de discriminar cual sería el rol y la respuesta a los retinoides de cada uno de los componentes celulares de la línea en estudio.

La secreción de proteasas se relaciona directamente con el grado de malignidad de un tumor, dado que estas enzimas constituyen un determinante crítico en la invasión tumoral[166]. El tratamiento con ATRA y con retinol inhibió tanto la actividad de uPA secretada así como la de MMP-9. Este efecto no fue revertido cuando la línea LM38-LP fue tratada con ATRA en presencia del antagonista de RARα1 (Ro41-5253), lo cual nos sugiere que este efecto no sería mediado por la activación clásica de los receptores RARs (vía genómica), que no sólo incluye la activación de los sitios RARE, sino también la *trans*-represión de sitios AP1 a través de los RARs activados por ligando. Es interesante destacar que Ro41-5253 se comportó como un retinoide agonista en cuanto a su capacidad de inhibir la actividad de proteasas secretadas.

Estos resultados fueron confirmados por el ensayo con el gen reportero luciferasa bajo el control de un promotor conteniendo sitios AP1. Se sabe que los genes que codifican para las proteasas estudiadas en este trabajo contienen en su promotor secuencias AP1. Así, muchas de las señales extracelulares y de las vías de transducción de señales convergen en el factor de transcripción AP1, un miembro de la familia de oncogenes Fos y Jun, implicados en el aumento de la expresión de MMPs en tumores malignos[167]. En este ensayo confirmamos que el antagonista Ro41-5253, disminuye la actividad AP1-luciferasa al igual que lo hacen ATRA y retinol. Este comportamiento podría deberse a que este antagonista no es altamente específico y podría comportarse como un agonista parcial para otros receptores retinoides.

Por otro lado, trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la actividad proteásica secretada por el clon mioepitelial D2 (línea celular LM38-D2), originado a partir de la línea LM38-LP se encuentra significativamente aumentada respecto a la actividad presentada por la línea LM38-HP derivada de la misma línea parental. Además, varios autores han demostrado que los genes que codifican estas proteasas

secretadas no contienen sitios RAREs en sus promotores[168]. En conjunto, estos datos nos sugieren que la actividad de las proteasas evaluadas en este trabajo podría atribuirse principalmente al componente MEP de la línea LM38-LP. Estos resultados nos permiten suponer que el antagonista de RARα1 no actuaría como tal debido a que en el componente MEP de la línea la respuesta a retinoides no estaría siendo mediada por la activación clásica de los receptores RARs, sino por vías alternativas no genómicas.

Al analizar la capacidad migratoria de la línea LM38-LP sobre una herida realizada en la monocapa celular, determinamos que el tratamiento con ATRA disminuye significativamente la capacidad migratoria de estas células. El uso del antagonista Ro41-5253 no inhibió el efecto del ácido retinoico sobre la motilidad celular, sugiriendo nuevamente que la capacidad migratoria de la línea celular LM38-LP no sería consecuencia de la activación de la vía genómica del ácido retinoico. Más aún, por inmunofluorescencia contra Caderina-E y SMA pudimos determinar que el frente de migración está compuesto principalmente por células MEP, esto concuerda con el hecho de no observar un efecto antagonista al emplear Ro41-5253 conjuntamente con ATRA, debido a que este compartimiento respondería al tratamiento retinoide activando una vía no genómica.

Por otro lado, al estudiar la capacidad de la línea LM38-LP para invadir una matriz extracelular artificial, observamos que el tratamiento con ATRA disminuye la invasión, y que el componente MEP es el responsable sobre esta característica.

Algunos autores[169,170] han reportado que el tratamiento con ácido retinoico o derivados del mismo inducen un aumento en los niveles de expresión de algunas moléculas implicadas en la adhesión celular. Cuando se analizó la capacidad adhesiva de la línea celular LM38-LP a algunos componentes de la matriz extracelular se observó que el tratamiento con ATRA induce un aumento en la adhesión de la línea mixta a Fibronectina y Colágeno. Al intentar determinar cuál era el compartimiento responsable de este fenómeno, se observó un aumento en la adhesión a Fibronectina sólo en el compartimiento MEP. En cambio, el mismo tratamiento indujo un aumento significativo

de la capacidad adhesiva a Colágeno I en ambos compartimientos celulares, siendo más evidente en las células MEP.

Así, el tratamiento con ácido retinoico estaría modulando, *in vitro*, algunos mecanismos implicados en la diseminación metastásica, nuevamente en forma diferencial. Estos estudios fueron validados con un ensayo *in vivo* de metástasis espontáneas, en el cual las células LM38-LP fueron inoculadas en forma ortotópica en ratones BALB/c. Una vez que el tumor fue palpable los ratones recibieron un pellet con 10 mg de ATRA y a las 3 semanas fueron sacrificados para determinar el número de metástasis. De esta forma, demostramos que el tratamiento con ATRA reduce el número de nódulos espontáneos en los pulmones de los ratones frente a aquellos ratones controles a los que se les suministró un pellet vacío.

En resumen, podemos decir que la disminución de la diseminación metastásica de la línea celular LM38-LP en respuesta al tratamiento con ATRA puede ser explicada en parte por la inhibición de la capacidad invasiva, migratoria y el aumento en la adhesión a algunos componentes de la matriz extracelular. Estos efectos pueden ser adjudicados principalmente al componente MEP de la línea. Además, hay que considerar los efectos inhibitorios de la proliferación celular, incluyendo arresto, senescencia y apoptosis de las células principalmente en el componente celular LEP, que también son determinantes del desarrollo de las metástasis

Por otro lado, el análisis de los niveles de transcripción de genes implicados en la transición epitelio-mesenquimática en ambos compartimientos celulares de la línea LM38-LP demostró que el tratamiento con ATRA modularía a un conjunto de genes que conducen hacia un fenotipo menos agresivo, disminuyendo la capacidad de migración e invasión celular, e induciendo la diferenciación. Nuestro análisis en forma separada de las sub-poblaciones LEP y MEP ha sido un importante aporte para la comprensión de la regulación de la progresión tumoral por el ATRA, ya que demostró un perfil muy diferente de respuesta en ambas poblaciones. Este resultado sugiere fuertemente que la respuesta final de la línea hacia un fenotipo menos agresivo en respuesta a los retinoides depende por lo menos de la interacción de ambos compartimientos celulares.

La primera evidencia de la existencia de una población con capacidad progenitora surge de los experimentos de clonogenicidad, que nos permitieron detectar la existencia de un 4 % de células clonogénicas que resultaban resistentes al tratamiento con ATRA u otros retinoides. Otros estudios realizados en este trabajo revelaron la existencia de una sub-población de células con marcación positiva para algunos marcadores de células stem/progenitoras y capaces de formar mamosferas. Posteriormente, se confirmó la existencia de la población stem/progenitora de la línea al realizar una dilución clonal a partir de las células capaces de formar mamosferas y observar que una única célula es capaz de regenerar completamente la línea celular LM38-LP con sus dos componentes principales: islotes de LEP y MEP. Finalmente, la inoculación de células provenientes de mamosferas generó tumores con características histológicas similares a los tumores originados por la inoculación de la línea LM38-LP, con similar capacidad para generar metástasis espontáneas a distancia.

En conjunto, estos resultados nos permiten establecer la existencia de una población de células stem/progenitoras heterogéneas en cuanto a su respuesta al tratamiento con retinoides. Esto coincide con datos reportados por Gudas y Wagner[171], quienes estudiaron la capacidad de los retinoides para inducir diferenciación de células stem como posible herramienta terapéutica. La existencia de esta tercera población indiferenciada convierte a LM38-LP en un modelo muy interesante para el abordaje de nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en el control del nicho stem/progenitor, entidad que le confiere a los tumores alta resistencia a los tratamientos convencionales.

Para comprender más sobre la participación específica de cada unos de los principales RARs en la progresión tumoral mamaria, se han generado sub-líneas de LM38-LP que sobreexpresan o presentan silenciados estos receptores. Fue interesante observar que las diferentes sub-líneas no presentaban las mismas características morfológicas que la línea parental LM38-LP. Por lo contrario, todas las sub-líneas obtenidas, inclusive aquéllas transfectadas con los vectores vacíos, estaba constituidas por una población relativamente homogénea de células, pequeñas y ahusadas. Posiblemente este hecho se deba a que los diferentes componentes celulares de esta línea difieran en su eficiencia de transfección y en consecuencia, en su tolerancia a los agentes de

selección, por lo que la transfección estable nos seleccionaría una sub-población celular dentro de la línea LM38-LP con propiedades biológicas y morfológicas diferentes a la línea parental y con una mayor malignidad aparente, dado que tumores originados de estas sub-líneas presentan tamaños muy pequeños pero gran capacidad metastásica.

Los ensayos realizados con estas sub-líneas nos indican que la expresión de todas las isoformas de los receptores de ácido retinoico sería indispensable para responder al tratamiento con ATRA con respecto al crecimiento tumoral *in vivo*, la formación de metástasis a distancia y la secreción de proteasas. Dado que ya han sido reportados los efectos pro-apoptóticos y de diferenciación del receptor RARβ2[161], los resultados obtenidos con las sub-líneas transfectadas establemente parecen ser paradójicos, ya que según nuestros resultados la capacidad metastásica requeriría de la expresión de RARβ2. Sin embargo otros autores ya han demostrado que algunos receptores retinoideos pueden cumplir roles duales debido a las múltiples interacciones que presentan y vías que regulan, por lo que su expresión puede favorecer o disminuir el grado de malignidad de las células tumorales que lo expresan[172].

Como mencionamos antes, las líneas generadas por transfección estable sólo representan una sub-población de la línea celular LM38-LP. Estas sub-líneas modificadas genéticamente presentan una menor tasa de crecimiento *in vivo* respecto a la línea parental pero una gran capacidad metastásica, dado que a pesar del poco o nulo desarrollo del tumor primario, el número de metástasis generadas fue similar al desarrollado por la línea LM38-LP.

Esta observación abre una nueva línea de trabajo que nos permitirá comprender con más detalle la importancia de cada RAR sobre distintos parámetros asociados a la progresión maligna.

En conjunto nuestro trabajo sugiere que los resultados controversiales obtenidos a partir del uso de retinoides en la clínica, particularmente en cáncer de mama, podrían ser explicados en parte, por la respuesta diferencial de los principales componentes celulares que constituyen estos tumores.

En la Figura 1 se presenta un modelo hipotético de respuesta a los retinoides en la línea celular LM38-LP y sus principales componentes celulares.

Figura 1: El efecto final del tratamiento con ácido retinoico dependería de la sumatoria de respuestas obtenidas por el compartimiento LEP, que respondería a través de la activación de la vía clásica de los receptores RARs, y por el compartimiento MEP, que parecería responder través de vías alternativas, así como también por un grupo de células que se encuentra entre ambos compartimientos y son parcialmente resistentes.

Por otro lado, cabe destacar que la presencia de una posible población stem/progenitora parcialmente resistente al tratamiento, puede brindar otra explicación a la resistencia que suelen presentar los tumores triple negativos a los tratamientos convencionales.

Es conocido que las terapias con Acido Retinoico han tenido éxito en el tratamiento de algunas leucemias, pero ha tenido resultados controversiales en tumores sólidos, como lo es el cánce de mama. Sin embargo, durante el desarrollo de este plan de trabajo, hemos podido determinar que la terapia con retinoides, si bien reduce el fenotipo maligno del tumor, lo hace en forma diferencial en el componente LEP respecto del componente MEP. Además hemos podido observar que las células con caracteríastica stem/progenitoras presentes en el tumor LM38-LP, son parcialmente resistentes a esta monoterapia con retinoides. Este hecho nos hace hipotetizar nuevamente que una terapia combinada y especialmente dirigida sobre este componente celular, podría ser más exitosa aún, teniendo como estrategia primera, llevar a estas células a la diferenciación para hacerlas más sensible a los tratamientos quimioterápicos, y así obtener en conjunto una mejor respuesta sobre la inhibición de la progresión tumoral.

Este trabajo proyecta continuar con futuras investigaciones dirigidas al ensayo de nuevas herramientas terapéuticas basadas en la administración de los retinoides en forma conjunta con quimioterápicos convencionales y noveles, enfocadas en la inhibición de la progresión

maligna desde la disminución de subpoblaciones celulares con características de stem/progenitoras.

BIBLIOGRAFÍA UTILIZADA

BIBLIOGRAFÍA

1. Matos, E., Loria, D., y Zengarini, N., *Atlas de Mortalidad por cáncer*. Argentina 1997-2001, ed. M. E and L. D. Buenos Aires, Argentina. 2003

2. American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2008*. Atlanta, Georgia: American Cancer Society. 2008.

3. Bradley, C.J., Yabroff, K.R., et al., *Productivity costs of cancer mortality in the United States: 2000-2020*. J Natl Cancer Inst, 2008. 100(24): p. 1763-70.

4. Yabroff, K.R., Bradley, C.J., et al., *Estimates and projections of value of life lost from cancer deaths in the United States*. J Natl Cancer Inst, 2008. 100(24): p. 1755-62.

5. Yvonne, M., Coyle, M., *Lifestyle, Genes, and Cancer*. Verma (ed.), Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology, 2009. vol. 472: p. 25-56.

6. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Publishing Group, Inc. 2002.1995;77: 1345-64.

7. Kreeger, P.K., Lauffenburger, D.A., *Cancer systems biology: a network modeling perspective*. Carcinogenesis, 2010. 31(1): p. 2-8.

8. Chiang, A.C., Massagué, J., *Molecular basis of metastasis.* N Engl J Med., 2008. 25;359(26): p. 2814-23.

9. Cotran, R., Kumar, V., Robbins, *Pathologic Basis of Disease*. 6º Edición en español: Mc Graw-Hill Interamericana. 1999.

10. Charames, G.S., Bapat, B., *Genomic instability and cancer*. Curr Mol Med. 2003 Nov;3(7):589-96.

11. Hanahan, D., Weinberg, R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.

12. DeNardo, D.G., Andreu, P., Coussens, L.M., *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity*. Cancer Metastasis Rev., 2010. 29 (2): p. 309-316.

13. Grivennikov, S.I, Greten, F.R., Karin, M., *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. 140(6): p. 883-99.

14. Cheng, N., Chytil, A., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. 6(10): p. 1521-33.

15. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L., *Stromal fibroblast in cancer initiation and progression*. Nature, 2004. 432(7015): p. 332-7

16. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. J Exp Clin Cancer Res., 2011. 26;30:87.

17. Lowe, S.W., Cepero, E., Evan, G., *Intrinsic tumour suppression*. Nature, 2004 432(7015): p. 307-15.

18. Lanigan, F., Geraghty, J.G., Bracken, A.P., *Transcriptional regulation of cellular senescence*. , 2011. 30(26):2901-11.

19. Collado, M., Serrano, M., *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(1): p. 51-7.

20. Fehm, T., Mueller, V., Marches, R., et. al., *Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer*. APMIS, 2008. 116: p. 742–53.

21. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(11): p. 834-46.

22. Polyak, K., *p27 Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contract inhibition to cell cycle arrest*. Genes Dev., 1994. 8: p. 9-22.

23. Davies, M.A., Samuels, Y., *Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma.* Oncogene, 2010. 14;29(41): p. 5545-55.

24. Meyer, T., Hart, I.R., *Mechanisms of tumour metastasis*. Eur J Cancer, 1998. 34(2):214-21.

25. Hanahan, D., Weinberg, R.A., *The hallmarks of cancer*. Cell. 2000. 100(1): p. 57-70.

26. Wirtz, D., Konstantopoulos, K., Searson, P.C., *The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis*. Nat Rev Cancer, 2011. 24;11(7): p. 512-22.

27. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. 194(4260): p. 23-8.

28. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 2009 Apr;9(4): p. 302-12.

29. Weiss, L., *Metastatic inefficiency. Adv Cancer Res,* 1990. 54: 159-211.

30. Baeriswyl, V., Christofori, G., *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol., 2009.19(5): p. 329-37.

31. Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E, et. al., *Molecular Biology of Cancer. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery.* Sixth Edition, Volume 5: Chemotherapeutic Agents.

32. Shing, Y., Folkman, J., et al., *Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor*. Science, 1984. 223(4642): p. 1296-9.

33. Fidler, I.J., *Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis*. Cancer Res, 1978. 38(9): p. 2651-60.

34. Nicolson, G.L., *Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites*. Biochim Biophys Acta, 1988. 948(2): p. 175-224.

35. *Stephen Paget's paper reproduced from The Lancet*, 1889. Cancer and Metastasis Reviews, 1889. 8(2): p. 98-101.

36. Ribatti, D., Mangialardi, G., and Vacca, A., *Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination*. Clinical and Experimental Medicine. 6(4): p. 145-149.

37. Psaila, B.; Lyden, D. *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. Nat. Rev. Cancer, 2009. 9(4): p. 285-293.

38. Ewing, J. *Neoplastic diseases*; 6th ed.; W. B. Saunders Co: Philadelphia, 1928.

39. Ossowski, L.; Aguirre-Ghiso, J. A., *Dormancy of metastatic melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res., 2010. 23(1): p. 41-56.

40. Smith, A., *A glossary for stem-cell biology*. Nature, 2006. 441(7097): p. 1060.

41. Woodward, W.A., Chen, M.S, et al., *On mammary stem cells*. J Cell Sci., 2005. 118(16): p. 3585-94.

42. Oxford, K.W., Scadden, D.T., *Deconstructing stem cell self renewal: genetic insights into cell-cycle regulation*. Nat Rev Genet., 2008. 9(2): p. 115-28.

43. May, C.D., Sphyris, N., Evans, K.W., et. al., *Epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression*. Breast Cancer Research, 2011. p. 13:202.

44. Heppner, G.H. y Miller, B.E., *Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences*. Cancer Metastasis Rev, 1983. 2(1): p. 5-23.

45. McDermott, S.P., Wicha, M.S., *Targeting breast cancer stem cells*. Mol Oncol., 2010. 4: p. 404-419.

46. Reya, T., Morrison, S.J., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. 414(6859): p. 105-11.

47. Goldthwaite, C.A., *Are Stem Cells Involved in Cancer?* Regenerative Medicine. Department of Health and Human Services. August 2006.Chapter 9.

48. Li, L., Neaves, W.B., *Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters*. Cancer Res., 2006. 66(9): p. 4553-7.

49. Dave, B., Chang, J., *Treatment resistance in stem cells and breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia., 2009. 14(1): p. 79-82.

50. Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., et. al., *The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. 133: p. 704-715.

51. Morel, A.P., Lievre, M., Thomas, C., et. al., *Generation of breast cancer stem cells through epithelial–mesenchymal transition*. PLoS One, 2008. 3:e2888.

52. Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., Tsichlis, P.N., Struhl, K., *Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission*. Cancer Res., 2009. 69: p.7507-7511.

53. King, B.L. y Love, S.M., *The intraductal approach to the breast: raison d'etre*. Breast Cancer Res, 2006. 8(2): p. 206.

54. Sternlicht, M.D., *Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis*. Breast Cancer Res, 2006. 8(1): p. 201.

55. Adriance, M.C., Inman, J.L., et al., *Myoepithelial cells: good fences make good neighbors*. Breast Cancer Res, 2005. 7(5): p. 190-7.

56. Bumaschny, V., Urtreger, A., Diament, M., et al., *Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model*. Breast Cancer Res., 2004. 6(2):R116-29.

57. Watson, C.J., Khaled, W.T., *Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment*. Development., 2008. 135(6): p. 995-1003.

58. Dimri, G., Band, H., y Band, V., *Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models*. Breast Cancer Res, 2005. 7(4): p. 171-9.

59. Evans, D., Burnell, L., et al., *Perception of risk in women with a family history of breast cancer*. Br J Cancer, 1993. 67: p. 612-614.

60. Matos, E., Loria, D., et al., *Tasas de mortalidad para el período 1989-1992. Atlas de mortalidad por cáncer*. Buenos Aires, Argentina. 1997.

61. Viniegra, M., Paolino, M., Arrossi, S., *Cáncer de mama en Argentina, organización cobertura y calidad de las acciones de prevención y control*. Informe final julio 2010. OPS/OMS en Argentina.

62. Polyak, K., *Molecular alterations in ductal carcinoma in situ of the breast*. Curr Opin Oncol, 2002. 14(1): p. 92-6.

63. Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., et. al., *Molecular portraits of human breast tumors*. Nature, 2000. 406: p. 747-752.

64. Foekens, J.A., Atkins, D., Zhang, Y., et. al., *Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer*. J Clin Oncol., 2006. 24: p.1665-1671.

65. Christos Sotiriou, M.D., Phil D., Lajos Pusztai, M.D., *Gene-Expression Signatures in Breast Cancer*. N Engl J Med., 2009. 360: p. 790-800.

66. Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., et. al. *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res., 2004. 10: p. 5367-5374.

67. Elsawaf, Z., Sinn, H.P., *Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations*. Breast Care, 2011. 6: p. 273–278.

68. Karn, T., Pusztai, L., Holtrich, U., et. al., *Homogeneous Datasets of Triple Negative Breast Cancers Enable the Identification of Novel Prognostic and Predictive Signatures*. PLoS ONE, 2011. 6(12): e28403.

69. Rakha, E., Elsheikh, S., Aleskandarany, M., et. al., *Triple-negative breast cancer: Distinguishing between basal and nonbasal subtypes*. Clin Cancer Res., 2009. 15: p. 2302–2310.

70. Blows, F.M., Driver, K.E., Schmidt, M.K., et. al., *Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies*. PLoS Med., 2010. 7: e1000279.

71. Dey, D., Saxena, M., Paranjape, A., et. al., *Phenotypic and Functional Characterization of Human Mammary Stem/Progenitor Cells in Long Term Culture*. PLoS One, 2009. 4(4): e5329.

72. Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. 1(5): p. 555-67.

73. Wright, M.H., Calcagno, A.A., Salcido, C.D., et. al., *Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics*. Breast Cancer Res., 2008. 10(1): R10.

74. Shipitsin, M., Polyak, K., *The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance*. Lab Invest., 2008. 88(5):459-63.

75. Van Dyke, T., and Jacks, T., *Cancer modeling in the modern era: progress and challenges*. Cell, 2002. 108: p. 135-44.

76. Nguyen, M., Lee, M.C., Wang, J.L., et al., *The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype*. Oncogene, 2000. 19(31): p. 3449-59.

77. Jones, C., Foschini, M.P., Chaggar, R., et al., *Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast*. Lab Invest., 2000. 80(6): p. 831-6.

78. Polyak, K., Hu, M., *Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor pregression?*. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 2005. 10(3): p. 231-47.

79. Gudjonsson, T., Adriance, M.C., Sternlicht, M.D., et al., *Myoepithelial cells: Their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005. 10(3):261-72.

80. Vargo-Gogola, T., Rosen, J.M., *Modelling breast cancer: one size does not fit all*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(9): p. 659-72.

81. Theodosiou, M., Laudet, V., Schubert, M., *From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway.* Cell Mol Life Sci., 2010. 67(9): p. 1423-45.

82. Mongan, N.P., Gudas, L.J., *Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment*. Differentiation, 2007. 75(9): p. 853-70.

83. Somenzi, G., Sala, G., Rossetti, S., et al., *Disruption of retinoic acid receptor alpha reveals the growth promoter face of retinoic acid*. PLoS One, 2007. 2(9):e836.

84. Napoli, J.L., *Biochemical Pathways of Retinoid Transport, Metabolism, and Signal Transduction*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1996. 80(3): p. S52–S62.

85. Bastien, J., Rochette-Egly, C., *Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes.* Gene, 2004. 328: p. 1-16.

86. Lonard, D.M., O'Malley, B.W., *The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators*. Cell, 2006. 125: p. 411–414.

87. Brand, C., Segard, P., Plouvier, P., et al., *Selective alteration of gene expression in response to natural and synthetic retinoids*. BMC. Pharmacol., 2002. 2, 13.

88. Lefebvre, P., Martin, P.J., Flajollet, S., et. al., *Transcriptional Activities of Retinoic Acid Receptors*. Vitamins and Hormones, 2005. 70: p. 199-264.

89. Mark, M., Ghyselinck , N.B., Chambon, P., *Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol., 2006. 46: p. 451-80.

90. Chen, N., Onisko, B., Napoli, J.L., *The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation*. J Biol Chem., 2008. 283(30): p. 20841-7.

91. Laserna, E.J., Valero, M.L., Sanz, L., et. al., *Proteomic analysis of phosphorylated nuclear proteins underscores novel roles for rapid actions of retinoic acid in the regulation of mRNA splicing and translation*. Mol Endocrinol. 2009. 23(11): p.1799-814.

92. Seewaldt, V.L., Kim, J.H., Parker, M.B., et. al., *Dysregulated expression of cyclin D1 in normal human mammary epithelial cells inhibits alltrans-retinoic acid-mediated G0/G1-phase arrest and differentiation in vitro*. Exp Cell Res, 1999b. 249: p. 70–85.

93. Zancai, P., Dal Col, J., Piccinin, S., et. al., *Retinoic acid stabilizes p27Kip1 in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45Skp2 and Cks1 proteins*. Oncogene, 2005. 24: p. 2483–2494.

94. Lasnitzki, I., *The influence of hypervitaminosis of the effect of 20-methylcholanthrene on mouse prostate glands growth in vitro*. Br J Cancer, 1955. 9: p. 434–441.

95. Haferlach, T., *Molecular genetics pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: p. 400-11.

96. Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., et al., *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1988. 72: p. 567–572.

97. Borrow, J., Goddard, A.D., et al., *Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17*. Science, 1990. 249(4976): p. 1577-80.

98. de Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M., et. al., *The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus*. Nature, 1990. 347(6293): p. 558-61.

99. Saeed, S., Logie, C., Stunnenberg, H.G, AMartens, J.H., *Genome-wide functions of PML–RARα in acute promyelocytic leukaemia*. British Journal of Cancer, 2011. 104: p. 554–558.

100. Altucci, L., Leibowitz, M.D., Ogilvie, K.M., et al., *RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease.* Nat Rev Drug Discov., 2007. 6(10): p. 793-810.

101. Farias, E.F., Arapshian, A., Bleiweiss, I.J., et al., *Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells*. Cell Growth Differ., 2002. 13(8): p. 335-41.

102. Sun, S.Y., Lotan, R., *Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention.* Crit Rev Oncol Hematol., 2002. 41(1): p. 41-55.

103. Castillo, L., Milano, G., Santini, J., et al., *Analysis of retinoic acid receptor beta expression in normal and malignant laryngeal mucosa by a sensitive and routine applicable reverse transcription-polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay method*. Clin Cancer Res., 1997. 3(11): p. 2137-42.

104. Picard, E., Seguin, C., Monhoven, N., et al., *Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer.* J Natl Cancer Inst., 1999. 91(12): p. 1059-66.

105. Kupumbati, T.S., Cattoretti, G., Marzan, C., et. al., *Dominant negative retinoic acid receptor initiates tumor formation in mice*. Mol Cancer, 2006. 24;5: p. 12.

106. Zanardi, S., Serrano, D., Argusti, A., et. al., *Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention*. Endocr Relat Cancer, 2006. 13(1): p. 51-68.

107. Camerini, T., Mariani, L., De Palo, G., et al., *Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer*. J Clin Oncol. 2001 Mar 15;19(6):1664-70.

108. Recchia, F., Sica, G., De Filippis, S., et al., *Cisplatin, vindesine, mitomycin-C and 13-cis retinoic acid in the treatment of advanced non small cell lung cancer. A phase II pilot study*. Anticancer Res., 2000. 20(3B): p. 1985-90.

109. Simeone, A.M., Tari, A.M., *How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis.* Cell Mol Life Sci., 2004. 61(12): p. 1475-84.

110. Brtko, J., *Role of retinoids and their cognate nuclear receptors in breast cancer chemoprevention.* Cent Eur J Public Health., 2007. 15(1): p. 3-6.

111. Kuppumbatti, Y.S., Bleiweiss, I.J., Mandeli, J.P., et al., *Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer*. J Natl Cancer Inst., 2000. 92(6): p. 475-80.

112. Arapshian, A., Bertran, S., Kuppumbatti, Y.S., et al., *Epigenetic CRBP downregulation appears to be an evolutionarily conserved (human and mouse) and oncogene-specific phenomenon in breast cancer*. Mol Cancer, 2004. 27;3:13.

113. Farias, E.F., Ong, D.E., Ghyselinck, N.B., et al., *Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity*. J Natl Cancer Inst., 2005. 97(1): p. 21-9.

114. Lu, Y., Bertran, S., Samuels, T.A., Mira-y-Lopez, R., Farias, E.F., *Mechanism of inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 induced mammary oncogenesis by RARalpha agonist AM580*. Oncogene, 2010. 29(25): p. 3665-76.

115. Zelent, A., *PCR cloning of N-terminal RAR isoforms and APL-associated PLZF-RAR alpha fusion proteins.* *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.),1998. 89(): p. 307-32.

116. Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., et. al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev., 2003. 17(10): p. 1253-70.

117. Berbis P. Retinoids: mechanisms of action. Ann Dermatol Venereol., 2010. 137 Suppl 3:S97-103.

118. Todaro, L.B., Veloso, M.J., Campodónico, P.B., et al., *A clinically relevant bi-cellular murine mammary tumor model as a useful tool for evaluating the effect of retinoic acid signaling on tumor progression.* Breast Cancer. 2012 Feb 29. [Epub ahead of print].

119. Walkley, C.R., Purton, L.E., Snelling, H.J., et.al., *Identification of the molecular requirements for an RAR alpha-mediated cell cycle arrest during granulocytic differentiation*. Blood, 2004. 103(4): p. 1286-95.

120. Lotan, R., *Retinoids and apoptosis: implications for cancer chemoprevention and therapy.* J Natl Cancer Inst. 1995 Nov 15;87(22):1655-7.

121. Spinella, M.J., Kerley, J.S., White, K.A, Curtin, J.C., *Retinoid Target Gene Activation during Induced Tumor Cell Differentiation: Human Embryonal Carcinoma as a Model*. J. Nutr. 2003. 133:273S-276S.

122. Flores-Reséndiz, D.; Castellanos -Juárez, E., Benítez-Bribiesca, L., *Las proteasas en la progresión neoplásica / Proteases in cancer progression*. Gac. méd. 2009.;145(2): p. 131-142.

123. Carlson, B.M, *Embriología humana y biología del desarrollo*. 4ª Edición. Elsevier, 2009. p. 109-118.

124. Benaud, C., Gentil, B.J., Assard, N., et. al., *AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture*. J Cell Biol, 2004. 164: p. 133–144.

125. Nishida, N., Mimori, K., Yokobori, T., et. al., *FOXC2 is a novel prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma*. Ann Surg Oncol., 2011. 18(2): p. 535-42.

126. Ueno, K., Hazama, S., Mitomori, S., et. al., *Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells*. Br J Cancer, 2009. 101(8): p. 1374-81.

127. Taylor, C.J., Qiao, J., Colon, N.C., et. al., *Integrin-linked kinase regulates phosphatase and tensin homologue activity to promote tumorigenesis in neuroblastoma cells.* Surgery, 2011. 150(2): p. 162-8.

128. Gil, D., Ciołczyk-Wierzbicka, D., Dulińska-Litewka, J., et. al., *The mechanism of contribution of integrin linked kinase (ILK) to epithelial-mesenchymal transition (EMT).* Adv Enzyme Regul., 2011. 51(1): p. 195-207.

129. Qin, L., Chen, X., Wu, Y., et. al., *Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin α_5 expression to promote breast cancer cell adhesion and migration*. Cancer Res., 2011. 71(5): p. 1742-51.

130. Sil, H., Sen, T., Chatterjee, A., *Fibronectin-integrin (alpha5beta1) modulates migration and invasion of murine melanoma cell line B16F10 by involving MMP-9*. Oncol Res., 2011. 19(7): p. 335-48.

131. Sethi, N., Dai, X., Winter, C.G., Kang, Y., *Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells*. Cancer Cell, 2011. 19(2): p. 192-205.

132. Shimizu, M., Cohen, B., Goldvasser, P., et. al., *Plasminogen activator uPA is a direct transcriptional target of the JAG1-Notch receptor signaling pathway in breast cancer*. Cancer Res., 2011. 71(1): p. 277-86.

133. Wagh, P.K., Gray, J.K., Zinser, G.M., et. al., *β-Catenin is required for Ron receptor-induced mammary tumorigenesis*. Oncogene, 2011. 30(34): p. 3694-704.

134. Wang, Z., Li, Y., Sarkar, F.H., *Notch signaling proteins: legitimate targets for cancer therapy*. Curr Protein Pept Sci., 2010. 11(6): p. 398-408.

135. Golubovskaya, V.M., Cance, W., *Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer*. Front Biosci., 2010. 15: p. 901-12.

136. Snyder, M., Huang, X.Y., Zhang, J.J., *Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3) Directly Regulates Cytokine-induced Fascin Expression and Is Required for Breast Cancer Cell Migration*. J Biol Chem., 2011. 286(45): p. 38886-93.

137. Hart, J.R., Liao, L., Yates, J.R. 3rd, Vogt, P.K., *Essential role of Stat3 in PI3K-induced oncogenic transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2011. 108(32): p. 13247-52.

138. Maia, C.J., Socorro, S., Schmitt, F., Santos, C.R., *STEAP1 is over-expressed in breast cancer and down-regulated by 17beta-estradiol in MCF-7 cells and in the rat mammary gland*. Endocrine, 2008. 34(1-3): p. 108-16.

139. Oh-hashi, K., Imai, K., Koga, H., et. al., *Knockdown of transmembrane protein 132A by RNA interference facilitates serum starvation-induced cell death in Neuro2a cells*. Mol Cell Biochem., 2010. 342(1-2): p. 117-23.

140. Yu, L., Li, H.Z., Lu, S.M., et. al., *Down-regulation of TWIST decreases migration and invasion of laryngeal carcinoma Hep-2 cells by regulating the E-cadherin, N-cadherin expression*. J Cancer Res Clin Oncol., 2011. 137(10): p. 1487-93.

141. Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., et. al., *Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis*. Cancer Res., 2011. 71(1): p. 245-54.

142. Du, W.W., Yang, B.B., Shatseva, T.A., et. al., *Versican G3 promotes mouse mammary tumor cell growth, migration, and metastasis by influencing EGF receptor signaling*. PLoS One, 2010. 5(11).

143. Helfand, B.T., Mendez, M.G., Murthy, S.N., et al., *Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia*. Mol Biol Cell, 2011. 22(8): p. 1274-89.

144. Dwyer, M.A., Joseph, J.D., Wade, H.E., et. al., *WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration*. Cancer Res., 2010. 70(22): p. 9298-308.

145. Toyama, T., Lee, H.C., Koga, H., et. al., *Noncanonical Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration*. Mol Cancer Res., 2010. 8(2): p. 254-65.

146. Uysal-Onganer, P., Kawano, Y., Caro, M., et. al., *Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells*. Mol Cancer, 2010. 10;9:55.

147. Ren, D., Minami, Y., Nishita, M., *Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition*. Genes Cells, 2011. 16(3): p. 304-15.

148. Kamino, M., Kishida, M., Kibe, T., *Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2*. Cancer Sci. 2011 Mar;102(3):540-8.

149. Benkoussa,M., Brand, C., Delmotte, M.H., et. al., *Retinoic Acid Receptors Inhibit AP1 Activation by Regulating Extracellular Signal-Regulated Kinase and CBP Recruitment to an AP1-Responsive Promoter*. American Society for Microbiology.

150. Gerdes, M.J., Myakishev, M., Frost, N.A., *Activator protein-1 activity regulates epithelial tumor cell identity*. Cancer Res., 2006. 66(15): p. 7578-88.

151. Savagner P. *The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon*. Ann Oncol., 2010. 7:vii89-92.

152. Bushue, N., Wan, Y.Y., *Retinoid Pathway and Cancer Therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev., 2010. 62(13): p. 1285–1298.

153. Corlazzoli, F., Rossetti, S., Bistulfi, G., et al., *Derangement of a factor upstream of RARalpha triggers the repression of a pleiotropic epigenetic network*. PLoS One, 2009. 4(1): e4305.

154. Noy, N., *Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis*. Annu Rev Nutr., 2010. 21(30): p. 201-17.

155. Singh, A.T., Evens, A.M., Anderson, R.J., et al., *All trans retinoic acid nanodisks enhance retinoic acid receptor mediated apoptosis and cell cycle arrest in mantle cell lymphoma*. Br J Haematol., 2010. 150(2): p. 158-69.

156. Ying, M., Wang, S., Sang, Y., et al., *Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition*. Oncogene, 2011.

157. Lu, M., Mira-y-Lopez, R., Nakajo, S., et. al., *Expression of estrogen receptor alpha, retinoic acid receptor alpha and cellular retinoic acid binding protein II genes is coordinately regulated in human breast cancer cells*. Oncogene, 2005. 24(27): p. 4362-4369.

158. Fitzgerald, P., Teng, M., Chandraratna, R.A., et. al., *Retinoic acid receptor alpha expression correlates with retinoid-induced growth inhibition of human breast cancer cells regardless of estrogen receptor status*. Cancer Res, 1997. 57(13): p. 2642-2650.

159. Chen, Y., Dokmanovic, M., Stein, W.D., et al., *Agonist and antagonist of retinoic acid receptors cause similar changes in gene expression and induce senescence-like growth arrest in MCF-7 breast carcinoma cells*. Cancer Res., 2006. 66(17): p. 8749-61.

160. Donato, L.J., Noy, N., *Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling*. Cancer Res., 2005. 65(18): p. 8193-9.

161. Liu, Y., Lee, M.O., Wang, H.G., et. al., *Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells*. Mol Cell Biol., 1996. 16(3): p. 1138-49.

162. Debnath, J., Brugge, J.S., *Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(9): p. 675-88.

163. Rohrschneider, M., Scheuermann, G., Hoehme, S., Drasdo, D., *Shape characterization of extracted and simulated tumor samples using topological and geometric measures*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc., 2007. 2007: p. 6272-8.

164. de Thé, H., Chen, Z., *Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(11): p. 775-83.

165. Childs, A.J., Cowan, G., Kinnell, H.L., et al., *Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad*. PLoS One, 2011. 6(6):e20249.

166. Hiratsuka, S.; Nakamura, K.; Iwai, S.; et al. *MMP-9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis*. Cancer Cell, 2002. 2 (4): p. 289-300.

167. DiSepio, D., Sutter, M., Johnson, A.T., et al., *Identification of the AP1-antagonism domain of retinoic acid receptors*. Mol Cell Biol Res Commun., 1999. 1(1): p 7-13.

168. Lackey, D.E., Hoag, K.A., *Vitamin A upregulates matrix metalloproteinase-9 activity by murine myeloid dendritic cells through a nonclassical transcriptional mechanism*. J Nutr., 2010. 140(8): p. 1502-8.

169 Wu, J.J., Cantor, A., Moscinski, L.C., *beta2 Integrins are characteristically absent in acute promyelocytic leukemia and rapidly upregulated in vivo upon differentiation with all-trans retinoic acid*. Leuk Res., 2007. 31(1): p. 49-57.

170 Massimi, M., Devirgiliis, L.C., *Adhesion to the extracellular matrix is positively regulated by retinoic acid in HepG2 cells*. Liver Int., 2007. 27(1): p. 128-36.

171 Gudas, L.J., Wagner, J.A. *Retinoids regulate stem cell differentiation*. J Cell Physiol. 2011 Feb;226(2):322-30.

172 Pappas, J.J., Toulouse, A., Basik, M., et. al., Knockdown of RARb2 identifies a dual role in cancer. Genes Chromosomes Cancer, 2011. 50(9): p. 700-14.