

Tesis Doctoral

# Terapia endócrina y enriquecimiento en células con propiedades "stem" de cáncer de mama: implicancias para la respuesta a la terapia

Raffo, Diego Alejandro

2013-12-13

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

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

Cita tipo APA:

Raffo, Diego Alejandro. (2013-12-13). Terapia endócrina y enriquecimiento en células con propiedades "stem" de cáncer de mama: implicancias para la respuesta a la terapia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Raffo, Diego Alejandro. "Terapia endócrina y enriquecimiento en células con propiedades "stem" de cáncer de mama: implicancias para la respuesta a la terapia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-12-13.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Terapia endócrina y enriquecimiento en células con  
propiedades “stem” de cáncer de mama:  
implicancias para la respuesta a la terapia.

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

**Lic. Raffo Diego Alejandro**

**Directora de Tesis: Dra. Marina Simian  
Consejera de Estudios: Dra. Anabella Srebrow**

**Lugar de Trabajo: Departamento de Biología Celular  
Área de Investigaciones  
Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”**

**Buenos Aires, Octubre de 2013**

# Terapia endócrina y enriquecimiento en células con propiedades “stem” de cáncer de mama: implicancias para la respuesta a la terapia.

El 75% de los tumores de mama son positivos para receptores de estrógeno y progesterona y el tamoxifeno es la terapia más utilizada. Se propone que las células stem podrían ser iniciadoras de tumores y que tendrían una menor susceptibilidad a la quimio y radioterapia. El objetivo fue estudiar el efecto del tamoxifeno y de los elementos del microambiente tumoral sobre las poblaciones con propiedades stem y los mecanismos involucrados utilizando las líneas LMO5-E murina y MCF-7 humana *in vitro* y el tumor M05 *in vivo*. Se realizaron ensayos de mamoesferas, de actividad de la enzima ALDH1 y clonogénicos para estudiar a las células con propiedades stem y también se evaluó el crecimiento de los tumores *in vivo* y de las líneas *in vitro* y su expresión génica y proteica. Se observó que el tamoxifeno llevó a un enriquecimiento de células con propiedades stem *in vivo* e *in vitro* y que estos cambios perduraron luego de finalizado el tratamiento. Los elementos del microambiente tumoral redujeron la proporción de células con estas propiedades probablemente induciendo su diferenciación. De los resultados podemos concluir que el tamoxifeno podría llevar a un enriquecimiento de células con propiedades stem el cual podría ser responsable de las recurrencias observadas luego de la finalización del tratamiento apoyando los estudios que indican que prolongar el tratamiento a 10 años es más efectivo.

**Palabras clave:** Cáncer de Mama, Terapia Endócrina, Resistencia al Tamoxifeno, Células con Propiedades Stem y Microambiente Tumoral.

# Endocrine therapy and enrichment in cells with “stem” properties in breast cancer: Implications in therapy response

Seventy-five percent of breast tumors are positive for estrogen and progesterone receptors and tamoxifen is the therapy of choice. It has been proposed that stem cells could be tumor initiating cells and are more resistant to radio and chemotherapy. The aim of this work was to study the effect of tamoxifen and tumor microenvironmental factors on the proportion of cells with stem cells properties, and the mechanisms involved. To do so we used the LM05-E murine cell line and MCF-7 human cell line *in vitro* and the M05 tumor *in vivo*. Mammospheres, ALDH1 and clonogenic assays were performed in order to study cells with stem cell properties. In addition, tumor growth, cell line proliferation and genes and protein expression were studied. Tamoxifen led to an enrichment in cells with stem cell properties both *in vivo* and *in vitro* and this enrichment was maintained even after treatment was removed. Microenvironmental elements led to a reduction of cells with stem cells properties, probably due to an induction of differentiation of these cells. From these results we can conclude that endocrine therapy could lead to an enrichment of cells with stem cells properties that would be responsible for late recurrences observed after treatment interruption, supporting studies that indicate that ten-year treatment with tamoxifen is a better clinical alternative.

**Key words:** Breast Cancer, Endocrine Therapy, Tamoxifen Resistance, Cell with stem cell properties, and Tumor Microenvironment.

## **Abreviaturas:**

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

ER: Receptor de Estrógenos

PR: Receptor de progesterona

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

FN: Fibronectina

LN: Laminina

AKT: Rac-Alfa Serina Treonina proteína quinasa

PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MEK: Quinasa reguladora de señales extracelulares de proteínas quinasas activadas por mitógenos

MC: Medio condicionado de fibroblastos tumorales

Tam: Tamoxifeno

HD: Hormono dependiente

HI: Hormono independiente

E-CAD: E-cadherina

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>Pag. 2</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>Pag. 7</b>
<b>Introducción al cáncer en general</b> .....	<b>Pag. 8</b>
<b>Glándula Mamaria y Cáncer de Mama</b> .....	<b>Pag. 8</b>
<b>Clasificación de los tumores de Mama</b> .....	<b>Pag. 9</b>
<b>Tratamientos Actuales</b> .....	<b>Pag. 12</b>
<b>Receptor de estrógenos</b> .....	<b>Pag. 15</b>
<b>Vías de señalización de MAPK/ERK y PI3K/AKT</b> .....	<b>Pag. 19</b>
<b>Concepto de microambiente tumoral</b> .....	<b>Pag. 21</b>
<b>Stem cells y cáncer</b> .....	<b>Pag. 23</b>
<b>Células stem en cáncer de mama</b> .....	<b>Pag. 28</b>
<b>Marcadores para el estudio de células con propiedades "stem"</b> .....	<b>Pag. 28</b>
<b>Células Stem y resistencia a terapias</b> .....	<b>Pag. 31</b>
<b>Utilización de líneas celulares y cultivos primarios en investigación</b> ---	<b>Pag. 32</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>Pag. 34</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>Pag. 37</b>
<b>Hormonas</b> .....	<b>Pag. 38</b>
<b>Medio de Cultivo</b> .....	<b>Pag. 38</b>
<b>Suero Fetal Bovino</b> .....	<b>Pag. 38</b>
<b>Ensayos de Mamoasferas</b> .....	<b>Pag. 39</b>
<b>Citometría de Flujo</b> .....	<b>Pag. 39</b>
<b>Estudio de la Población ALDH+</b> .....	<b>Pag. 40</b>
<b>Experimentos <i>in vivo</i> con el modelo M05</b> .....	<b>Pag. 40</b>
<b>Inmunofluorescencias</b> .....	<b>Pag. 41</b>
<b>Extracción de Proteínas</b> .....	<b>Pag. 41</b>
<b>Western Blot</b> .....	<b>Pag. 42</b>
<b>Anticuerpos Primarios y Anticuerpos Secundarios</b> .....	<b>Pag. 43</b>
<b>RT-PCR</b> .....	<b>Pag. 43</b>

<b>Extracción de medio condicionado de Fibroblastos Tumorales --</b>	<b>Pag. 43</b>
<b>Ensayo de Sensibilidad al tamoxifeno -----</b>	<b>Pag. 44</b>
<b>Ensayo de proliferación por cristal violeta -----</b>	<b>Pag. 44</b>
<b>Ensayos Clonogénicos -----</b>	<b>Pag. 45</b>
<b>Inhibidores farmacológicos -----</b>	<b>Pag. 45</b>
<b>Estadística -----</b>	<b>Pag. 45</b>
<b>RESULTADOS -----</b>	<b>Pag. 46</b>
<b>Efectos del tamoxifeno sobre el porcentaje de células con propiedades stem en el modelo tumoral M05 -----</b>	<b>Pag. 47</b>
<b>Cambios en el perfil de marcadores CD24/CD29 de tumores M05 durante y post tratamiento con tamoxifeno de los ratones portadores -----</b>	<b>Pag. 50</b>
<b>Impacto del 4-OH-tamoxifeno sobre la proliferación de línea celular LM05-E y MCF-7 y sobre la capacidad de formar mamoesferas de las mismas ---</b>	<b>Pag. 51</b>
<b>Estudio de la expresión de genes asociados al mantenimiento de células stem-----</b>	<b>Pag. 54</b>
<b>Estudio de la expresión diferencial de proteínas en mamoesferas del modelo MCF-7 con respecto a la línea celular completa -----</b>	<b>Pag. 55</b>
<b>Efecto de los elementos del microambiente tumoral sobre la proporción de células con propiedades stem -----</b>	<b>Pag. 56</b>
<b>Estudio de vías de señalización involucradas en el efecto generado por elementos del microambiente tumoral -----</b>	<b>Pag. 58</b>
<b>Estudio de los cambios en la capacidad clonogénica generados por lo elementos del microambiente tumoral -----</b>	<b>Pag. 59</b>
<b>Estudio de los efectos generados en las células con propiedades stem como consecuencia del tratamiento con elementos del microambiente tumoral</b>	<b>Pag. 61</b>
<b>DISCUSION -----</b>	<b>Pag. 63</b>
<b>CONCLUSION -----</b>	<b>Pag. 71</b>
<b>BIBLIOGRAFIA -----</b>	<b>Pag. 72</b>

# Introducción

## **Introducción al cáncer en general:**

En todo tejido existe un control de la división de sus células que impide, en todo momento, un crecimiento exacerbado de alguno de sus componentes celulares de modo de mantener el equilibrio y por lo tanto la función del mismo.

Durante el desarrollo de un tumor, uno o algunos de los componentes celulares de un tejido empiezan a crecer descontroladamente como consecuencia de la acumulación de diferentes mutaciones que favorecen este proceso. Estas mutaciones suelen afectar principalmente la comunicación de la célula con su entorno así como las vías de señalización propias, ignorando las señales de muerte resultando en una proliferación sin control. Este crecimiento descontrolado de las células lleva a la formación de tumores o nódulos.

Estos tumores pueden adquirir la capacidad de invadir órganos vecinos, lo que se llama infiltración, o llegar a órganos distantes, proceso conocido como metástasis. Un tumor se define como maligno cuando tiene capacidad de invadir.

## **Glándula Mamaria y Cáncer de Mama:**

La glándula mamaria está formada por una red compleja de ductos compuestos por una capa interna de origen epitelial rodeada por tejido mioepitelial, y más externamente por la membrana basal y un estroma complejo. Esta glándula está conformada por un sistema rudimentario al momento del nacimiento, que se desarrolla morfológica y funcionalmente hasta alcanzar su grado máximo de diferenciación en el embarazo y la lactancia. Luego del embarazo sufre un proceso de involución en el cual hay apoptosis de gran parte de las células epiteliales disminuyendo así las unidades funcionales, siendo estas reemplazadas por el estroma mamario. Ante un nuevo

embarazo hay un nuevo desarrollo de las unidades funcionales seguido por una nueva involución [1].

En el desarrollo de un tumor de mama, se suceden una serie de mutaciones que llevan al crecimiento descontrolado de células que componen este órgano. Los tumores suelen mantener algunas de las características iniciales del tejido del que provienen, aunque, a medida que evolucionan se suelen volver menos diferenciados y más agresivos. Algunos de los factores que se estudian cuando se detecta un tumor son por ejemplo la presencia de receptores de estrógeno, receptores de progesterona, niveles del coactivador AIB1 y niveles del receptor HER2/neu entre otros [2]. Con esta información se define el pronóstico y el mejor tratamiento para cada caso en particular. En la siguiente sección se menciona la clasificación actual de los tumores de mama según criterios como ubicación, tamaño, diseminación, etc.

### **Clasificación de los tumores de Mama:**

La mayoría de los tumores que se producen en la mama son benignos, no cancerosos, y son debidos a formaciones fibroquísticas. Dentro de los tumores malignos, existen varios tipos en función del lugar de la mama donde se produzca el crecimiento anormal de las células y según su estadio. Los tumores pueden ser localizados o haberse extendido a través de los vasos sanguíneos o mediante el sistema linfático y haber dado lugar a metástasis, es decir a un cáncer en un órgano distante al originario. De todos los casos de cáncer de mama, sólo el 7-10% de ellos presenta metástasis de inicio [3]. De acuerdo a la organización mundial de la salud, los carcinomas mamarios se clasifican en:

#### **1) No invasor:**

a) Carcinoma intraductal: se origina en las células de las paredes de los conductos

mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis. Por este motivo esta enfermedad 'pre maligna' puede extirparse fácilmente. La tasa de curación ronda el 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.

b) Carcinoma papilar intraductal: estos carcinomas intraductales tienen un patrón predominantemente papilar.

c) Carcinoma lobular in situ: se origina en los lóbulos y, aunque no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que una mujer pueda desarrollar un tumor en el futuro. Se suele dar antes de la menopausia. Una vez que es detectado, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer.

## 2) **Invasor (infiltrante):**

a) Carcinoma ductal invasor: es el que se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama, y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos.

b) Carcinoma lobular invasor: comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil de detectar a través de una mamografía.

c) Carcinoma medular: su incidencia es baja y es el tipo histológico de los carcinomas hereditarios por mutación de los genes BRCA1 y 2. Forma masas tumorales grandes y blandas con extensa necrosis y hemorragia constituidas por láminas sólidas de células grandes con estroma linfocitario.

d) Carcinoma tubular: tiene una morfología muy diferenciada. Es una variante poco frecuente que se caracteriza por tener muy buen pronóstico dada su baja agresividad.

El cáncer tiene un pronóstico y tratamiento diferencial en función de la etapa de desarrollo en que se encuentre y de los factores de riesgo que tenga el paciente. Para conocer esto hay que realizar una serie de análisis que facilitan su clasificación en uno u otro estadio.

El Comité Conjunto Americano del Cáncer utiliza el sistema de clasificación TNM [4]:

La letra **T**, seguida por un número que va del 0 al 4, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o a la pared del tórax debajo de la mama. A un número más alto le corresponde un tumor más grande y/o una mayor propagación a los tejidos cercanos. La letra **N**, seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y, si es así, si estos ganglios están adheridos a otras estructuras. La letra **M**, seguida por un 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes.

La clasificación, para los subgrupos, se realiza con números que van del I al IV.

**ESTADIO I:** indica que el tumor es menor de **2 cm** y no hay metástasis. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 98%.

**ESTADIO II:** abarca las siguientes situaciones:

- 1) No mide más de 2 cm pero los ganglios linfáticos de la axila están afectados.
- 2) Mide entre 2 y 5 cm y puede o no haberse extendido.
- 3) Mide más de 5 cm pero los ganglios linfáticos axilares no están afectados. El índice de supervivencia a 5 años es del 88-76%.

**ESTADIO III:** se divide en estadio IIIA y IIIB:

**El estadio III A** puede integrar a las siguientes formas: El tumor mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares y éstos están unidos entre sí o a otras estructuras. El tumor mide más de 5 cm y los ganglios linfáticos axilares están afectados. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 56%.

**El estadio III B** puede darse en los siguientes casos:

a) El cáncer se ha extendido a otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax).

b) El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 46%.

**ESTADIO IV:** se produce cuando el cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. Los órganos en los que suele aparecer metástasis con mayor frecuencia son los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro. También puede ser que el tumor haya afectado localmente a la piel. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 16%.

### **Tratamientos Actuales:**

El tratamiento de esta enfermedad tiene una etapa quirúrgica en primera instancia seguido por tratamientos hormonales y quimioterapia dependiendo de cada caso en particular. Los tratamientos hormonales principales apuntan a la utilización de inhibidores de aromatasas, agonistas de la hormona liberadora de la hormona leutinizante o antiestrógenos siendo el primero y el último los más utilizados en mujeres postmenopáusicas .

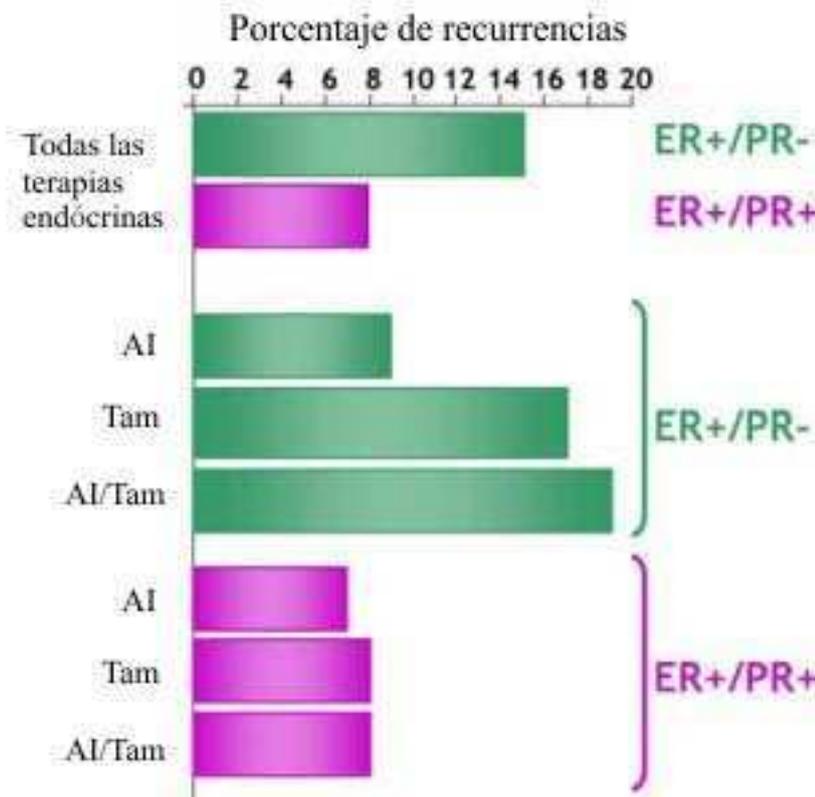
El primero de estos tres tratamientos apunta a privar de estradiol a las células tumorales mediante la inhibición de enzima aromatasas principalmente presente en las células estromales. Esta enzima cataliza la reacción de formación de estradiol a partir de

testosterona circulante y su función es realmente relevante porque se ha detectado que en los tumores los niveles de estrógeno pueden ser hasta 10 veces mayores que las concentraciones normales ([5] y [6]). Existe una interacción cruzada entre las células tumorales y el estroma que lleva a un aumento en la expresión de esta enzima y otros efectos que se observan cuando se co-cultivan células tumorales y estromales ([7] y [8]). Por ejemplo, los fibroblastos tumorales secretan HGF y CXCL12 (SDF-1) y éste último se une al receptor CXCR4 en las células tumorales estimulando la proliferación, migración e invasión [7]. Otros experimentos demostraron que los adipocitos estromales son capaces de sintetizar la enzima aromatasa y que la producción de estradiol por la misma puede ser eliminada mediante la utilización de inhibidores de aromatasas como Anastrozole, Letrozole y Exemestane [8]. Otros trabajos mencionan que el estradiol aumenta la expresión de genes involucrados en la producción y señalización de prostaglandinas lo que lleva a un aumento en la expresión de aromatasas [9] y otros que las mismas células tumorales secretan factores aún no identificados que llevan a aumentar la expresión de esta enzima en las células estromales [10].

El tercero de los tratamientos utilizados, la utilización de antiestrógenos, tiene como principal representante al tamoxifeno o a su metabolito, el 4-OH-tamoxifeno. Esta droga se une al receptor de estrógenos pero puede tener diferentes efectos tejido específicos. En el tejido mamario suele tener un efecto antiestrogénico, es decir, promueve apoptosis de las células epiteliales mamarias ([11] y [12]). Sin embargo, en el epitelio uterino tiene un efecto proestrogénico, actuando como un mitógeno sobre estas células, es por esto que el término más correcto para definir al tamoxifeno es modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM). Es por lo anterior que se ha detectado que tratamientos prolongados con tamoxifeno llevan a un aumento en la incidencia de los carcinomas endometriales. Por otro lado, existe otro problema. Aproximadamente del

total de los pacientes, el 75% presenta tumores positivos para el receptor de estrógeno y alrededor del 50% de éstos presenta resistencia desde el inicio al tamoxifeno, es decir, esta droga no es capaz de inducir la muerte de las células tumorales. Además, del 50% que responde inicialmente al tamoxifeno, un tercio desarrolla una resistencia adquirida y deja de responder al tratamiento hormonal [13].

El tratamiento al igual que el pronóstico del tumor, depende principalmente del avance y de los marcadores existentes en el tumor. Un estudio retrospectivo realizado sobre 9366 pacientes postmenopáusicas dio como resultado el siguiente grafico [14].



**Fig. A:** Grafico de porcentaje de recurrencias para dos grupos, positivos para receptores de estrógeno y progesterona (ER+PR+) o solo positivos para el receptor de estrógenos (ER+PR-) en función de diferentes tratamientos (AI: Inhibidor de Aromatasas, Tam: Tamoxifeno). Adaptado de [14]#

En este estudio se observó que los tumores positivos para el receptor de estrógenos (ER+) pero negativos para el de progesterona (PR-) tienen peor pronóstico que los dobles positivos. Por otro lado, los autores concluyen que el tratamiento más apropiado para el tratamiento de los dobles positivos es la utilización del tamoxifeno en combinación con inhibidores de aromatasas o solo, mientras que para los que son

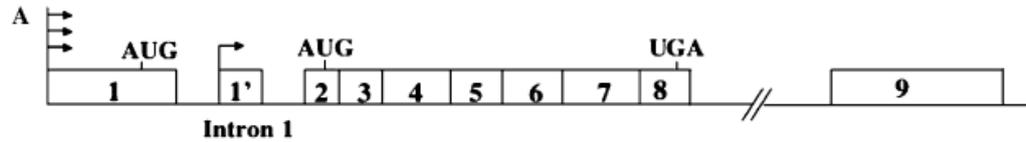
negativos para el receptor de progesterona recomiendan la utilización de inhibidores de aromatasas como el Anastrozole. Complementariamente, existen otros estudios que indican que es más probable que los tumores positivos para el receptor de estrógenos pero negativos para el de progesterona tengan la expresión de HER2 aumentada ([15] y [16]). La sobreexpresión de HER2 en células tumorales mamarias puede llevar a una disminución en la respuesta al tamoxifeno siendo actualmente propuesto como uno de los mecanismos de resistencia al mismo.

### **Receptor de estrógenos:**

Actualmente se conocen dos receptores estrógenos principales, el alfa y el beta, los cuales están codificados por diferentes genes en diferentes cromosomas y ambos pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Este tipo de receptores tiene tres dominios funcionales diferentes, un dominio N-Terminal compuesto por las regiones A/B, un dominio de unión al ADN compuesto por la región C y un dominio de unión al ligando compuesto por las regiones D/E/F (Figura B). El receptor de estrógenos beta tiene 96% de homología en el dominio de unión al ADN y un 53% de homología en el dominio de unión al ligando con el receptor alfa. Sin embargo, a pesar de su parecido y de que ambos son funcionales, el consenso actual es que el principal involucrado en la señalización en células de cáncer de mama es el receptor de estrógenos alfa ([17], [18] y [19]) aunque ambos están presentes. Es por esto último que se describirá en detalle sólo al receptor alfa.

El gen del receptor alfa está compuesto por 9 exones [20] (Figura B) y da lugar a tres productos diferentes conocidos por splicing alternativo (Figura C). Estos tres productos tienen pesos moleculares respectivos de 66 kDa, 46kDa y 36kDa siendo el de 66 kDa el receptor clásico y el principal producto del gen. Este último es el producto de

un ARNm conteniendo del exón 1 al 8, el de 46 kDa del exón 2 al 8 y el de 36 kDa del ARNm conteniendo los exones 2 al 6 y el 9. Como se observa en la Figura C, esto tiene varias implicancias funcionales en las variantes dado que la de 46 kDa carece del dominio AF-1 y la de 36 kDa del AF-1, AF-2 y su dominio de unión al ligando tiene 27 aminoácidos no presentes en las otras variantes producto de la traducción del exón 9.



**Fig. B:** Esquema del gen del receptor de estrógenos alfa adaptado de [20]



**Fig. C:** Esta figura muestra esquemáticamente los dominios de la proteína y productos de las diferentes variantes de splicing alternativo del gen del receptor de estrógenos alfa. Adaptado de [20].

Los dominios AF-1 y AF-2 son los llamados dominios de transactivación. Estos sufren fosforilaciones por quinasas específicas que producen cambios conformacionales en el receptor de estrógenos alterando su función. Estas fosforilaciones pueden tener gran relevancia, por ejemplo llevando a que un receptor unido a un determinado ligando se una a coactivadores en lugar de represores. Al dominio AF-2 se lo llama ligando dependiente dado que se fosforila principalmente por el contacto con el ligando, en este caso estradiol. Al AF-1 se lo llama ligando independiente porque se fosforila por activación de receptores de factores de

crecimiento que activan las vías de MAPK/ERK y PI3K/AKT entre otras. Según la bibliografía, el receptor de estrógenos alfa es fosforilado en serina 118, serina 167 y tirosina 537 por la vía de MAPK/ERK; en serina 167 por la vía de PI3K/AKT, treonina 311 por p38 ([21] y [22]) o serina en 305 por PKA [23]. Incluso hay trabajos que reportan que receptores truncados sin el AF-2 son insensibles a estradiol pero son capaces de responder a factores de crecimiento como el EGF y el IGF-1 [22]. Es importante resaltar que los dominios AF-1 y AF-2 se pueden activar individual o sinérgicamente [22].

Considerando que las variantes de 46 kDa y 36 kDa carecen de uno o ambos dominios de transactivación pero tienen el dominio de unión al ADN, es lógico pensar que tengan diferentes funciones o que compitan con la forma completa funcionando como dominantes negativos. Efectivamente, se comprobó que la variante truncada de 36 kDa funciona como dominante negativa sobre el receptor completo en cuanto a la respuesta genómica (tiene dominio de unión al ADN pero no el AF-2) cuando está sobre expresada y además ambas variantes truncadas tienen mayor relevancia funcional como iniciadores de señalización en membrana que el receptor completo [17]. Además también se registró que la variante de 36 kDa tiene un espectro mayor de ligandos que incluyen estrona, estriol y otros como consecuencia de la diferencia en su dominio de unión al ligando.

Dado que el estradiol es una molécula hidrofóbica, puede pasar libremente la membrana y como era de esperarse los primeros receptores de estrógeno que se encontraron tenían ubicación citoplasmática y nuclear en lugar de estar en la membrana plasmática. Estos receptores en contacto con el ligando, se dimerizan, traslocan al núcleo y funcionan como un factor de transcripción llevando al aumento en la transcripción de algunos genes. Estos efectos son visibles a las 2 o 3 horas de cultivar

con la hormona. Sin embargo, luego se descubrieron efectos en tiempos mucho más cortos de sólo minutos como la activación de las vías de MAPK/ERK o PI3K/AKT. Ante estos resultados y por otras evidencias crecientes se propuso que había receptores de membrana que tenían interacciones cruzadas con receptores del tipo de tirosina quinasa. Al primer tipo de respuestas se la llamó efectos genómicos o clásicos y sólo son observables luego de tratamientos prolongados, a los segundos se los denominó efectos rápidos, no genómicos o señalización iniciada en membrana.

Mediante técnicas como inmunofluorescencia y estudios de ubicación celular de proteínas por separación de fracciones celulares se observó que este receptor al parecer, además de una ubicación citoplasmática y nuclear, tiene también una ubicación en la membrana plasmática. Por esta razón se comenzó a estudiar si era la fracción de membrana de este receptor la que estaba involucrada en los efectos rápidos. Hoy se sabe que aproximadamente entre un 5 y 10% del total del receptor de estrógenos alfa sintetizado por la célula se ubica en membrana y que en las células de cáncer de mama se expresa más el receptor alfa que el beta en membrana [24]. Sin embargo las versiones truncadas del receptor de 46 y 36 kDa tienen porcentajes mucho mayores, llegando hasta un 50% para la variante de 36 kDa. La forma citoplasmática del receptor de estrógenos puede ser palmitoilada en la serina 447 dentro del dominio de unión al ligando por una Palmitoil Acil Transferasa, y esta reacción es necesaria para observar los efectos rápidos por tratamientos cortos con estradiol [25]. Otros autores reportaron que la expresión de Caveolina-1 es también necesaria para observar estas señales proponiendo un mecanismo en el cual la Caveolina-1 y el receptor de estrógenos alfa palmitoilado interaccionan principalmente a nivel de la serina 522 del receptor junto con el dominio de andamiaje de la Caveolina-1, lo que facilita la localización en membrana ([26] y [27]). El modelo actual describe que el receptor de estrógenos alfa formaría un

complejo en membrana junto con el receptor IGF-1 y la proteína adaptadora SHC en presencia de estradiol ([8] y [18]). En células MCF7 se observó que por acción de este ligando en un principio hay fosforilación la proteína SHC la cual se une al receptor de estrógenos favoreciendo la formación del complejo ternario con el receptor de IGF-1 llevando a la fosforilación de este receptor que pertenece a la familia de las tirosina quinasa [18]. Los mismos autores sostienen que la quinasa responsable de fosforilar tanto al SHC como al receptor de IGF-1 sería la c-Src la cual se activaría por la formación del complejo en presencia de estradiol. También se observa que además de la activación del receptor de IGF-1 hay activación del receptor de EGF ([18], [8] y [19]), el cual a su vez activa varias quinasa como MAPK y PI3K, e interacción entre el receptor de estrógenos alfa y la subunidad p85 alfa de PI3K que finalmente activa la subunidad catalítica p110 de PI3K [18]. En resumen, el estradiol lleva a la activación de varias vías como PI3K/AKT, MAPK/ERK por unión al receptor de estrógenos alfa de membrana por un mecanismo dependiente de SHC.

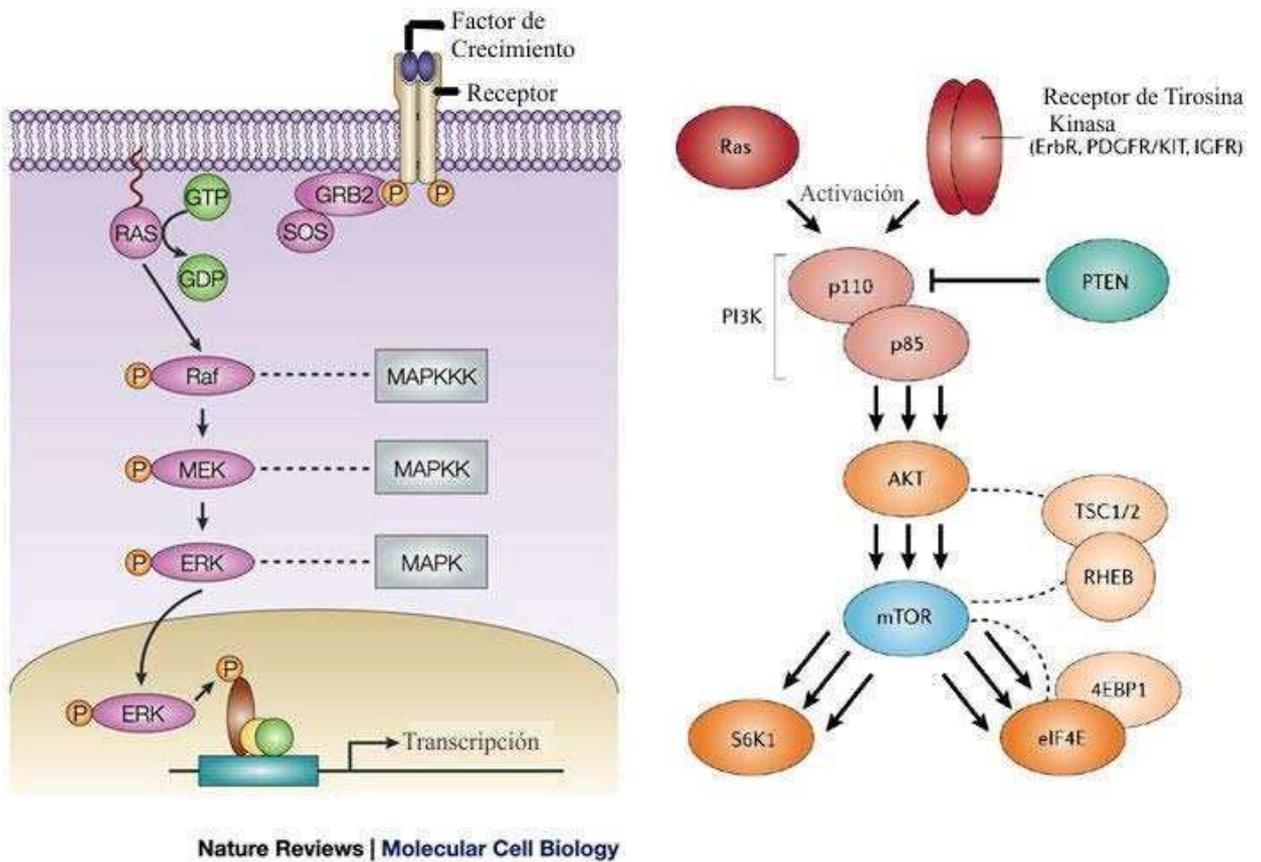
Sin embargo, se han encontrado en la membrana celular otros receptores además del receptor de estrógenos alfa que serían capaces de reaccionar con el estradiol aunque se considera que a concentraciones micromolares de estradiol el receptor de membrana sería el principal mediador de las respuestas no genómicas ([18, 19, 21]).

### **Vías de señalización de MAPK/ERK y PI3K/AKT:**

Las principales vías que se discutirán en este trabajo son las vías de MAPK/ERK y PI3K/AKT. Estas suelen estar asociadas a proliferación y supervivencia respectivamente. La primera de ellas, suele ser activada por receptores de factores de crecimiento y la primera proteína de la vía involucrada es RAS la cual fosforila a Raf y

sucesivamente se fosforila MEK y por ultimo ERK, que tiene un efecto directo sobre la transcripción de genes [28] (Figura D izquierda).

La otra vía que detallaremos, la de PI3K/AKT, es más sencilla e involucra menos quinasas intermedias que la anterior. Ésta también es activada por receptores tirosina quinasa o por interacción con la proteína RAS de la vía antes explicada. La proteína PI3K está formada por dos subunidades, p110 y p85 las cuales al activarse fosforilan a AKT estimulando la supervivencia [29] (Figura D derecha). Dado que la quinasa RAS puede fosforilar tanto a Raf de la vía MAPK/ERK como a PI3K ambas vías suelen activarse conjuntamente en presencia de ligandos. Existen inhibidores comerciales que interfieren con la activación de estas vías que son herramientas muy útiles para estudiar los mecanismos de acción de las diferentes drogas o compuestos. El inhibidor PD98059 es un inhibidor específico de la quinasa MEK1 e interfiere con la activación de la vía de las MAPK/ERK y el LY294002 inhibe las PI3K actuando sobre la vía de PI3K/AKT.



A

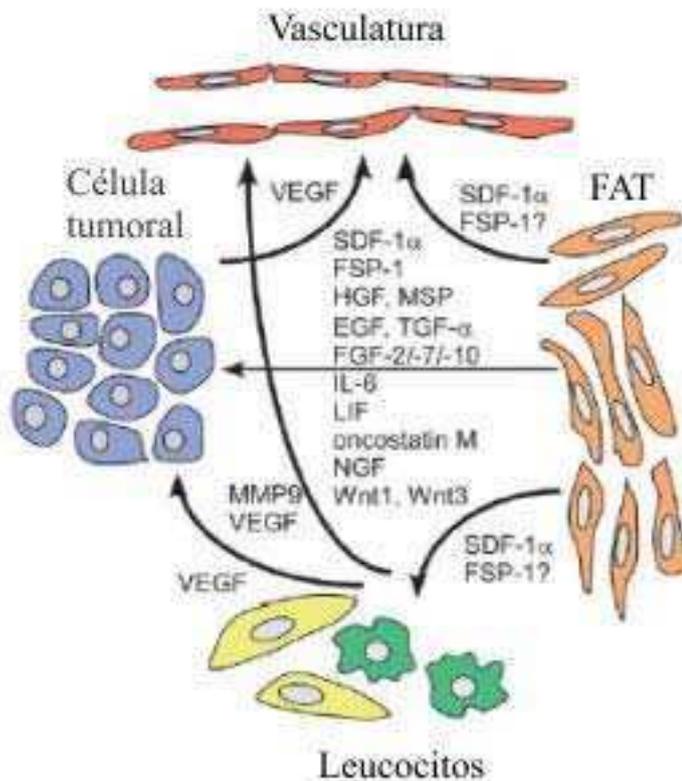
B

**Fig. D:** Activación de las vías de MAPK/ERK y PI3K/AKT. A) Activación de la vía MAPK/ERK, adaptado de [28]. B) Activación de la vía de PI3K/AKT, adaptado de [29].

### Concepto de microambiente tumoral:

En la actualidad la visión del cáncer sólo como el producto de la desregulación de oncogenes y/o genes supresores de tumores ha evolucionado. Hoy sabemos que los tumores son tejidos heterogéneos compuestos por diferentes tipos y poblaciones celulares, dentro de las cuales encontramos además de las células del parénquima tumoral a las células del estroma tumoral. Estas están representadas por células de tejido conectivo como fibroblastos, miofibroblastos, adipocitos, células endoteliales formando los vasos sanguíneos de tumor e incluso las células infiltrantes de sistema inmune. Todos estos tipos celulares son capaces de secretar factores solubles o de interactuar

directamente con las células tumorales u otras células estromales favoreciendo procesos diversos que agregan muchos niveles de complejidad al estudio y forman lo que hoy se conoce como microambiente tumoral. Otro concepto importante que se considera es que existe una co-evolución del epitelio y del estroma durante la progresión tumoral [30]. Algunas evidencias que sostienen esta hipótesis son experimentos en los cuales se demuestra que células tumorales con fenotipo maligno que retienen todas las mutaciones que sufrieron durante la progresión tumoral, no son capaces de conservar este fenotipo si se normalizan las señales del microambiente tumoral [31]. Y de modo inverso, un estroma tumoral puede favorecer la tumorigenicidad de células normales [32]. En la Figura E se ilustra el aporte de diferentes tipos celulares al microambiente tumoral, mostrando tanto ejemplos de señales de los elementos estromales hacia la célula tumoral, del tumor hacia el estroma como interacciones entre diferentes elementos del estroma.



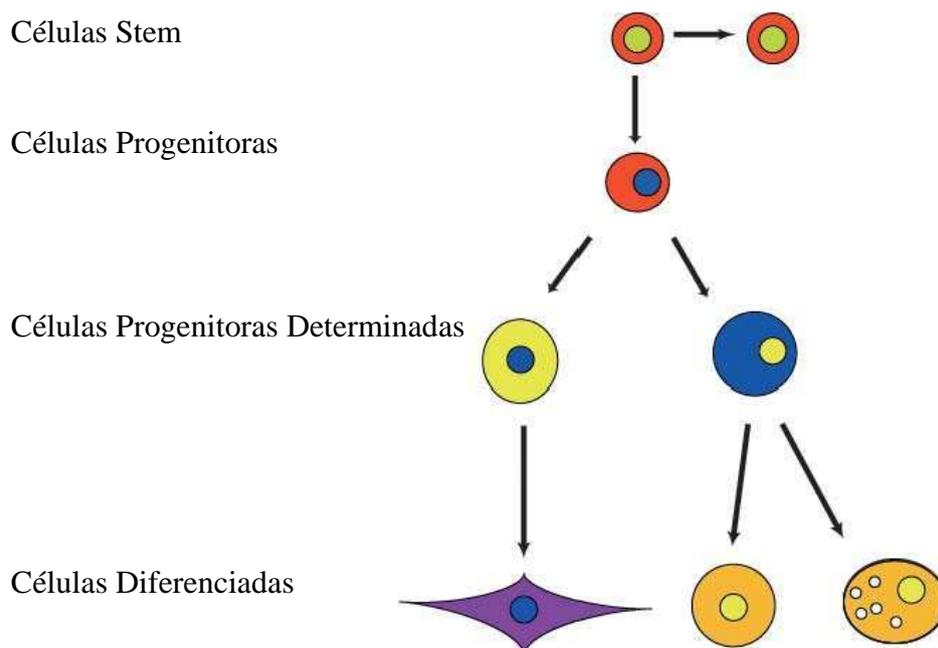
**Fig. E:** En esta figura se observan ejemplos de diferentes señales que forman parte del microambiente tumoral (FAT: Fibroblastos asociados al tumor). Adaptado de [30].

Incluso nuestro grupo de trabajo ha demostrado que elementos del microambiente tumoral como son la laminina, fibronectina o mismo el medio condicionado obtenido de fibroblastos asociados a tumor son capaces de modular la resistencia al tamoxifeno en células epiteliales de la línea LM05-E o en MCF7, protegiendo a las mismas de muerte iniciada por el tamoxifeno [33].

**Células stem y cáncer:**

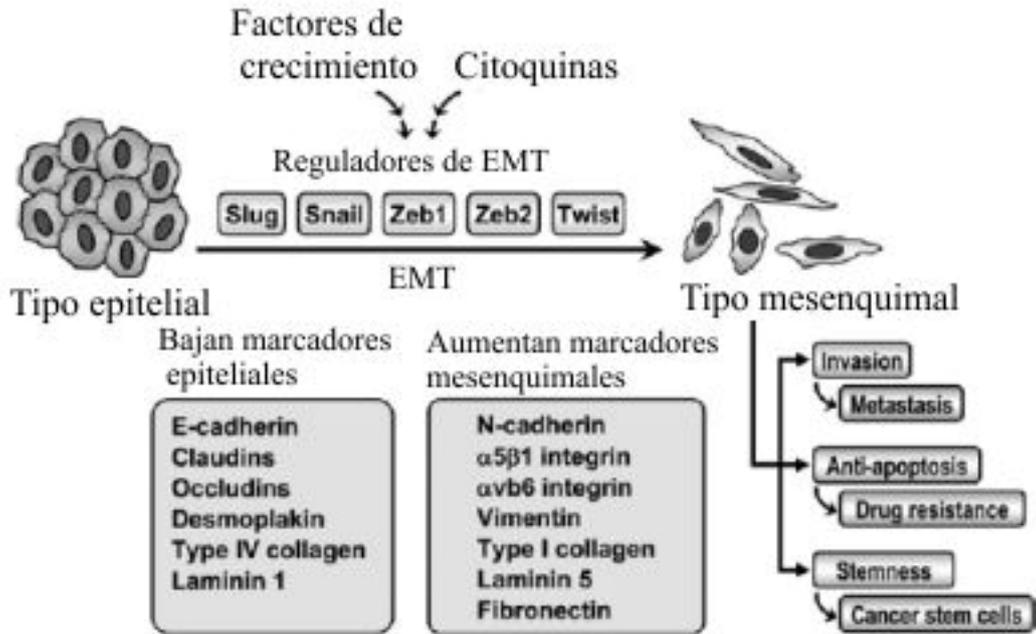
Las células stem se definen como células que se encuentran en tejidos maduros que tienen la capacidad de dividirse de forma tal de dar lugar a células iguales a ellas y células con un grado de diferenciación mayor. Este tipo de división se llama asimétrica y permite que en los tejidos se mantenga una población capaz de dar lugar al resto de las

poblaciones celulares que conforman el tejido [34]. Las células que derivan de las stem son capaces de generar los diferentes tipos celulares que componen los tejidos y se las suele llamar progenitoras, pero, al no poseer la capacidad de generar células iguales a ellas no se pueden mantener ilimitadamente ([35, 36]). Esa propiedad que tienen las células stem se llama capacidad de autorrenovación y es la que permite que siempre se puedan mantener representadas en los tejidos adultos. De esta forma en algunos tejidos adultos se observan jerarquías de células como la que se representa en la Figura F. Esta jerarquía es la que permite el mantenimiento de los diferentes elementos que forman parte del tejido y su regulación está estrictamente controlada por el microambiente tisular. Para las células stem el microambiente en que habitan se lo conoce como nicho, y este es de gran importancia. Un claro ejemplo de esta importancia se desprende del simple hecho que células stem en presencia de un microambiente extraño, es decir, diferente del cual se obtienen inicialmente, son capaces de dar lugar a poblaciones celulares diferentes a las que se originarían del microambiente inicial [37]. Según algunos autores el microambiente que forma el nicho de la célula stem define el destino de ésta, ya sea la autorrenovación o la iniciación de la diferenciación [38].



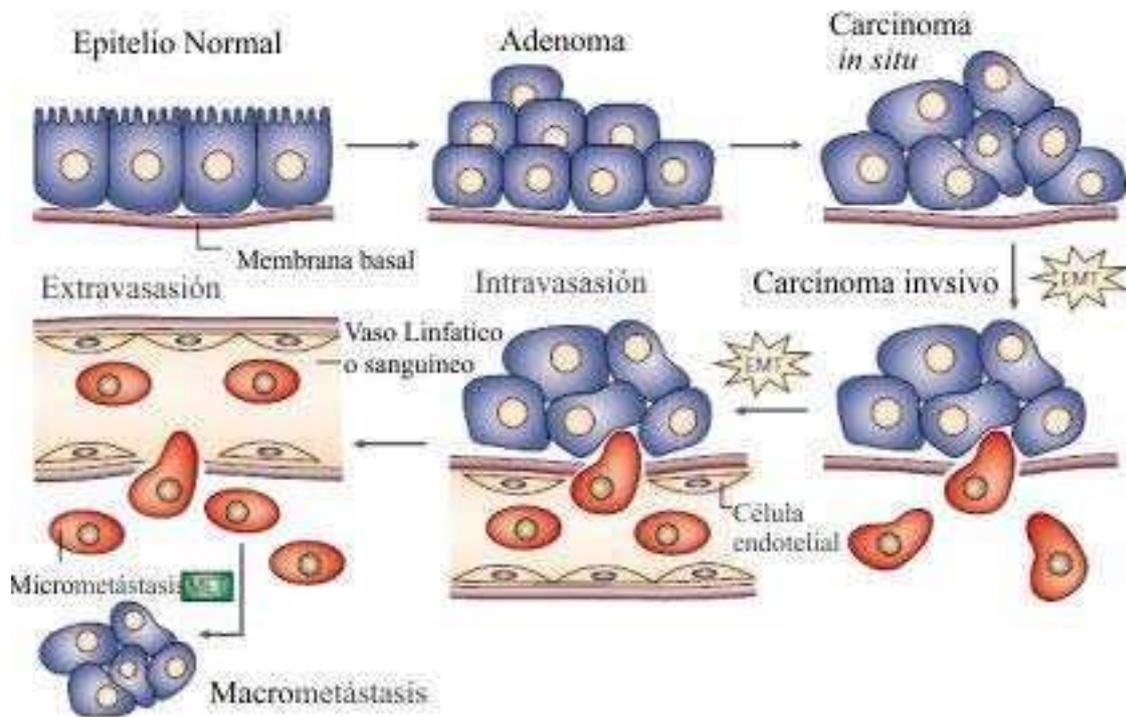
**Fig. F:** Esta figura muestra esquemáticamente la jerarquía del compartimiento stem. Adaptado de [39].

En los últimos años se ha comenzado a hipotetizar que las células stem podrían tener una gran relevancia en la progresión tumoral. Considerando las propiedades de estas células, se propone que el desarrollo de tumores podría ser liderado por una célula stem, y se las ha nombrado células stem tumorales o células iniciadoras de tumores. En particular, las propiedades que debe tener una célula para considerarse una célula stem tumoral son tener capacidad de autorrenovación, alta tumorigenicidad, y la capacidad de dar lugar a células diferenciadas que formen un tumor con poblaciones heterogéneas [40]. Se proponen varias alternativas posibles que podrían explicar el desarrollo de tumores con las células stem en un rol central. Una de ellas propone que las células stem normales del tejido adulto sufren mutaciones y pierden su capacidad de ser reguladas por el nicho y comienzan a proliferar descontroladamente o, por el contrario, cambian las señales del nicho y llevan a su desregulación [39]. Otras hipótesis proponen que una célula con un estado de diferenciación mayor que las stem sufre mutaciones y se desdiferencia adquiriendo propiedades stem [30]. En particular muchos trabajos y grupos de investigación consideran que la generación de células stem tumorales se debe a la transición epitelio-mesenquimática ([41, 42]). Este proceso se da naturalmente durante el desarrollo embrionario y lleva a que se pierdan marcadores epiteliales como E-cadherina y aumenten marcadores como N-cadherina, vimentina y fibronectina entre otros, y la célula gana una morfología más apropiada para los procesos de invasión y migración ([43, 44]). En la Figura G se observa que los genes necesarios para la regulación de la transición epitelio-mesenquimática son TWIST, SNAIL, SLUG, Zeb1 y Zeb2 y que la mayoría de los genes aumentan o bajan su expresión según la morfología celular.



**Fig. G:** Esquema ilustrativo que muestra los genes involucrados en la regulación de la transición epitelio-mesenquimática, los genes que aumentan o disminuyen su expresión en los estados tipo epitelial y mesenquimal y las propiedades que gana la células cuando adquiere esta última morfología. El aumento de invasión podría estar involucrado en la metástasis, la reducción de la respuesta a la apoptosis podría aumentar la resistencia a las drogas y el aumento del potencial stem aumentaría el porcentaje de células stem tumorales. Adaptado de [44].

Durante la progresión tumoral, se propone que la transición epitelio-mesenquimática podría tener relevancia en el pasaje de un carcinoma *in situ* a un carcinoma invasivo considerando que las células ganarían una mayor capacidad de invasión y una mayor capacidad de crecer en suspensión entre otras (Figura H).



**Fig. H:** Esta figura muestra esquemáticamente el posible rol de la transición epitelio-mesenquimática en la progresión tumoral. Adaptado de [43].

Por otro lado, otros autores demuestran que existe una importante relación entre la transición epitelio-mesenquimática y las propiedades stem dado que observan que al inducir esta transición en células epiteliales humanas mediante el tratamiento con TGF- $\beta$  o transfectando con los genes TWIST o SNAIL se ven aumentados varios marcadores y propiedades característicos de células stem. Por otro lado, también observan que en las poblaciones de células que naturalmente tienen características stem, se presentan marcadores de la transición epitelio-mesenquimática aumentados [42]. Por lo tanto, proponen a la transición epitelio-mesenquimática como un mecanismo mediante el cual células diferenciadas pueden adquirir propiedades stem y de esta forma cumplir el rol de células iniciadoras de tumores.

## **Células stem en cáncer de mama:**

En la actualidad, la existencia de una población de células stem en la glándula mamaria se encuentra bastante aceptada. El hecho de que estas glándulas sufran procesos de regeneración, expansión e involución durante la pubertad y/o ciclos sexuales, y que esté compuesta por diferentes linajes de células que tienen aparentemente un progenitor común son las evidencias más fuertes que sostienen esta hipótesis ([45, 46]). En uno de los experimentos más interesantes que abordaron esta hipótesis se usaron células tranfectadas con virus que se insertan al azar en el genoma para regenerar la glándula mamaria y se demostró que todas las células de la glándula mamaria completa regenerada poseían la inserción en el mismo sitio, indicando que todas las células y linajes provenían de un progenitor común [46]. En lo que no existe consenso y está actualmente en discusión, es en la identidad de esta población stem. Existe una diversidad de técnicas que evalúan los aspectos morfológicos y funcionales de las células stem que se utilizan en la actualidad para poder identificarlas y estudiarlas, algunos de estos procesos se detallan a continuación.

## **Marcadores para el estudio de células con propiedades "stem":**

Los primeros abordajes en este tema buscaron diferenciar a estas células por su capacidad de expulsar colorantes como Hoechst en células hematopoyéticas y la llamaron población lateral o "side population" como se la llama en inglés [47]. Estas células tienen propiedades stem y su mayor efectividad en la eliminación de colorantes permite que sean cuantificadas y separadas por citometría de flujo. Actualmente se encuentran poblaciones con estas características en la mayoría de los tejidos adultos incluyendo la glándula mamaria [48].

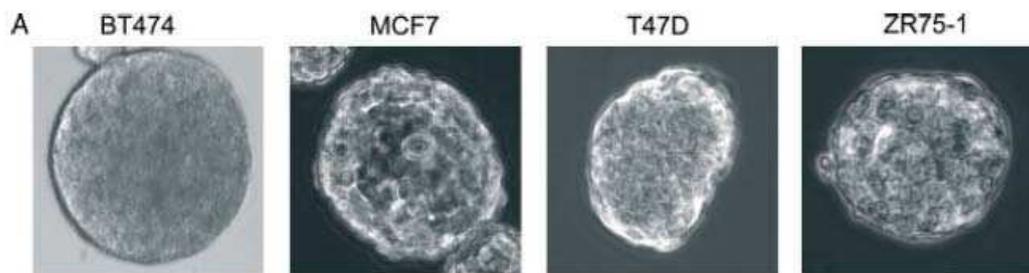
Otros autores utilizan diferentes grupos de marcadores de superficie para identificar y/o aislarlas, por ejemplo las poblaciones CD24<sup>+</sup>/CD49f<sup>+</sup> y CD24<sup>+</sup>/CD29<sup>alto</sup> se encuentran

enriquecidas en células con capacidad de regenerar la glándula mamaria en ratones ([49, 50]), o las células CD44+/CD24<sup>bajo</sup> están enriquecidas en células con propiedades stem en humanos [51]. Por ejemplo, se ha demostrado que al separar por un lado las células CD44+/CD24<sup>bajo</sup> y por otro lado las CD44+/CD24<sup>alto</sup>, se requiere un millón de células de las segundas para formar tumores mientras que solo 1000 células son necesarias de las CD44+/CD24<sup>bajo</sup> ([52, 53]). Además, se ha demostrado que al separar estas poblaciones por FACS y cultivarlas, solo las CD44+/CD24<sup>bajo</sup> vuelven a reconstituir la heterogeneidad original con ambas poblaciones, otra propiedad característica de las células con propiedades stem ([53, 54]). Los resultados de estudios retrospectivos muestran que pacientes con una mayor representación de la población CD44+/CD24<sup>bajo</sup> tienen peor pronóstico [55]. Otros autores, han observado que existe una población de células en modelos de ratón que son CD24<sup>medio/bajo</sup>/CD29<sup>alto</sup> que corresponden a células capaces de regenerar la glándula mamaria ([56] y [57]).

Otras formas de estudiar las poblaciones con propiedades stem apunta a evaluar la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1). Esta enzima transforma la vitamina A en ácido retinoico [58], y está involucrada en el desarrollo embrionario y diferenciación [59]. Se demostró que esta enzima tiene una alta actividad en células con propiedades stem ([40, 60, 61]), aunque realmente no está definido cual es su función en las mismas. Algunos autores proponen que esta enzima sería necesaria en la diferenciación temprana de las células stem [59]. Existen kits comerciales que usan un reactivo llamado “aldefluor” que al ser procesado por la enzima en cuestión da un producto que fluoresce en el color verde que puede ser cuantificado por citometría de flujo. Por lo tanto, es posible detectar la población que tiene alta actividad de esta enzima utilizando este kit e incluso aislarla por FACS. De este modo, se ha demostrado que las células que tienen esta actividad aumentada son capaces de formar tumores

inoculando solo 500 células. Estos tumores son heterogéneos con poblaciones con alta y baja actividad de la enzima ALDH en proporciones similares a las originales y tienen hasta 10 veces más capacidad clonogénica [40].

Otro marcador usado en la actualidad apunta a evaluar la capacidad de autorrenovación de las células stem. Este ensayo consiste en cultivar las células en condiciones no adherentes en baja densidad en un medio definido de modo que las células no puedan quedar agrupadas. A esto se lo conoce con ensayo de mamoesferas, en el cual un muy bajo porcentaje de células es capaz de sobrevivir y dar lugar a colonias en suspensión que provienen de una sola célula. Al contar la cantidad de colonias que se observan y conociendo el número de células sembradas se puede estimar el porcentaje de células que tienen capacidad de formar mamoesferas. En la Figura I se muestran fotos representativas de mamoesferas obtenidas a partir de diferentes líneas celulares mamarias humanas [62].



**Figura I:** Fotos representativas de mamoesferas con un aumento de 40X correspondientes a diferentes líneas celulares tumorales mamarias humanas. Adaptado de [62].

Se ha demostrado que las células capaces de dar lugar a estas colonias tienen propiedades de células stem o progenitoras y que estas colonias están enriquecidas en células con propiedades stem [63]. Se pueden formar mamoesferas a partir de las células de las mamoesferas ya formadas disgregadas enzimáticamente. A éstas se las denomina mamoesferas secundarias y de la misma forma a partir de las mismas se pueden generar

mamoesferas terciarias y así sucesivamente por varios ciclos; esto se debe a la propiedad de autorrenovación de las células con propiedades stem.

### **Células Stem y resistencia a terapias:**

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento contra el cáncer de mama en etapas avanzadas involucra terapias con radiación, terapias hormonales y/o con quimioterápicos. En todos los casos se ha detectado que un porcentaje de los pacientes no responde, o dejan de responder a la terapia en cuestión. En el marco de la teoría de las células stem existen hipótesis que intentan explicar el desarrollo de la resistencia a las terapias. Se propone que las células con propiedades stem tendrían una menor susceptibilidad a los tratamientos clásicos del cáncer como la quimioterapia y radioterapia dada sus propiedades diferenciales de baja tasa de replicación y su menor estado de diferenciación. Por ejemplo Phillips *et al.* demostraron que al aislar la subpoblación CD44+/CD24<sup>bajo</sup> a partir de algunas líneas celulares tumorales mamarias humanas y exponerlas a radiación estas tenían una mayor resistencia a la misma que el resto de la población [64]. Por otro lado, Li *et al.* demostraron que el tratamiento con agentes quimioterápicos a suspensiones de células obtenidas a partir de biopsias de pacientes incrementó el porcentaje de la población CD44+/CD24<sup>bajo</sup> al igual que la capacidad de formar mamoesferas de las mismas [65]. Además se ha demostrado que tratamientos con agentes como la perifosina (inhibidor de PTEN) que están dirigidos a reducir la población stem tienen un marcado efecto sobre la tumorigenicidad, obteniéndose tumores o líneas celulares menos agresivas [66] y otros autores demostraron que disminuir la población ALDH positiva lleva a una reducción de la resistencia a la quimio y radio terapia en células de cáncer de mama humanas [67]. Sin embargo, en bibliografía hasta el momento se encuentran pocos trabajos que estudien el rol de las células con propiedades stem en el desarrollo de la resistencia a la terapia

endócrina. Ao *et al* observaron que el tratamiento de mamoesferas de células mamarias humanas MCF-7 con tamoxifeno llevó a impedir el crecimiento de las mismas en concentraciones altas, sin embargo, luego de retirar el tratamiento las mamoesferas podían seguir creciendo y las células residuales eran capaces de dar lugar a nuevas mamoesferas, indicando que las células con capacidad de autorrenovación no serían sensibles al tratamiento [68]. Otros autores observaron que un tratamiento con una baja concentración de tamoxifeno a las mamoesferas dio lugar a un porcentaje mayor de mamoesferas secundarias, indicando nuevamente que las células con propiedades stem serían más resistentes al tratamiento con antiestrógenos. Por otra parte, el ARN extraído de mamoesferas se encontró enriquecido en NANOG, SOX2 y OCT4 [69].

### **Utilización de líneas celulares y cultivos primarios en investigación:**

Actualmente se intentan comprender los cambios que sufren las células que llevan a la evolución y crecimiento de tumores. Una de las principales estrategias para el estudio *in vitro* de las propiedades de un tumor es la utilización de líneas celulares continuas. Estas son fácilmente cultivables con medios definidos y proveen una fuente prácticamente ilimitada de material para estudiar. Sin embargo, generalmente se consideran poco representativas de los tumores de las que se extraen por lo que se vuelven ineludibles las etapas de investigación *in vivo* para finalmente validar los resultados obtenidos *in vitro*. Los dos factores por los cuales se les atribuye esta falta de representatividad se desprenden del proceso de generación y mantenimiento de una línea celular. Lo que se suele argumentar es que las células que se utilizan para generar la línea celular por lo general tienen un origen metastásico, no siendo realmente representativas del tumor original, y además que el cultivo en medios definidos podría seleccionar específicamente a una o algunas de las poblaciones celulares existentes en el

tumor. Como consecuencia de lo que se comentó anteriormente, lo que se pierde es la heterogeneidad del tumor original. Es por esta razón que los resultados observados *in vitro* pueden no correlacionar con los observados *in vivo* al subestimarse las interrelaciones entre las diferentes poblaciones tumorales. Otro aspecto importante de las líneas celulares de mama actuales es que la gran mayoría sólo está representada por células del tipo epitelial y carecen de componentes estromales.

Por otro lado, los cultivos primarios logrados a partir de tumores suelen ser una opción intermedia entre el trabajo *in vivo* y las líneas celulares. Si bien existe un proceso de selección en la formación de este tipo de cultivos estos suelen ser más representativos del tumor del que provienen que las líneas celulares, principalmente debido a su heterogeneidad en cuanto a poblaciones de células que lo componen. Esta selección es consecuencia del medio definido utilizado para obtenerlo y la adherencia de las células a las placas de petri, proceso donde se pierde un porcentaje muy importante del cultivo. Estos cultivos son más representativos de la heterogeneidad del tumor original que las líneas celulares continuas y son una herramienta muy útil para los ensayos a realizar.

En nuestro laboratorio, se generó una línea estable a partir de un tumor de mama surgido espontáneamente en una hembra virgen de la cepa BALB/c. Este tumor, llamado M05, es positivo para el receptor de estrógenos, estrógeno dependiente y sensible al tamoxifeno [70]. La línea celular generada a partir de este tumor, llamada LM05-Mix, presenta por lo menos dos poblaciones celulares las cuales se clonaron formando las líneas llamadas LM05-E y LM05-F. La caracterización de estas líneas celulares indicó que las células LM05-E tenían claros marcadores epiteliales y las LM05-F marcadores fibroblásticos [71]. Las células LM05-E son estimuladas por estradiol e inhibidas por tamoxifeno mientras que las LM05-F no responden a estos

tratamientos a pesar de que ambas expresan receptores de estrógenos y progesterona. Tratamientos de 48 horas con tamoxifeno llevaron a las células de la línea LM05-E a entrar en apoptosis y también se observó que las células respondían a tratamientos cortos mostrando activación de vías de señalización [71]. Estas características son similares a las originales del tumor, lo que nos permite utilizar el modelo *in vitro* como una buena herramienta para profundizar sobre resultados observados con el tumor. Por lo tanto, este modelo nos permite trabajar con tres herramientas en simultáneo, el tumor M05 *in vivo* con ratones BALB/c, cultivos primarios de este tumor y la línea celular estable derivada de este tumor *in vitro*. Además, utilizamos de rutina en nuestro laboratorio la línea MCF-7 [72], una línea celular humana positiva para receptor de estrógenos y sensible al tamoxifeno, es decir, de similares características tanto al tumor M05 de ratón como a la línea LM05-E derivada del mismo.

### **Objetivos:**

Considerando las evidencias actuales el objetivo principal de este trabajo es estudiar los efectos que genera la terapia endócrina sobre la población de células con propiedades stem en los modelos murinos M05 y la línea MCF-7. Por otro lado estudiaremos el efecto del microambiente tumoral sobre las células con propiedades stem.

Objetivos particulares:

1. Estudiar si tumores M05 sensibles al tamoxifeno sufren cambios en la población con propiedades stem luego del tratamiento de los ratones portadores con pellets de tamoxifeno o vacíos para los controles. Además estudiar la morfología de los

tumores luego de un mes de tratamiento, la cinética de crecimiento y los perfiles CD29/CD24 de los mismos.

2. Evaluar si los tumores que responden a la terapia con tamoxifeno muestran una alteración en su velocidad de crecimiento al ser transferidos a nuevos ratones sin tratamiento. Por otra parte evaluar si mantienen cambios en la población con propiedades stem, y/o cambios morfológicos. Además estudiar los perfiles de los marcadores CD29/CD24 en estos tumores.
3. Estudiar el efecto *in vitro* del 4-OH tamoxifeno sobre la población con propiedades stem mediante ensayos de mamoesferas en los modelos sensibles a esta droga LM05-E y MCF-7. Evaluar si estos cambios son perdurables en el tiempo en ausencia de tratamiento.
4. Estudiar la expresión de los genes involucrados en el mantenimiento de las células stem NANOG, SOX2, SOX9, OCT4 y SLUG en las líneas celulares LM05-E y MCF-7 y compararlos con la expresión en las mamoesferas obtenidas a partir de estas líneas celulares. Evaluar por otro lado si la selección lograda con tamoxifeno sobre las líneas celulares sobre plástico lleva a un enriquecimiento de células con mayor expresión de estos marcadores.
5. Estudiar mediante western blot la expresión diferencial del receptor de estrógenos y la E-Cadherina en lisados de mamoesferas generadas a partir de la línea celular MCF-7 y la línea parental.
6. Estudiar los efectos de elementos del microambiente tumoral como la laminina, fibronectina o medio condicionado de fibroblastos sobre la población de células con propiedades stem en los modelos LM05-E y MCF-7 mediante el uso de ensayos de mamoesferas y de actividad de ALDH1. Evaluar si estos cambios perduran en el tiempo.

7. Estudiar si las vías de señalización de MAPK/ERK y PI3K/AKT están involucradas en los cambios generados por los elementos del microambiente tumoral mediante el uso de inhibidores específicos de estas vías.
8. Estudiar los efectos de los elementos del microambiente tumoral sobre la capacidad clonogénica de células LM05-E y MCF-7.
9. Estudiar el efecto del tratamiento de mamoesferas con elementos del microambiente tumoral, en particular evaluando la capacidad de formar mamoesferas secundarias y la expresión de genes de mantenimiento de células stem.

# **Materiales y métodos**

## **Hormonas**

El 17- $\beta$ -estradiol (Sigma) y el 4-OH-tamoxifeno (Sigma) fueron preparados en soluciones stock de  $10^{-5}$  M y  $10^{-3}$  M respectivamente en etanol absoluto, para su posterior dilución 1/1000 en medio de cultivo. Todos los controles fueron realizados con la dilución correspondiente de vehículo que no causó efectos sobre las líneas celulares.

## **Medio de cultivo**

Para el mantenimiento de las células MCF-7, LM05-E, F y MIX se utilizó DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12 1:1, Sigma), con el agregado de sulfato de gentamicina en concentración 80 mg/l y bicarbonato de sodio: (1,2 g/l). Se preparó con agua MilliQ y se llevó a pH:7,2. Se esterilizó por presión negativa utilizando filtros de acetato de celulosa de 0.22  $\mu$ m de poro (Milipore). Para los experimentos se utilizó DMEM/F12 sin rojo fenol.

## **Suero fetal bovino**

El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido de la firma Bioser S.A-PAA Laboratorios GMBH, Pasching, Austria. Para obtener el SFB absorbido de hormonas esteroideas o “*charcolizado*” (SFBch) se incubó el SFB con 5% (p/v) carbón activado durante 24 horas a 4°C en permanente agitación. Luego de la absorción el suero se centrifugó seis veces a 20.000 g durante 20 minutos. Al sobrenadante se le adicionó 5 % (p/v) carbón activado, se lo incubó durante 1 hr a 4°C con agitación y se realizaron centrifugaciones sucesivas hasta eliminar completamente el carbón. El SFB “*charcolizado*” se esterilizó por filtración negativa, utilizando filtros de 0.22 $\mu$ m (Millipore).

### **Ensayo de mamoesferas:**

Las células se cultivaron en condiciones definidas que sólo permiten el crecimiento de células stem o progenitoras. Las condiciones consistieron en un cultivo no adherente (sobre agarosa, polyhema o en placas de baja adherencia) con medio definido en ausencia total de suero. El medio se compuso por DMEM/F12 con el agregado del suplemento B27 de Stem Cell Technologies y EFG (20ng/ml) [63]. Para evaluar la sensibilidad de las mamoesferas al tamoxifeno simplemente se le suplementó al medio para mamoesferas 4-OH-tamoxifeno  $1.10^{-6}$  M y vehículo como control. Las mamoesferas se cuantificaron contando el número total de colonias en suspensión por pocillo utilizando un microscopio invertido Nikon eclipse TE2000 en aumento final 40X. Para hacer los ensayos con el citómetro de flujo y las mamoesferas secundarias fue necesario disgregar las mamoesferas, para lo cual las colonias en suspensión fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 µl de tripsina 0,25% a 37 °C durante 5 minutos para células MCF-7 y 10 minutos para células LM05-E y luego disgregadas mecánicamente mediante pipeteo con micropipeta.

### **Citometría de flujo:**

Las células se obtuvieron a partir de cultivos primarios de tumores, líneas celulares o a partir de mamoesferas disgregadas. Las células obtenidas fueron contadas y sembradas a una concentración de un millón de células por ml, centrifugadas y resuspendidas en una solución de PBS 2% suero con anticuerpos 1/333 CD24 APC, 1/100 CD29 FITC y/o 1/10 Linaje PE de Biolegend (N° cat. 133303, San Diego, Estados Unidos) e incubadas una hora en hielo. Se utilizó un citómetro PARTEC PAS III y las muestras fueron analizadas utilizando el programa WinMDI 2.8.

### **Estudio de la población ALDH+:**

Con el fin de determinar el porcentaje de células ALDH+ en la línea LM05-E se utilizó un kit de Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada) llamado ALDEFUOR® según el protocolo indicado por la compañía. En resumen, para cada tratamiento a evaluar se separaron 2 tubos con 400.000 células los cuales fueron centrifugados y resuspendidos en 400 µl del buffer de ensayo del kit adicionándole a uno de los tubos el inhibidor específico de la enzima llamado DEAB y a ambos el reactivo aldefluor. Luego de incubar una hora a 37°C las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. El tubo que contenía el inhibidor específico de la enzima se utilizó para determinar los límites para el análisis de porcentaje de células positivas, fijando como positivas aquellas células con una intensidad igual o mayor a la del 1% superior del tubo adicionado con DEAB.

### **Experimentos *in vivo* con el modelo M05:**

Se utilizaron ratones hembra, vírgenes de 10 semanas de la cepa BALB/c a los cuales se les trasplantó el tumor M05 mediante trocar en el subcutáneo a la altura de la glándula mamaria número 4. Se utilizaron 6 a 8 ratones por grupo los cuales fueron tratados con pellets de citrato de tamoxifeno de 2,5 a 5 mg, o con pellets vacíos (vehículo) como publicamos previamente [70]. El crecimiento fue medido utilizando un calibre y un mes después de comenzado el tratamiento los tumores fueron recuperados y tuvieron tres destinos: se congelaron a -80 °C para realizar cortes con crióstato, se disgregaron mecánicamente y enzimáticamente para obtener suspensiones celulares para evaluar marcadores mediante citometría de flujo y la capacidad de formar mamoesferas, o fueron pasados utilizando un trocar a nuevas hembras BALB/c. Para el cálculo del

volumen tumoral se utilizó la fórmula:  $\text{Ancho} \times (\text{Largo})^2/2$ . La disgregación del tumor consistió en procesar mecánicamente con una tijera de cirugía en primera instancia. Luego se procedió a incubar el tejido disgregado durante 1 hora en una solución de 0.2% tripsina/colagenasa con 2% suero fetal bovino a 37 °C. La suspensión celular obtenida fue lavada 2 a 3 veces centrifugando y resuspendiendo en medio con suero 10%. De este modo, se obtuvieron las suspensiones celulares que fueron utilizados para evaluar la capacidad de formar mamoesferas, o evaluar mediante citometría de flujo la presencia de distintas poblaciones celulares. Para el caso de las citometrías de flujo, los glóbulos rojos fueron lisados con un buffer de cloruro de amonio de modo que no interfieran en la marcación.

### **Inmunofluorescencia:**

Los tumores fueron congelados a -80° C, incluidos en OCT y cortados con crióstato. Se utilizaron anticuerpos contra receptor de estrógeno alfa fosforilado en la serina 118 (dilución 1/100, Santa Cruz Biotechnology),  $\beta 1$  integrina (dilución 1/100, Santa Cruz Biotechnology), E-Cadherina (dilución 1/100, BD),  $\alpha 6$  integrina (dilución 1/100, Santa Cruz Biotechnology) y laminina (dilución 1/100, Molecular Probes). El protocolo de coloración utilizado es el detallado en [71]. Los cortes teñidos se analizaron con un microscopio confocal Nikon.

### **Extracción de proteínas**

Una vez finalizados los tratamientos las células se lavaron dos veces con buffer salino de fosfato (PBS) y se agregó buffer RIPA (50mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% Nonidet P-40 y EDTA 20 mM) con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma) y se recolectaron con un

“scraper”. Para el caso de las mamoesferas, estas fueron centrifugadas para sacar el medio, lavadas una vez con PBS centrifugando y luego se resuspendieron en el buffer RIPA. Se lisaron durante una hora con agitación en hielo. Luego se centrifugó a 13.000 RPM durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue utilizado en estudios de Western blot.

### **Western Blot**

Se midió la concentración de proteínas de los extractos por el método de Bradford y se sembraron entre 50 y 100 µg por calle en geles de 10 % de SDS-poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas se diluyeron en buffer de siembra 4X (0.25mM Tris; 10 % SDS; 4% sacarosa; 1mg/ml azul de bromofenol) con el agregado de 5% β-mercaptoetanol y se calentaron a 70 °C durante 5 minutos. Se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad) previamente activadas (2 minutos en metanol), se bloquearon una hora a temperatura ambiente con una solución 5% leche descremada (Nestle Svelty) en TBS-Tween 0,1% v/v, y se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-Tween 0.1% con el agregado de 5% leche descremada (Nestle Svelty) o 5% BSA (Sigma) durante toda la noche a 4°C en agitación. Luego se realizaron 3 lavados de 15 minutos con TBS-Tween 0,1% v/v y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente en agitación.

La reacción antígeno-anticuerpo se detectó por reacción de quimioluminiscencia (ECL Advanced Western Blotting Detecting Kit, GE Healthcare Life Sciences) y placas fotosensibles (Kodak Biomax Light film). Luego de ser reveladas, las membranas fueron tratadas con “stripping buffer” (62.5mM TRIS, 2% SDS, 100mM β-

mercaptoetanol, pH: 6,7) para ser reutilizadas. Las placas fueron escaneadas para medir las bandas obtenidas utilizando el programa Gel Pro Analyser 4.

### **Anticuerpos Primarios.**

Para el estudio por Western Blot, se utilizaron diluciones entre 1/200 y 1/15000 de los anticuerpos en TBS 0.1% Tween con el agregado de 5% leche descremada (Nestle, Svelty) o 5% BSA (Sigma).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anti actina (Sigma) 1/15000

Anti E-cadherina (Santa Cruz) 1/2500

Anti receptor de Estrógenos humano (Santa Cruz HC-20) 1/200

### **Anticuerpos Secundarios:**

Anti-ratón (Millipore) 1/5000

Anti conejo (Millipore) 1/5000

### **RT-PCR:**

Cultivos subconfluentes correspondientes a las distintas líneas celulares tratadas o no con tamoxifeno y cultivos de mamoesferas sin tratar se lavaron, lisaron con el reactivo TRIzol® y se procedió a la purificación del ARN. La obtención del cDNA se realizó mediante el kit de Bio Rad Iscript cDNA synthesis. Los productos de PCR fueron obtenidos a partir de los pares de primers humanos de Nanog, Sox2 y Oct4 de Lengerke *et al* [73] y de los pares de primers murinos de Nanog, Sox2 y Oct4 de Zhang *et al* [74].

### **Extracción de medio condicionado de Fibroblastos Tumorales:**

Se sembraron 1.000.000 células de la línea celular LM05-F en placas de 100 mm de diámetro y se las cultivó 1 día con medio DMEM/F12 con rojo fenol con suero fetal

bovino 10%. Luego se lavaron 2 veces y se les cambió el medio a 4,5 ml DMEM/F12 sin rojo fenol y se las cultivó toda la noche sin suero. Al otro día se extrajo el medio de los fibroblastos, se centrifugó para eliminar células muertas y detrito celular, y luego se alicuotó y congeló el medio para su posterior uso.

### **Ensayo de sensibilidad al tamoxifeno:**

Se sembraron aproximadamente 150.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos o 350.000 en placas de 6 pocillos. Al otro día se las lavó 2 veces con PBS y se las incubó 5 días con medio DMEM/F12 con estradiol  $10^{-8}$ M y 4-OH-tamoxieno  $10^{-6}$ M o solo estradiol como control. Luego de este tiempo las células se colorearon con cristal violeta o se contaron con cámara de Neubauer para evaluar proliferación. Se extrajo el ARN para evaluar expresión génica o se tripsinizaron y contaron las células con cámara de Neubauer para realizar cultivos de mamoesferas.

### **Ensayo de proliferación por cristal violeta:**

El cristal violeta es un colorante básico capaz de unirse al ADN marcando los núcleos de color violeta. La coloración consistió en 2 lavados con PBS, 10 minutos de fijación con metanol acético, 2 lavados más con PBS y luego se removió el mismo y se dejó secar al aire. Una vez seco se le agregó el cristal violeta y se lo dejó colorear por 10 minutos luego de los cuales se lavó el exceso con agua corriente. Se tomaron fotos de las placas coloreadas y luego se recuperó el colorante con etanol acético y se midió la densidad óptica a 540 nm en un lector de placas Multiskan Ascent.

### **Ensayos Clonogénicos:**

Suspensiones de células de las líneas celulares LM05-E o MCF-7 fueron contadas y sembradas en una concentración de 200 células por hoyo en placas de 24 hoyos con medio con suero 10%. Luego de una semana de crecimiento, las células fueron fijadas con metanol acético y coloreadas con cristal violeta como se explicó previamente en los experimentos de proliferación. Una vez coloreadas, se contó el número de colonias con más de 8 células por hoyo en una lupa binocular.

### **Inhibidores farmacológicos**

Los inhibidores fueron preparados en DMSO y utilizados en diluciones de por lo menos 1/1000. Para inhibir la vía MAPK/ERK  $\frac{1}{2}$  se utilizó PD98059 (Calbiochem, 10 $\mu$ M), para la vía PI3K/AKT se utilizó LY294002 (Calbiochem, 10 $\mu$ M). Como controles se utilizaron las diluciones correspondientes de DMSO.

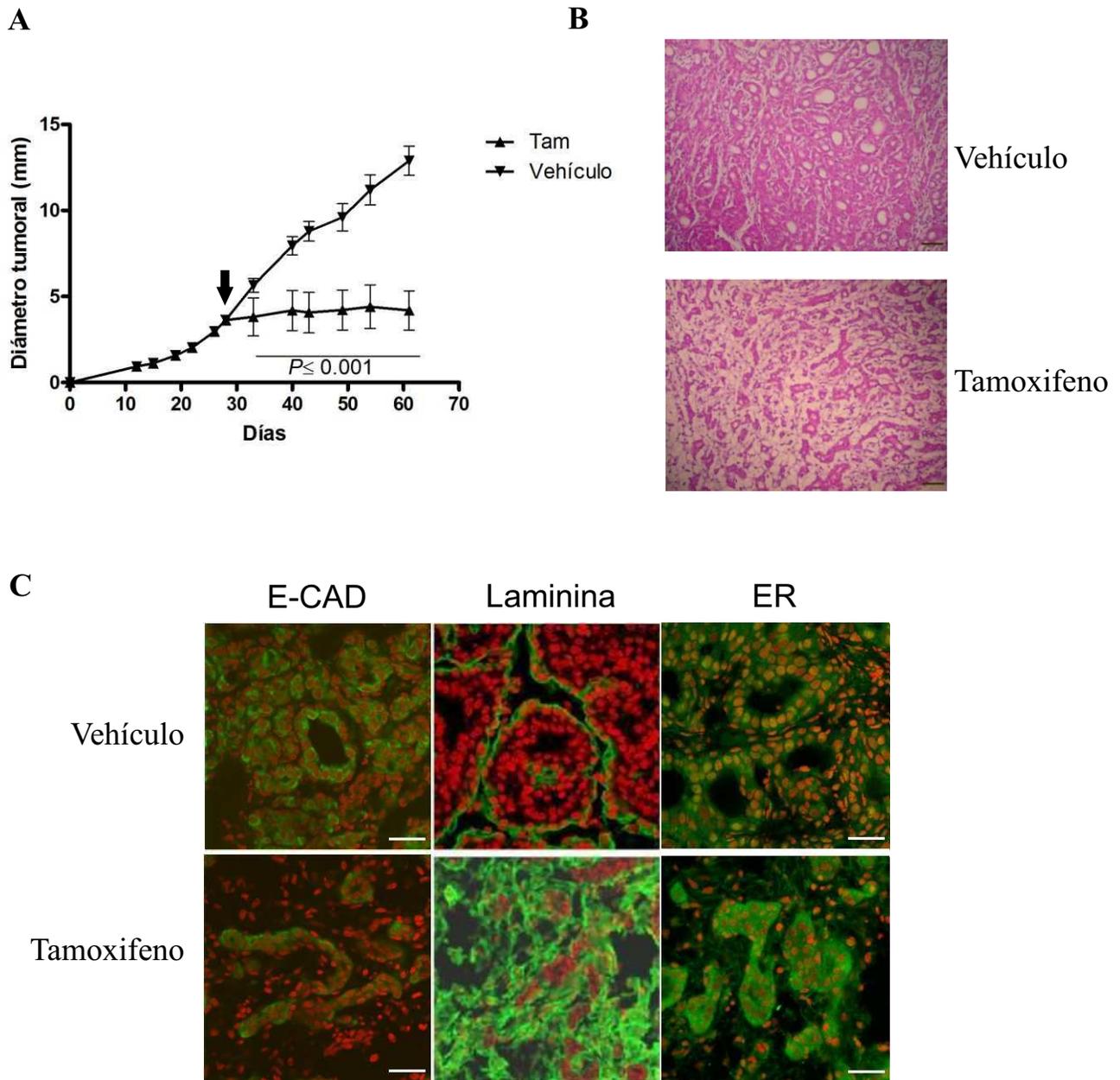
### **Estadística:**

El análisis estadístico de los experimentos se realizó mediante ANOVA de un factor y contrastes de Tukey o Bonferroni. Las barras representan media más desviación estándar, los asteriscos sobre las barras representan significancia con respecto al control y los asteriscos sobre la líneas comparan la barras bajo sus extremos. En todos los casos se realizaron por lo menos tres experimentos independientes.

# Resultados

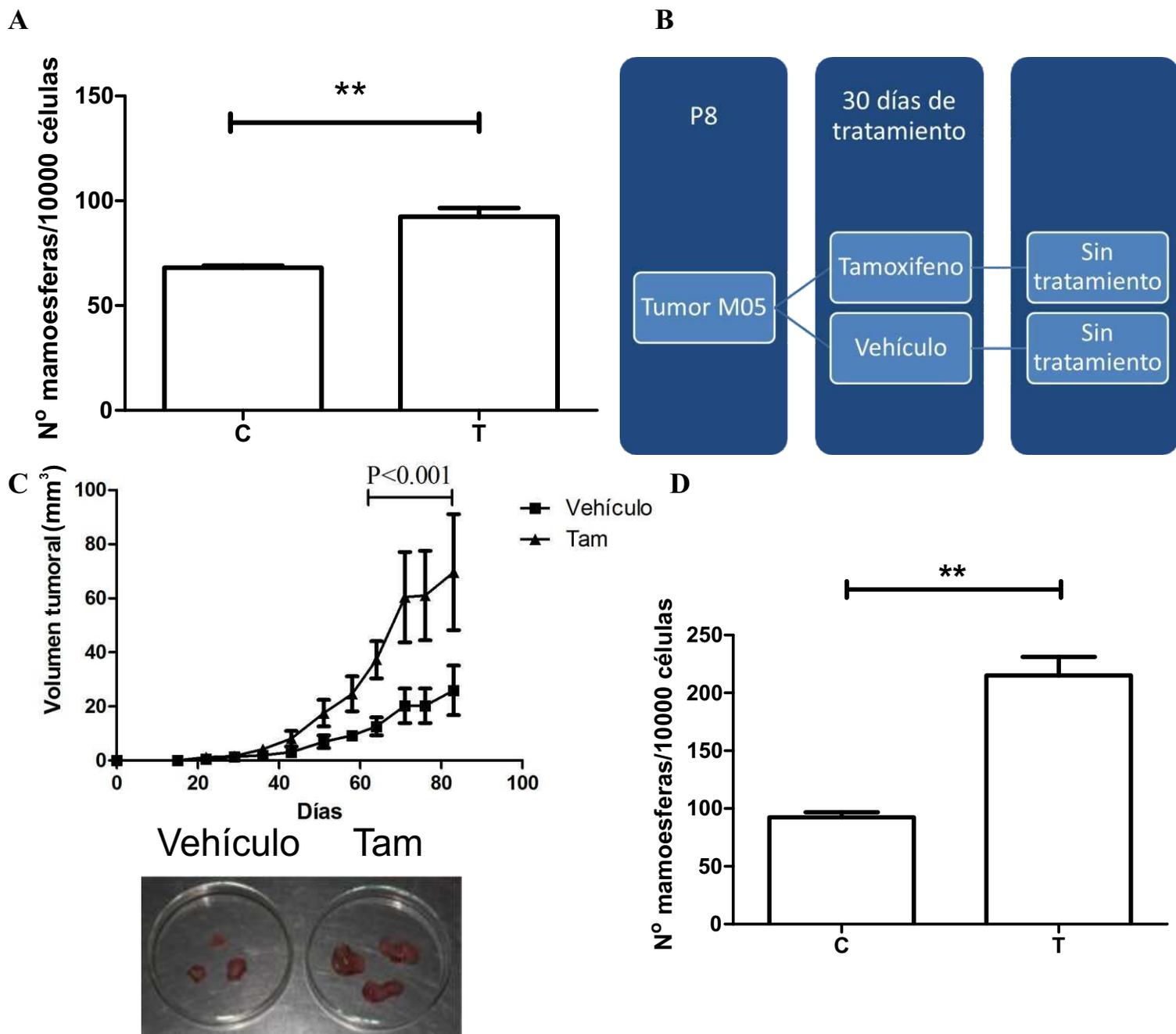
## **Efectos del tamoxifeno sobre el porcentaje de células con propiedades stem en el modelo tumoral M05.**

En tumores de mama, como en la mayoría de las líneas celulares, se encuentran subpoblaciones de células con propiedades de células madre o stem. Se observa que estas células tienen mayor resistencia a los tratamientos convencionales como la quimioterapia y la radioterapia. Sin embargo, en la actualidad hay pocos antecedentes sobre el efecto de la terapia endócrina sobre las células stem en cáncer de mama ([68, 69, 75]). En este trabajo decidimos investigar este efecto utilizando como modelo experimental al carcinoma mamario murino singenético M05 que es sensible al tamoxifeno y dependiente de estradiol [70]. Para ello se traspasó el tumor M05 a hembras vírgenes singenéticas de 10 semanas, se lo dejó crecer un mes, y luego a un grupo de ratones se lo trató con pellets de citrato de tamoxifeno (2,5 o 5mg) y al otro con pellets vacíos (vehículo) como control durante 30 días. En la Figura 1A se muestran las curvas de crecimiento de ambos grupos de tumores en las cuales se observa que el tamoxifeno inhibe el crecimiento tumoral en forma significativa con respecto al control como publicamos previamente [70]. Al evaluar cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina de ambos grupos se observó una marcada desorganización estructural luego del tratamiento con tamoxifeno y una disminución de la relación epitelio-estroma en los tumores de ratones en tratamiento con tamoxifeno con respecto a los tratados con vehículo (Figura 1B). Por inmunofluorescencias de cortes por congelación de estas muestras se observó una disminución en la población epitelial E-cadherina y receptor de estrógeno- $\alpha$  positiva y un aumento en la deposición de componentes de matriz extracelular como laminina y colágeno IV, asociados con el estroma (Figura 1C). Estos tumores fueron utilizados para medir la capacidad de



**Figura 1:** A) Curva de crecimiento del tumor M05 en presencia de tamoxifeno o vehículo. Veinte ratones hembra de la cepa Balb/c fueron inoculados con el tumor M05. Se los dejó crecer hasta un diámetro promedio de 4 mm (flecha) y luego se los trató con pellets de tamoxifeno (2,5 o 5mg) o vacíos como control (n=10 ratones por grupo). Se observó una inhibición significativa del crecimiento con el tamoxifeno ( $P < 0.001$ ). B) Muestras de tumores tratados con tamoxifeno o vehículo fueron fijadas, cortadas y teñidas con hematoxilina eosina. Se observa una pérdida importante del componente epitelial en los tumores que recibieron el anti-estrógeno (escala 100  $\mu\text{m}$ ). C) Inmunofluorescencias contra E-cadherina, laminina y receptor de estrógeno- $\alpha$  en cortes por congelación de tumores provenientes de animales tratados con tamoxifeno o vehículo. Se observa una importante pérdida de la población epitelial positiva para E-cadherina y receptor de estrógeno y un aumento del componente estromal por la deposición de laminina (lo mismo se observa al teñir contra colágeno IV y fibronectina). En todos los casos las marca está en verde (FITC) y los núcleos están contrastados con yoduro de propidio (rojo). Aumento: 400X(escala 50 $\mu\text{m}$ ). Se muestra uno de por lo menos 3 experimentos.

formación de mamoesferas, indicador de la presencia de células con propiedades stem. Para ello, tumores recuperados de ambos grupos de ratones fueron procesados mecánicamente y enzimáticamente de modo de obtener suspensiones celulares. Las mismas fueron lavadas, contadas y sembradas en placas de baja adherencia para ensayar la capacidad de formar mamoesferas. El resultado de estas pruebas indicó que los tumores derivados de animales tratados con tamoxifeno mostraron un aumento en la población capaz de generar mamoesferas (Figura 2A), indicando un aumento en la población con propiedades stem que osciló entre un 30% y 50% entre los diferentes experimentos. A continuación los tumores (tanto los derivados de animales tratados con tamoxifeno como aquellos derivados de ratones tratados con vehículo) fueron trasplantados a ratones sin tratamiento con el objetivo de evaluar si la interrupción del tratamiento alteraba por un lado la tasa de crecimiento de los tumores (como medida de agresividad), y por otro si modificaba a la población stem (esquema experimental, Figura 2B). La medición del tamaño tumoral demostró que los tumores que derivan de ratones tratados con tamoxifeno tenían una tasa de crecimiento significativamente mayor que la de los provenientes de ratones control (Figura 2C). Más aún, cuando se realizó el ensayo de mamoesferas con los tumores del pasaje ya sin tratamiento se observó que aquellos que derivaron de animales tratados mantuvieron un aumento considerable en la población con capacidad de formar mamoesferas a pesar de ya no estar expuestos al tratamiento (Figura 2D). Es decir, esta población se mantuvo aumentada a pesar de que no se continuó con el tratamiento original durante por lo menos dos meses. Se realizaron cortes con criostato de tumores congelados y se observó que los marcadores  $\beta 1$  integrina,  $\alpha 6$  integrina y el receptor de estrógenos fosforilado en la serina 118 estaban aumentadas en los tumores que provenían de animales tratados con tamoxifeno en la primera etapa, respecto de los controles (Figura 3A). Se conoce que tanto la alta

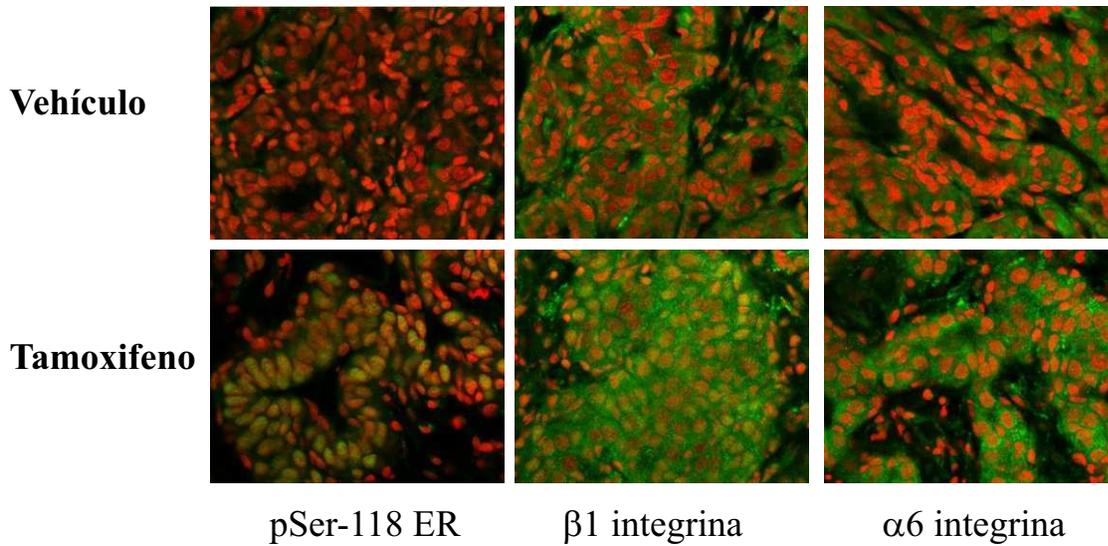


**Figura 2:** A) Ensayo de mamoesferas de tumores provenientes de ratones tratados con tamoxifeno (T) o vehículo (control, C). Se observó un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0.01$ ) en el número de mamoesferas en los cultivos derivados de tumores de animales que habían recibido tamoxifeno. Se muestra un experimento representativo de 3 donde en cada caso se analizaron 3 tumores independientes de cada tratamiento. B) Esquema mostrando el diseño experimental para evaluar el impacto del tratamiento una vez que el mismo es interrumpido. Después de recibir 30 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y los tumores pasados a ratones sin tratamiento. Cada tumor se pasó a cinco animales y se calculó la media de este grupo como valor para promediar el tamaño tumoral en cada caso. Se los dejó crecer para luego realizar ensayos de mamoesferas, cortes histológicos e inmunofluorescencias. C) Curvas de crecimiento de tumores derivados de animales que fueron tratados previamente con tamoxifeno o vehículo. El crecimiento de los tumores derivados de animales tratados con tamoxifeno fue estadísticamente mayor que el de los provenientes del grupo control ( $P < 0.001$ ). Se analizaron por lo menos 3 tumores en cada caso. Abajo se muestra la foto de los 3 tumores más grandes de cada grupo. Se muestra un experimento de tres. D) Ensayo de mamoesferas de los tumores derivados de animales tratados y no tratados. Se observó que a pesar de haber interrumpido el tratamiento, el grupo derivado de los animales que recibieron tamoxifeno generó mayor número de mamoesferas ( $P < 0.01$ ). Se analizaron entre 3 y 4 tumores por grupo. Se muestra un experimento de tres.

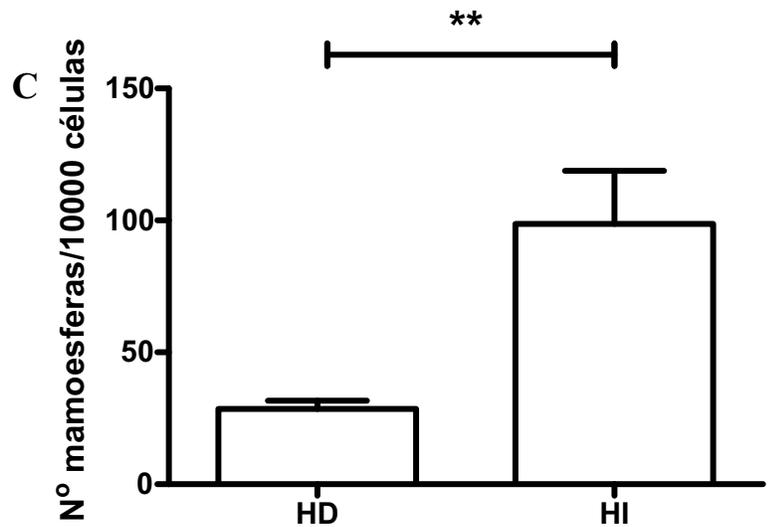
expresión de  $\beta 1$  integrina como la de  $\alpha 6$  integrina son una propiedad de las células stem [49, 76]; por lo tanto un enriquecimiento en estos marcadores también podría ser una evidencia de un aumento de dicha población. Por otra parte la presencia del receptor de estrógeno fosforilado es un indicador de resistencia al tamoxifeno [77]. En la Figura 3B se muestra una foto representativa de mamoesferas generadas a partir del tumor M05. El conjunto de estos resultados muestra que el tratamiento con tamoxifeno dio lugar a tumores con características claramente diferentes a las de los tumores originales, mostrando cambios morfológicos, un enriquecimiento en marcadores de células stem y una mayor capacidad de formar mamoesferas. Además se demostró que estas características se mantuvieron en el tumor aún en ausencia del tratamiento. Es decir, los tumores recuperados luego del tratamiento representan la selección de una población celular que da lugar a la generación de tumores con una tasa de crecimiento significativamente mayor a la del tumor parental no expuesto al tamoxifeno.

Por otro lado, observamos que luego de 9 pasajes el tumor M05 pierde su dependencia a estrógenos y es capaz de crecer en ratones ovariectomizados, considerándose entonces hormono independiente. Como siguiente objetivo estudiamos si existe un enriquecimiento en células con propiedades stem durante la transición de la hormono dependencia a la hormono independencia. Con este fin, se recuperaron de ratones independientes 4 tumores pasaje 7 (tumores hormono dependientes, HD) y 4 tumores pasaje 20 (hormono independientes, HI) y se procesaron en paralelo como se explicó previamente para obtener suspensiones celulares. Las mismas se sembraron en condiciones de formación de mamoesferas. Como se observa en la Figura 3C los tumores hormono independientes presentaron un notable enriquecimiento en células con capacidad de autorrenovación con respecto a los tumores hormono dependientes.

A



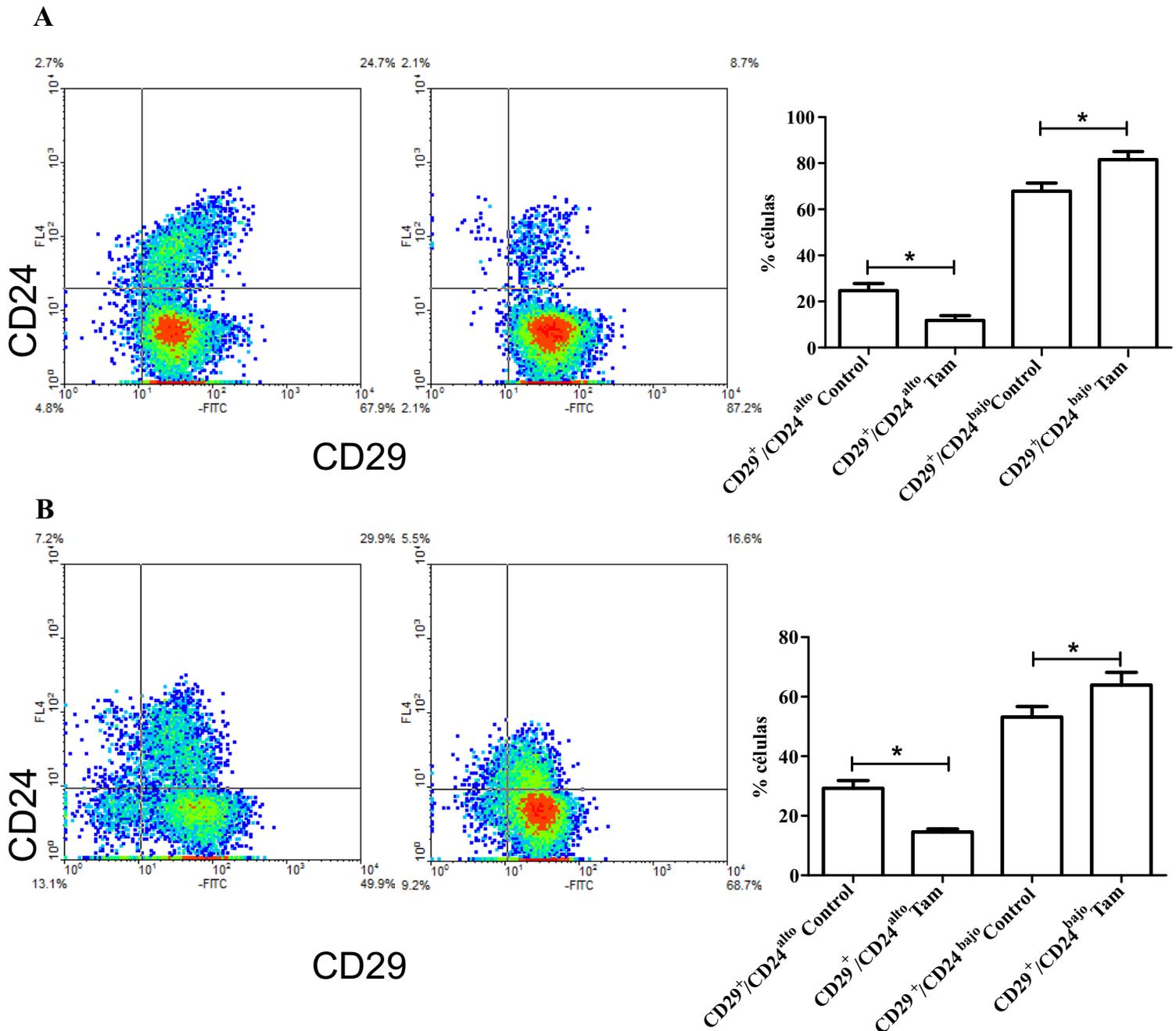
B



**Figura 3:** A) A partir de los tumores generados en el experimento de la Figura 2C se realizaron cortes por congelación e inmunofluorescencias. Se observó un aumento de la marca para fosfo-receptor de estrógeno- $\alpha$  (serina 118),  $\beta 1$  integrina y  $\alpha 6$  integrina. En todos los casos la marca está en verde (FITC) y los núcleos contrastados con yoduro de propidio (rojo). B) Aspecto de mamoesferas provenientes de tumor M05. Se ven como acúmulos de células bien organizadas y refringentes. Aumento: 400X. C) Ensayo de mamoesferas de células provenientes de tumores hormono dependiente (HD) u hormono independiente (HI). Se observa un aumento estadísticamente significativo en la capacidad de formar mamoesferas en los cultivos derivados de tumores HI. \*\*P<0.01.

## **Cambios en el perfil de marcadores CD24/CD29 en tumores M05 como consecuencia del tratamiento con tamoxifeno.**

Como se mencionó anteriormente, varios estudios han definido perfiles de marcadores de subpoblaciones celulares que se encuentran enriquecidas en células con propiedades stem. En células de ratón se observa que la subpoblación CD24<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> se encuentra enriquecida en células stem/progenitoras [49, 78] aunque otros autores reportan que existe una población CD24<sup>bajo-medio</sup>/CD29<sup>+</sup> que contiene células stem mamarias [56, 57, 79]. En nuestro modelo observamos un aumento de la población con propiedades stem junto con considerables cambios en la morfología en los tumores tratados con tamoxifeno. Considerando eso, buscamos evaluar los cambios generados en el perfil de marcadores de superficie como consecuencia de este tratamiento. Con este fin, luego de finalizado el tratamiento con citrato de tamoxifeno o vehículo los tumores fueron recuperados, y procesados para obtener suspensiones celulares. Se lisaron los glóbulos rojos, se lavaron las células con suero 10% y finalmente se marcaron con los anticuerpos CD24-APC, CD29-FITC y un marcador de linaje para eliminar células infiltrantes para luego ser analizadas por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 4A, los tumores provenientes de ratones en tratamiento con tamoxifeno mostraron un incremento de la población CD29<sup>+</sup>/CD24<sup>bajo</sup> y una disminución de la población CD29<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> con respecto a los tumores de ratones tratados con vehículo. Como siguiente experimento nos propusimos evaluar si los cambios observados en los tumores se mantenían en el tiempo estudiando tumores derivados de ratones con tratamiento crecidos en nuevos ratones en ausencia de tratamiento. La Figura 4B muestra que se mantuvieron las diferencias antes observadas indicando que el



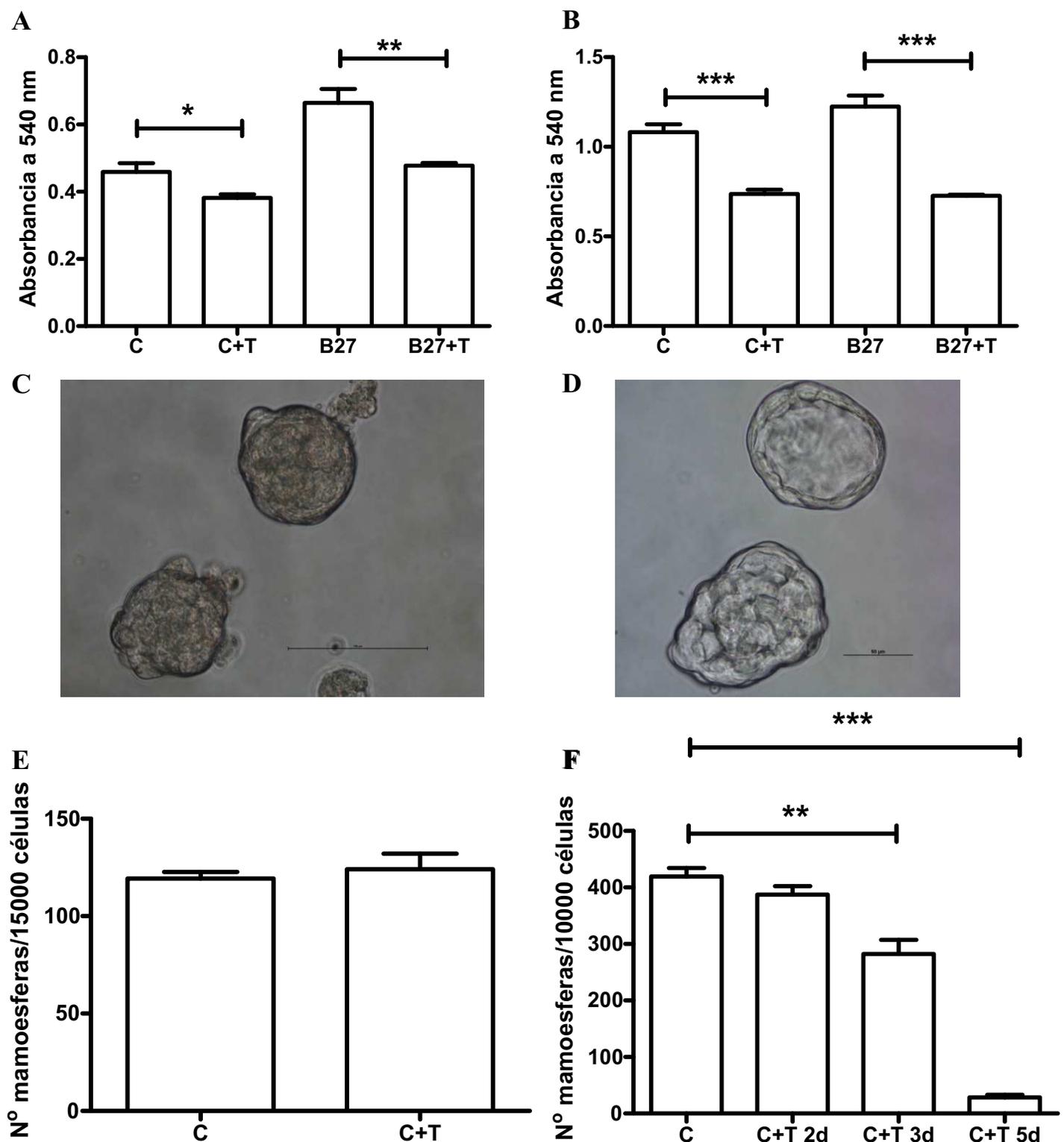
**Figura 4:** Citometrías de flujo utilizando los marcadores CD29-FITC/CD24-APC de tumores M05. A) Citometría representativa de tumores provenientes de ratones en tratamiento con pellets de tamoxifeno (der.) o control (izq.) y la respectiva cuantificación de 3 tumores independientes. B) Citometría representativa de tumores provenientes de ratones sin tratamiento pasados de ratones expuestos (derecha) o no (izquierda) al tamoxifeno (como se explica en el diseño experimental de la figura 2B). Se muestra la cuantificación de 3 tumores independientes.

tratamiento indujo un enriquecimiento en la población CD29+/CD24<sup>bajo</sup> perdurable en el tiempo.

### **Impacto del 4-OH-tamoxifeno sobre la proliferación de línea celular LM05-E y MCF-7 y sobre la capacidad de formar mamoesferas de las mismas.**

A continuación decidimos profundizar el estudio del efecto de la terapia endócrina sobre las poblaciones stem utilizando ahora como modelo las líneas celulares LM05-E y MCF-7. La primera es una línea murina sensible al tamoxifeno y dependiente de estradiol al igual que el tumor M05 del cual deriva. La MCF-7 es una línea celular humana tumoral de mama positiva para receptores hormonales y sensible al tamoxifeno [80, 81]. Como primer paso evaluamos la sensibilidad general de ambas líneas a esta droga. Con este fin se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de 24 y al día siguiente se trataron con 4-OH-tamoxifeno por un período de 5 días. Como resultado de estos experimentos se observó que la línea LM05-E fue sensible al tratamiento con 4-OH-tamoxifeno el cual inhibió el crecimiento celular entre un 20 y 30% (Figura 5A). La línea MCF-7 respondió de manera muy similar con una reducción de un 40 a 50% (Figura 5B). Además, en ambos casos se evaluó si el medio de mamoesferas (DMEM/F12 suplementados con B27 y EGF 20ng/ml) tenía influencia sobre la sensibilidad al 4-OH-tamoxifeno. En estos experimentos se observó que las líneas son sensibles al tamoxifeno aún en presencia de los suplementos de B27 y EGF (Figura 5A y B) indicando que el medio de mamoesferas no interfiere en la sensibilidad al tamoxifeno en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

Como siguiente paso, dado que las líneas fueron sensibles al tamoxifeno y que observamos que el medio para crecer mamoesferas no es capaz de revertir esta



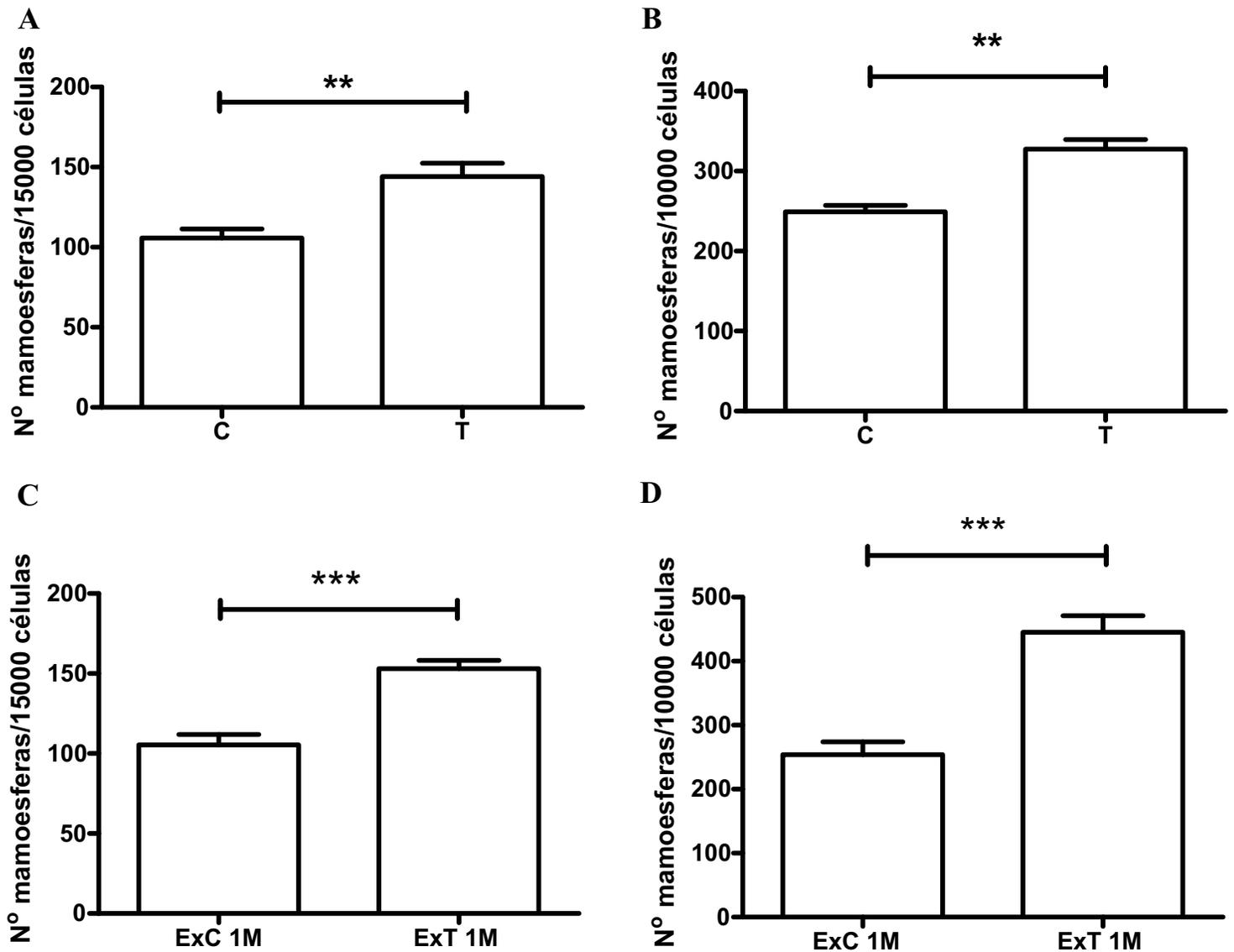
**Figura 5:** A) Ensayo de cristal violeta para evaluar la sensibilidad de la línea LM05-E al 4-OH-tamoxifeno en presencia de B27. Se trataron a las células en presencia de medio con 1% suero fetal bovino charcolizado y estradiol  $10^{-8}$ M (control;C) o el mismo medio más 4-OH-tamoxifeno  $10^{-6}$ M (C+T). En paralelo se trató a las células en medio para mamoesferas con el agregado o no de 4-OH-tamoxifeno (B27 y B27+T). En ambos casos las células fueron sensibles al anti-estrógeno tras 5 días de tratamiento. B) Se realizó el mismo ensayo utilizando la línea celular MCF-7, obteniéndose resultados similares. Se muestra un experimento representativo de 3 \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ . C) Foto representativa de mamoesferas generadas a partir de células de la línea LM05-E. D) Foto representativa de mamoesferas generadas a partir de células de la línea MCF-7. E) Células de la línea LM05-E fueron sembradas en placas de baja adherencia y cultivadas con medio para mamoesferas junto con 4-OH-tamoxifeno  $10^{-6}$ M (C+T) o vehículo como control. No se encontraron diferencias entre los dos grupos a los 5 días de cultivo. Se muestra uno de tres experimentos realizados por triplicado. F) Se procedió de la misma manera con la línea celular MCF-7. Se encontró que aunque inicialmente no había diferencias significativas entre los grupos tratados con tamoxifeno respecto de los controles, con el pasar de los días se cuantificó un número significativamente menor de mamoesferas en los pocillos tratados con anti-estrógeno. (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

sensibilidad, estudiamos el efecto directo del 4-OH-tamoxifeno sobre la capacidad de formar mamoesferas como indicador de la presencia de una población stem. En primera instancia estudiamos si las líneas celulares eran capaces de formar mamoesferas y si esta capacidad de formarlas podía ser afectada por el tamoxifeno. Para ello, sembramos 10.000 células por pocillo en placas de baja adherencia con medio de mamoesferas adicionado o no con 4-OH-tamoxifeno  $1.10^{-6}$  M y contamos el número de colonias en suspensión formadas entre los 5 y 7 días. En la Figura 5C y 5D se muestran fotos representativas de mamoesferas generadas a partir de las líneas LM05-E y MCF-7 respectivamente. En la Figura 5D se observa que las mamoesferas de MCF-7 presentan estructuras compactas y otras huecas de acuerdo a lo reportado por otros autores [76]. La línea celular LM05-E solo dio lugar a mamoesferas compactas. Como se observa en la Figura 5E la capacidad de formar mamoesferas de la línea LM05-E no fue afectada por el tamoxifeno obteniéndose aproximadamente el mismo número de colonias en suspensión en ambos tratamientos. Con respecto a la línea celular MCF-7, se observó una reducción en el número de mamoesferas en presencia de 4-OH-tamoxifeno a los 5 o 7 días después de sembradas, resultados similares a los obtenidos por [68]. Sin embargo, cuando evaluamos la formación de mamoesferas día a día empezando a contar desde el segundo día en adelante se observó que el número de mamoesferas que se forma inicialmente es similar pero se reduce con el paso de los días, lo que podría indicar que la célula stem que da lugar a la mamoesfera no es sensible al tamoxifeno sino que las células que derivan de ella lo son (Figura 5E).

Como paso siguiente evaluamos si un pre-tratamiento con 4-OH-tamoxifeno, el cual demostramos selecciona entre un 30 y 50% del total de las células, impacta sobre la proporción de células stem. Con este objetivo se pre-trató a las células durante 5 días con 4-OH-tamoxifeno y luego se sembraron en placas de baja adherencia con medio

para mamoesferas. Al realizar el conteo de colonias en suspensión a los 5 días se observó que en la línea celular LM05-E había un aumento de aproximadamente un 30% en el número de mamoesferas formadas luego del pre-tratamiento con 4-OH-tamoxifeno con respecto al vehículo (Figura 6A). Estos resultados combinados con los de la Figura 5 evidencian que las células stem tendrían una sensibilidad menor al tamoxifeno por lo que tratamientos con este agente reducen el número de células totales pero enriquecen la proporción de la población stem, resultados similares a los observados en los experimentos *in vivo*. Con respecto a la línea celular MCF-7 obtuvimos resultados comparables (Figura 6B).

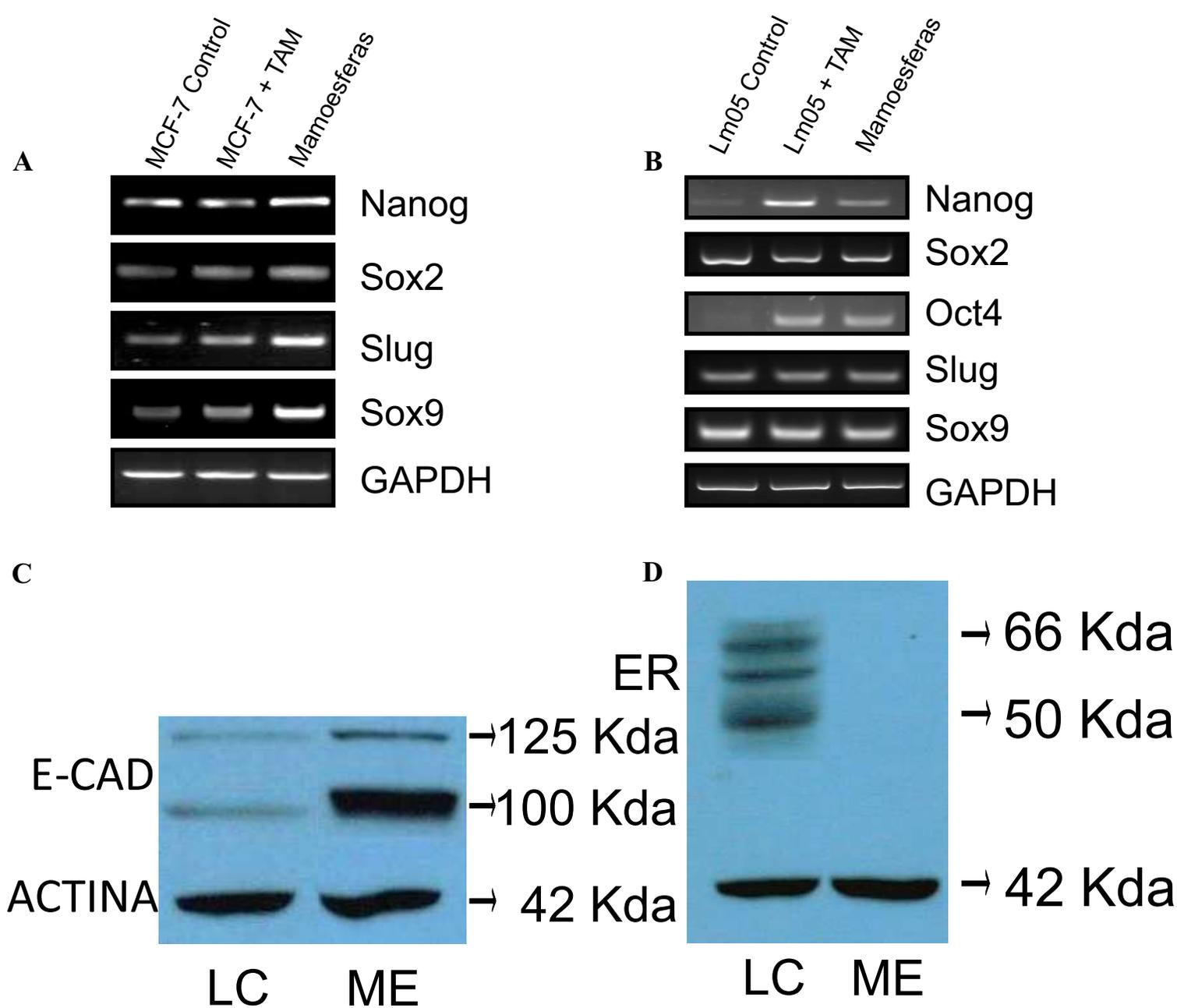
Dado que los tumores *in vivo* mantuvieron los cambios en la población stem aún en ausencia de tratamiento, como siguiente objetivo decidimos estudiar si los cambios observados en la población con propiedades stem *in vitro* también se lograban mantener en el tiempo. Con este fin, las células fueron expuestas al mismo pre-tratamiento de 5 días con 4-OH-tamoxifeno o control con la diferencia de que luego de finalizado este período, las mismas fueron mantenidas en cultivo en condiciones normales de medio DMEM/F12 con suero 10% durante un mes y recién entonces fueron contadas y sembradas en placas de baja adherencia con medio de mamoesferas. Luego de 5 días se contó el número de colonias en suspensión correspondientes a cada tratamiento. Como se observa en la Figura 6, el aumento en la población con propiedades stem perduró en el tiempo para ambas líneas celulares. Estos resultados también coinciden con lo observado *in vivo*, indicando que los cambios generados en el porcentaje de células con capacidad de formar mamoesferas como consecuencia del tratamiento con tamoxifeno son perdurables en el tiempo, aún cuando el mismo se interrumpe.



**Figura 6:** El pre-tratamiento con tamoxifeno lleva a un aumento en el número de células capaces de formar mamoesferas. Células de la línea celular LM05-E fueron tratadas durante 5 días con 4-OH-tamoxifeno  $1.10^{-6}$  M (T) o con vehículo como control y luego del tratamiento se realizó un ensayo de mamoesferas (A) o se mantuvieron un mes en ausencia de tratamiento cultivando en condiciones normales de medio más suero 10% para recién entonces ensayar su capacidad de formar mamoesferas (C). Células de la línea celular MCF-7 fueron tratadas durante 5 días con 4-OH-tamoxifeno  $1.10^{-6}$  M o vehículo como control y luego del tratamiento se realizó un ensayo de mamoesferas (B) o se mantuvieron un mes en ausencia de tratamiento cultivando en condiciones normales de medio más suero 10% para recién entonces ensayar su capacidad de formar mamoesferas (D). Para las figuras C y D, la nomenclatura "Ex" precediendo al tratamiento indica que las células recibieron ese tratamiento inicialmente y que se ensayó su capacidad de formar mamoesferas luego de un mes libre de tratamiento.

## **Estudio de la expresión de genes asociados al mantenimiento de células stem**

Como mencionamos anteriormente, las mamoesferas son colonias generadas y enriquecidas en células con propiedades stem [63]. Por esta misma razón, dado que las células stem tienen una mayor expresión de ciertos genes “pluripotenciales”, se propuso analizar esta característica en nuestro modelo. Se generaron mamoesferas tanto de las líneas MCF-7 como de la LM05-E y luego de 10 días de crecimiento las mismas fueron centrifugadas, y resuspendidas en Trizol para la extracción de su ARN. Mediante RT-PCR, se observó que las colonias obtenidas a partir de células MCF-7 mostraron un enriquecimiento leve en los genes SOX2 y NANOG y mayor en SOX9 y SLUG con respecto a la línea completa crecida sobre plástico (Figura 7A). No se observaron cambios en el gen OCT-4 (datos no mostrados). Para el caso de las mamoesferas de las células LM05-E se observó enriquecimiento en OCT4 y NANOG (Figura 7B). Como siguiente objetivo, nos propusimos estudiar si el pre-tratamiento con 4-OH-tamoxifeno, que mostramos previamente genera un aumento en la proporción de células con capacidad de generar mamoesferas en ambas líneas celulares, lleva a la modulación de genes asociados a la pluripotencialidad. Como se observa en la Figura 7 el 4-OH-tamoxifeno llevó a un aumento de los genes SOX2, SOX 9 y SLUG en MCF-7 y de OCT4 y NANOG en LM05-E. Este resultado coincide con el anterior, observándose que las células residuales están enriquecidas en expresión de genes asociados al mantenimiento de células stem. Este resultado refuerza el concepto de que el tamoxifeno lleva a un enriquecimiento en el porcentaje de células con capacidad de autorrenovación y expresión de genes pluripotenciales.



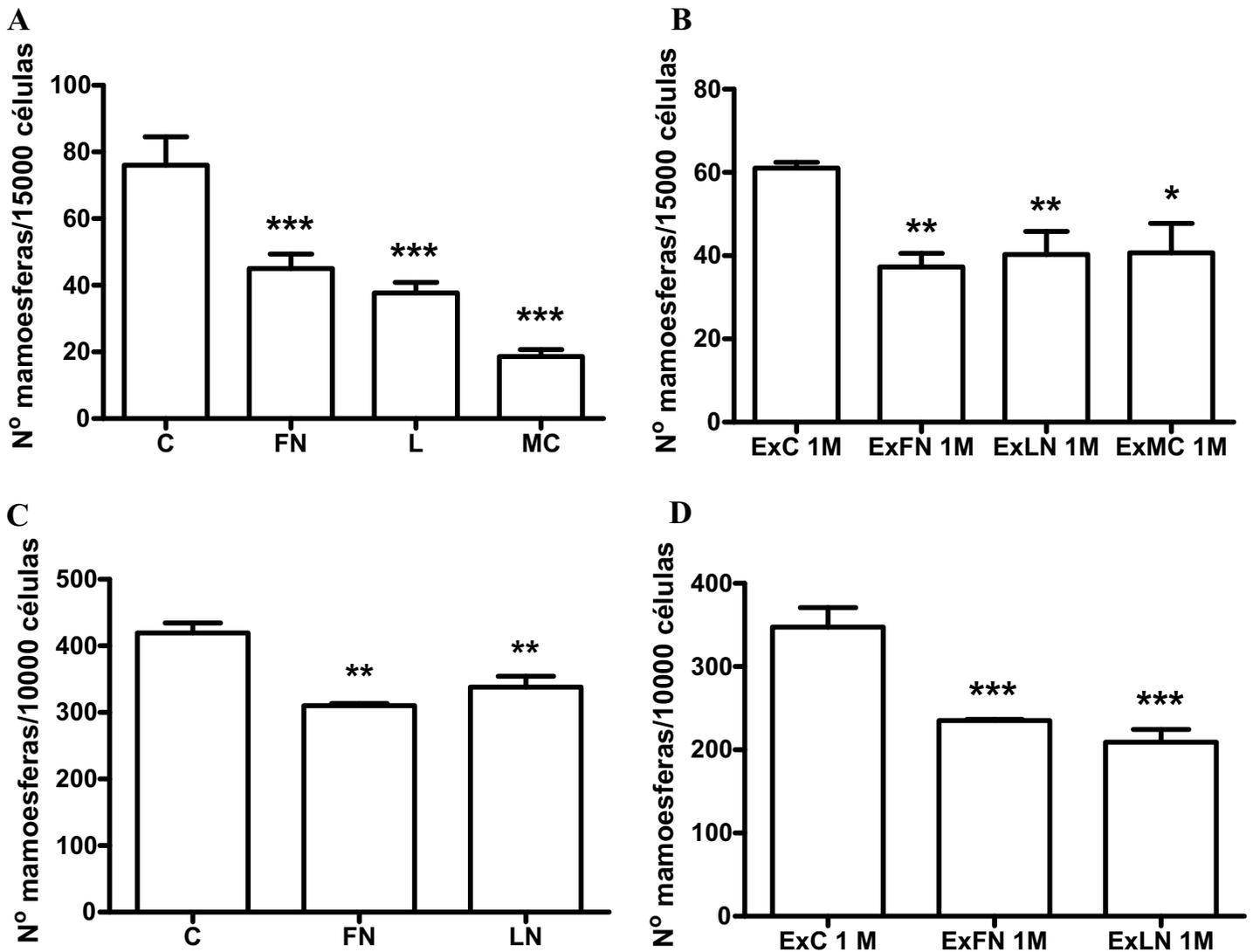
**Figura 7:** Estudio de la expresión génica y proteica de mammosferas con respecto a las líneas completas. A) RT-PCR del ARN obtenido de células de la línea MCF-7 pre-tratadas 5 días con medio DMEM/F12 suplementado con suero charcolizado al 1% y estradiol  $1.10^{-8}$  M más 4-OH-tamoxifeno  $1.10^{-6}$  M (MCF-7 +TAM) o vehículo (MCF-7 Control), o de mammosferas de esta línea celular. B) RT-PCR del ARN obtenido de células de la línea LM05-E pre-tratadas 5 días con medio DMEM/F12 suplementado con suero charcolizado al 1% y estradiol  $1.10^{-8}$  M más 4OH-tamoxifeno  $1.10^{-6}$  M (LM05-E +TAM) o vehículo (LM05-E Control), o de mammosferas. C) Western representativo comparando mammosferas (ME) contra la línea completa (LC) revelado con anticuerpo anti E-CAD mostrando dos bandas, una de 120 Kda que representa la forma completa de la proteína y un aparente subproducto de 100 Kda y su respectivo control de carga. D) Western representativo comparando mammosferas (ME) contra la línea completa (LC) revelado con anticuerpo anti receptor de estrógenos HC-20 mostrando tres bandas, de las cuales la de 66 Kda representa la forma canónica del mismo y su respectivo control de carga.

## **Estudio de la expresión diferencial de proteínas en mamoesferas del modelo MCF-7 con respecto a la línea celular completa:**

Considerando a las mamoesferas como colonias en suspensión enriquecidas en células con propiedades stem nos permite evaluar la expresión de genes y compararla con aquella de la línea celular completa. En particular, la principal proteína que nos resulta interesante estudiar es el receptor de estrógenos dado que también es blanco del tamoxifeno. Con este fin, se extrajeron proteínas de las mamoesferas de MCF-7 para evaluar la expresión del receptor de estrógenos alfa, E-Cadherina (E-CAD) y actina. En total se obtuvieron 13 juegos de mamoesferas diferentes en los cuales se observó la expresión del receptor de estrógenos y 9 en los cuales se evaluó la E-CAD. En la Figura 7 D se observa una menor expresión del receptor de estrógenos en mamoesferas generadas a partir de células de la línea MCF-7 con respecto a la línea celular completa, resultado obtenido en 11 de los 13 juegos analizados. Al evaluar la E-CAD se observó que existe una leve modulación de la forma completa de 120 KDa en algunos de los juegos de mamoesferas con diferentes días de crecimiento con respecto al control pero sin mostrar una tendencia clara (datos no mostrados). Esto resultó lógico considerando que la expresión de esta proteína puede ser modulada al tratarse de un cultivo en suspensión comparado contra un cultivo adherente. Por otro lado, fue notorio observar la aparición en 8 de los 9 juegos evaluados una banda de 100 KDa con una expresión notablemente mayor que podría representar un subproducto de la proteólisis de la E-Cadherina previamente reportado [82]. Sin embargo, se requieren más estudios para poder determinar el origen de esta proteína de 100 KDa revelada por el anticuerpo.

## **Efecto de los elementos del microambiente tumoral sobre la proporción de células con propiedades stem:**

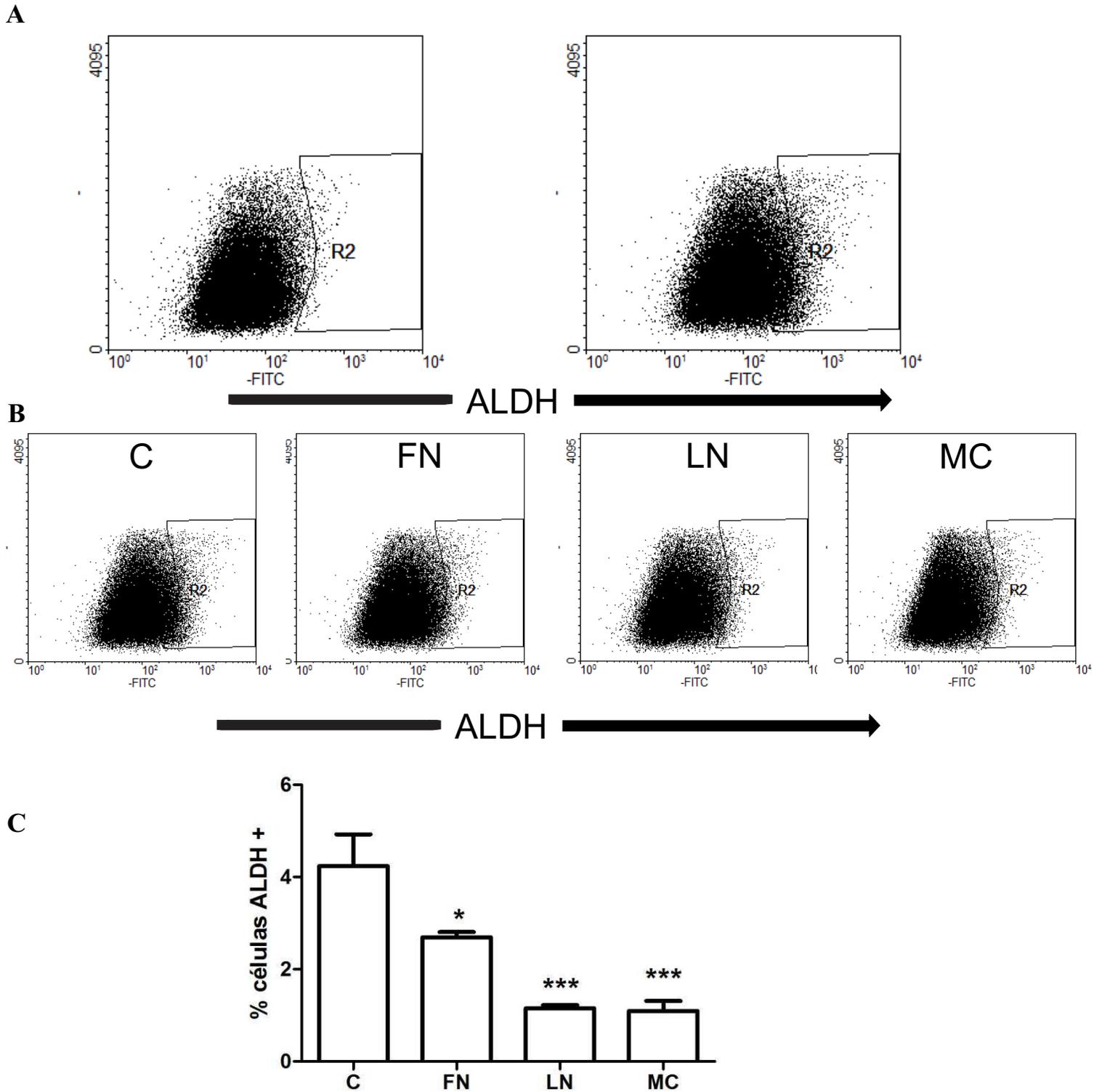
Previamente demostramos que elementos del microambiente tumoral tienen un efecto marcado sobre las propiedades de las células epiteliales. En particular observamos que la fibronectina genera resistencia al tratamiento con tamoxifeno en células de las líneas LM05-E y MCF-7 y que esta resistencia es mediada por la integrina  $\beta 1$ . De forma similar, la laminina induce resistencia pero en este caso mediante la integrina  $\alpha 6$  [33]. Por otro lado, observamos que el medio condicionado de fibroblastos de la línea LM05-F también es capaz de inducir resistencia al tamoxifeno [33]. En base a estos resultados decidimos estudiar si los elementos de matriz extracelular son capaces de modular a la población celular con propiedades stem. Con este fin, diferentes placas con células de la línea LM05-E fueron tratadas durante 48 horas con medio DMEM/F12 con suero *charcolizado* al 1% más estradiol  $1.10^{-8}$ M suplementado con fibronectina (0,01 mg/ml), laminina (2 $\mu$ g/ml) o vehículo como control. Para estudiar el efecto del medio condicionado de fibroblastos, las células fueron incubadas 48 horas en un medio compuesto de 30% DMEM/F12 y 70% de medio condicionado de fibroblastos de la línea LM05-F suplementados con suero *charcolizado* al 1% y estradiol  $1.10^{-8}$ M. Luego de este tratamiento cada placa fue lavada, tripsinizada, contada y sembrada en placas de baja adherencia con medio de mamoesferas. Luego de 5-7 días de cultivo se cuantificó la proporción de células capaces de generar mamoesferas. Como se observa en la Figura 8A, los tratamientos con fibronectina, laminina y medio condicionado, llevaron a una reducción en el porcentaje de células con propiedades stem. Similares resultados se observan al tratar células de la línea MCF-7 con fibronectina y laminina (Figura 8B).



**Figura 8:** A) Células de la línea LM05-E fueron pre-tratadas durante 48 horas con vehículo (C) fibronectina 0,01mg/ml (FN), laminina 2µg/ml (LN) o medio condicionado de fibroblastos de la línea LM05-F (MC). Luego del tratamiento fueron sembradas en placas de baja adherencia y cultivadas con medio para mamoesferas. B) Además se las mantuvo durante un mes con medio con suero 10% y luego se ensayó la capacidad de formación de mamoesferas. C) Células de la línea MCF-7 fueron pre-tratadas durante 48 horas con vehículo (C) fibronectina 0,01 mg/ml (FN) o laminina 2µg/ml (LN) y luego fueron sembradas en placas de baja adherencia y cultivadas con medio para mamoesferas (B). Se las mantuvo durante un mes con medio con suero y luego se ensayó la formación de mamoesferas (D) . (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001). Para las figuras B y D, la nomenclatura "Ex" precediendo al tratamiento indica que las células recibieron ese tratamiento inicialmente y que se ensayó su capacidad de formar mamoesferas luego de un mes libre de tratamiento.

Como siguiente objetivo nos propusimos estudiar si los cambios observados con los elementos de matriz generaban un efecto perdurable en el tiempo. Para ello, nuevos juegos de placas fueron tratados durante 48 horas con los tratamientos antes explicados y luego de finalizados los mismos, se lavaron y las células se mantuvieron en condiciones normales de DMEM/F12 con suero 10%. Luego de un mes se ensayó la capacidad de formar mamoesferas. En estos experimentos se observó que todos los tratamientos que inicialmente habían llevado a una reducción de la población con propiedades stem habían generado un efecto perdurable en el tiempo observándose una reducción de esta población en todos los casos para ambas líneas celulares (Figura 8C y 8D).

Con el fin de reforzar las observaciones anteriores, decidimos evaluar otros marcadores de células stem. Como se explicó anteriormente, se ha descrito que estas células tienen una mayor actividad de ALDH1 [40]. Por lo tanto, se propone que la evaluación del porcentaje de células que poseen alta actividad de esta enzima es un buen marcador para el estudio de poblaciones stem. Utilizamos el kit Aldefluor® de Stem Cell Technologies para evaluar el efecto del microambiente tumoral sobre células de la línea LM05-E. De forma análoga a lo realizado anteriormente, las células fueron tratadas durante 48 horas con medio condicionado de fibroblastos de la línea celular LM05-F o medio suplementado con fibonectina, laminina o vehículo como control. Luego de finalizado el tratamiento, las células se procesaron como se explica en materiales y métodos para evaluar la actividad de la aldehído deshidrogenasa por citometría de flujo. En la Figura 9A se pueden observar citometrías representativas de tratamientos control en ausencia (derecha) o presencia (izquierda) de DEAB de modo de definir la región de células positivas para alta actividad de la enzima en cuestión. En la Figura 9B se muestran de izquierda a derecha los gráficos de citometrías representativas de actividad de ALDH en



**Figura 9:** Estudio de los efectos de elementos del microambiente tumoral sobre el porcentaje de células ALDH positivas en la línea LM05-E. A) Citometrías representativas de células con tratamiento control en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) del inhibidor específico de la enzima ALDH1, DEAB. La región 2 indica las células que fueron consideradas positivas en este ensayo. B) Células de la línea LM05-E fueron pre-tratadas durante 48 horas con vehículo (C) fibronectina 0,01mg/ml (FN), laminina 2µg/ml (LN) o medio condicionado de fibroblastos de la línea LM05-F (MC) y luego del tratamiento fueron ensayadas utilizando el kit Aldefluor® de stem cell technologies de modo de determinar las población ALDH positiva. C) Cuantificación de tres experimentos independientes del porcentaje de células ALDH positivas luego de los diferentes tratamientos antes mencionados. (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001).

ausencia del inhibidor de muestras con tratamiento control, fibronectina, laminina y medio condicionado en las células LM05-E. En la Figura 9C se observa la cuantificación de 3 experimentos independientes mostrando una reducción en la población ALDH positiva para los 3 tratamientos evaluados con respecto al control. Este resultado coincide con el anterior indicando una disminución de la población de células con propiedades stem. Por otro lado, estos mismos experimentos no pudieron ser ensayados en la línea celular MCF-7 dada la baja expresión de la proteína ALDH1 que posee esta línea, incluso es considerada como un control negativo por la compañía proveedora del kit de detección.

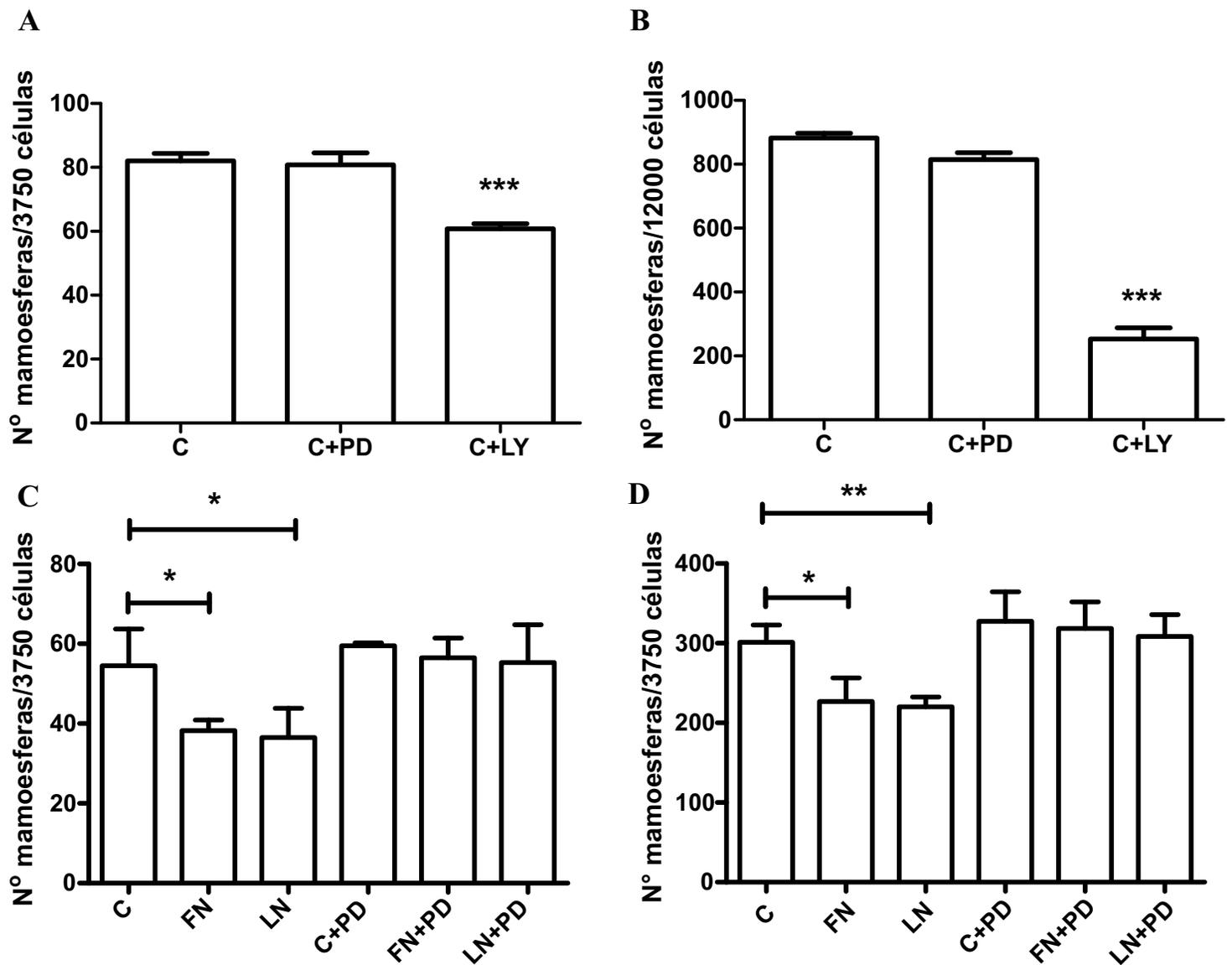
#### **Estudio de vías de señalización involucradas en el efecto generado por elementos del microambiente tumoral:**

Como observamos anteriormente los tratamientos con fibronectina y laminina llevaron a una reducción de la población con capacidad de formar mamoesferas al igual que la población positiva para alta actividad de ALDH. Como siguiente objetivo buscamos evaluar si las vías de PI3K/AKT y/o de MAPK/ERK mediaban estos efectos. Con este fin, se realizaron tratamientos análogos a los antes descritos en presencia o ausencia de los inhibidores específicos LY294002 de la vía de PI3K/AKT o PD98059 de la vía de MAPK/ERK. En resumen, se trató durante 30-60 minutos a las células con el inhibidor específico o vehículo y luego se agregó el tratamiento de 48 horas con elementos del microambiente tumoral manteniendo a los inhibidores hasta cumplido el tratamiento. Luego de finalizado este período las células fueron contadas y sembradas para ensayar su capacidad de formar mamoesferas. Como primer resultado se observó que el inhibidor de PI3K, LY294002, tiene un efecto directo sobre la capacidad de formar

mamosferas reduciendo significativamente la misma tanto en la línea celular LM05-E como en células MCF-7 (Figuras 10A y B). Este resultado es coherente con bibliografía donde demuestran que las células stem necesitan de la vía de AKT para su mantenimiento [66] y nos impide estudiar la implicancia de esta vía de señalización mediante esta metodología. La otra vía que estudiamos fue la vía de MAPK/ERK mediante el inhibidor PD98059, inhibidor de MEK. Como se observa en la Figura 10 C y D, al igual que reportamos previamente, tanto la laminina como la fibronectina llevaron a una reducción en la capacidad de formar mamosferas y este efecto fue revertido totalmente por el uso del inhibidor de MEK en ambas líneas celulares. Este resultado indicaría que estos elementos del microambiente tumoral estarían reduciendo la población con capacidad de formar mamosferas y que este efecto estaría mediado por la vía de las MAPK/ERK.

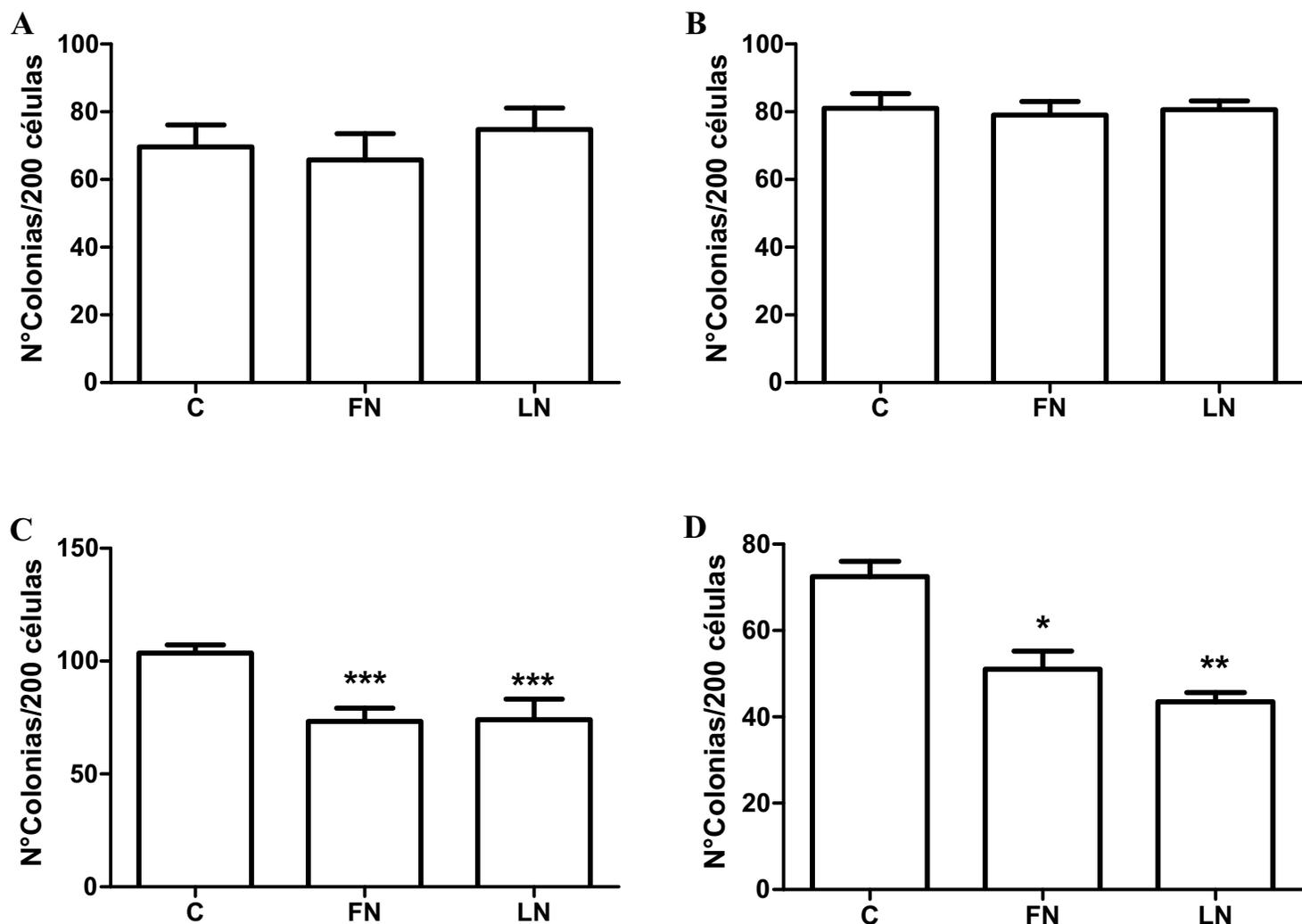
### **Estudio de los cambios en la capacidad clonogénica generados por los elementos del microambiente tumoral**

Previamente demostramos que tanto la fibronectina como la laminina son capaces de reducir el número de células con propiedades stem en los modelos celulares utilizados en este trabajo. Como siguiente objetivo, decidimos estudiar si existían cambios en la capacidad clonogénica al exponer a las células a tratamientos de 48 horas con elementos del microambiente tumoral. Los ensayos clonogénicos evalúan la capacidad que tienen las células de crecer aisladas de otras células y de componentes de matriz extracelular. En primer lugar, evaluamos el efecto de la laminina y la fibronectina sobre células adherentes de ambas líneas celulares. Con este fin, diferentes placas con células de la línea LM05-E o MCF-7 fueron tratadas durante 48 horas con medio DMEM/F12 con



**Figura 10:** Recuento de mamoesferas evaluando el efecto de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK sobre la influencia de factores microambientales. A) Células de la línea LM05-E fueron pre-tratadas o no durante 30 minutos con PD98059 10  $\mu$ M o LY294002 10  $\mu$ M y luego 48 horas con vehículo. A continuación fueron sembradas en placas de baja adherencia y cultivadas con medio para mamoesferas. B) Células de la línea MCF-7 fueron pre-tratadas o no durante 30 minutos con PD98059 10  $\mu$ M o LY294002 10  $\mu$ M y luego 48 horas con vehículo. A continuación fueron sembradas en placas de baja adherencia y cultivadas con medio para mamoesferas. C) Células de la línea LM05-E fueron pre-tratadas o no durante 30 minutos con PD98059 10  $\mu$ M y luego 48 horas con vehículo (C) fibronectina 0,01mg/ml (FN), o laminina 2 $\mu$ g/ml (LN) y entonces fueron sembradas en placas de baja adherencia y cultivadas con medio para mamoesferas. D) Células de la línea MCF-7 fueron pre-tratadas o no durante 30 minutos con PD98059 10  $\mu$ M y luego 48 horas con vehículo (C) fibronectina 0,01mg/ml (FN), o laminina 2 $\mu$ g/ml (LN) y entonces fueron sembradas en placas de baja adherencia y cultivadas con medio para mamoesferas. (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001).

siero *charcolizado* al 1% más estradiol  $1.10^{-8}$ M suplementado con fibronectina (0,01 mg/ml), laminina (2 $\mu$ g/ml) o vehículo como control. Luego de este tratamiento, las placas se lavaron y tripsinizaron, y las suspensiones de células obtenidas se contaron y sembraron en concentraciones de 200 células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio con suero 10%. Luego de una semana se contó el número de colonias de más de 8 células coloreadas con cristal violeta. Como se observa en la Figura 11 A y B no se observaron cambios como consecuencia de los tratamientos en ninguna de las líneas celulares evaluadas. Como siguiente objetivo, estudiamos si estos elementos de matriz eran capaces de modular la clonogenicidad de las células que componen las mamoesferas. Para ello, luego de 7 a 10 días de crecimiento de las mamoesferas, se midió el volumen del medio y se les agregó fibronectina o laminina de modo de obtener las mismas concentraciones antes utilizadas. Luego de 48 horas de este tratamiento las mamoesferas fueron disgregadas y se sembraron 200 células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio con suero 10% y se contó el número de colonias una semana después. Como se puede observar en la figura 11 C y D, los elementos de matriz extracelular llevaron a una reducción significativa del número de colonias que las células fueron capaces de generar a diferencia de lo observado anteriormente. Más aún, en la línea LM05-E se puede observar claramente que la capacidad clonogénica de las células provenientes de las mamoesferas es considerablemente mayor que la de la línea completa probablemente consecuencia de que las primeras están enriquecidas en células con propiedades stem y de intermediarios con mayor grado de diferenciación que estas últimas pero menor que las de la mayoría de la línea celular completa. Estos resultados, nos indican que estos elementos de matriz extracelular podrían llevar a una diferenciación de las células con propiedades stem y/o de los intermediarios presentes

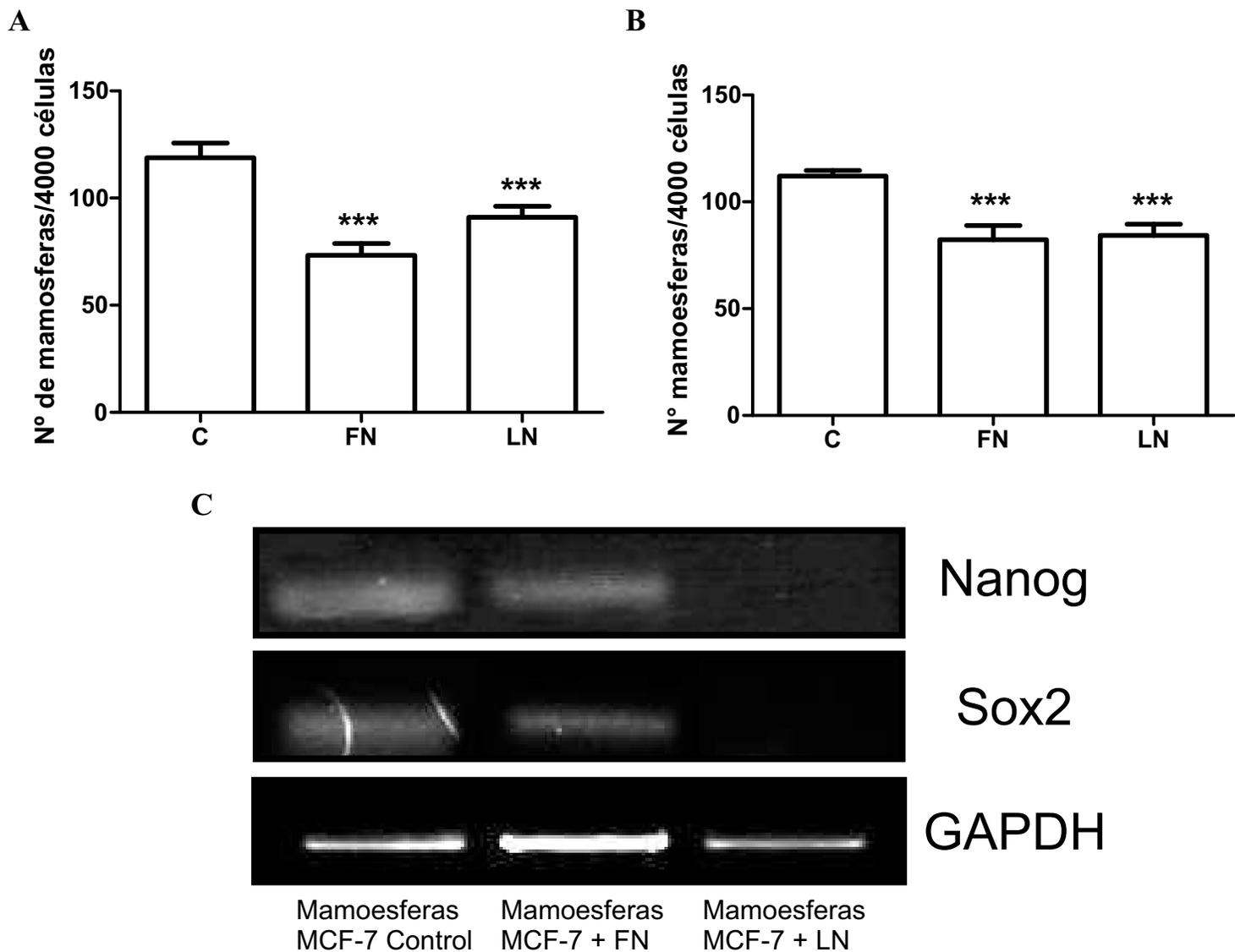


**Figura 11:** A) Células de la línea LM05-E fueron pre-tratadas durante 48 horas con vehículo (C) fibronectina 0,01mg/ml (FN) o laminina 2 $\mu$ g/ml (LN) y luego del tratamiento fueron sembradas en concentraciones de 200 células por pocillo y se las cultivó una semana con medio con suero 10%. B) Células de la línea MCF-7 fueron pre-tratadas durante 48 horas con vehículo (C), fibronectina 0,01mg/ml (FN) o laminina 2 $\mu$ g/ml (LN) y luego del tratamiento fueron sembradas en concentraciones de 200 células por pocillo y se las cultivó una semana con medio con suero 10%. C) Mamoeferas de la línea celular LM05-E fueron tratadas durante 48 horas con vehículo (C), fibronectina 0,01 mg/ml (FN) o laminina 2 $\mu$ g/ml (LN) y luego se disgregaron y se sembraron 200 células por pocillo y se las cultivo una semana con medio con suero 10%. D) Mamoeferas de la línea celular MCF-7 fueron tratadas durante 48 horas con vehículo (C), fibronectina 0,01 mg/ml (FN) o laminina 2 $\mu$ g/ml (LN) y luego se disgregaron y se sembraron 200 células por pocillo y se las cultivo una semana con medio con suero 10%. (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001). En todos los casos se muestra la media más es desvío estandar del número de colonias de más de 8 células. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

en las mamoesferas, los cuales se encuentran poco representados en las líneas celulares completas.

### **Estudio de los efectos generados en las células con propiedades stem como consecuencia del tratamiento con elementos del microambiente tumoral**

Como se observó anteriormente, la reducción en la capacidad clonogénica de las células que componen las mamoesferas luego del tratamiento con elementos de matriz extracelular podría ser una evidencia de la inducción de diferenciación ya sea de las células con propiedades stem o de los intermediarios derivados de estas. Con el fin de evaluar con más detalle este efecto, el siguiente objetivo fue determinar si estos tratamientos llevaban a una reducción en la capacidad de formar mamoesferas secundarias. Como se comentó anteriormente, la capacidad de formar mamoesferas secundarias es un indicativo de la proporción de células dentro de las mamoesferas que son capaces de formar nuevas mamoesferas, es decir, el porcentaje de células con propiedades stem dentro de las mamoesferas. Con el fin de evaluar este porcentaje, mamoesferas de 7 a 10 días de crecimiento de ambas líneas celulares fueron tratadas durante 48 horas con fibronectina o laminina. Luego del tratamiento, fueron disgregadas y se sembraron células en condiciones de formar nuevas mamoesferas para cada tratamiento. Como se observa en la figura 12 A y B, los tratamientos llevaron a una significativa reducción en la capacidad de generar mamoesferas secundarias. Estos resultados indican que se redujo considerablemente el número de células con propiedades stem en las mamoesferas, otra evidencia que indica una posible diferenciación de estas células.



**Figura 12:** A) Mamoesferas de 10 días de la línea celular LM05-E fueron tratadas durante 48 horas con vehículo (C), fibronectina 0,01 mg/ml (FN) o laminina 2 µg/ml (LN) y luego se disgregaron y se sembraron en condiciones de formar nuevas mamoesferas. B) Mamoesferas de 7 días de la línea celular MCF-7 fueron tratadas durante 48 horas con vehículo (C), fibronectina 0,01 mg/ml (FN) o laminina 2 µg/ml (LN) y luego se disgregaron y se sembraron en condiciones de formar nuevas mamoesferas. En ambos casos se muestra la media más el desvío estandar de tres experimentos independientes. C) Mamoesferas de 7 días de la línea celular MCF-7 fueron tratadas durante 48 horas con vehículo (C) fibronectina 0,01 mg/ml (FN) o laminina 2 µg/ml (LN) y luego se centrifugaron y resuspendieron en TRIzol, se extrajo su ARN y se evaluó la expresión de los genes Nanog y Sox2 mediante RT-PCR. (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001).

Finalmente, considerando las evidencias de una posible diferenciación de las células con propiedades stem y/o de intermediarios derivadas de ellas, nos propusimos estudiar si existían cambios en la expresión de genes asociados al mantenimiento de células stem. Con este fin, mamoesferas generadas a partir de células de la línea celular MCF-7 fueron tratadas durante 48 horas con elementos de matriz como se explico anteriormente. Luego del tratamiento, las mamoesferas fueron centrifugadas y resuspendidas en TRizol con el fin de extraer su ARN. A continuación se purificó el ARN, se obtuvieron los ADNc correspondientes y se amplificaron por PCR los genes Nanog y Sox2. Como se observa en la Figura 12 C, tanto el tratamiento con fibronectina como con laminina llevaron a una notable reducción en expresión de genes asociados al mantenimiento de células stem. En conjunto estos resultados son fuertes evidencias de una inducción de la diferenciación de las células con propiedades stem como consecuencia del tratamiento con elementos del microambiente tumoral.

# Discusión

La terapia endocrina incrementa en forma significativa la supervivencia de pacientes con cáncer de mama positivo para receptores hormonales. Sin embargo, las recurrencias tardías siguen siendo un problema clínico de relevancia. Entender cuáles son los mecanismos que regulan la recurrencia permitiría diseñar nuevas estrategias terapéuticas. Hay cada vez más evidencias que sugieren que tanto la persistencia tumoral como la recurrencia son atribuibles a la presencia de células con propiedades stem, siendo las mismas resistentes a las terapias convencionales. En estos trabajos se observa que a pesar de que los tumores o líneas celulares muestran una sensibilidad tanto a la radioterapia como a la quimioterapia, existirían subpoblaciones de células que tienen mayor resistencia a estos tratamientos [64, 65, 83, 84]. Además se observa que estas subpoblaciones de células representan células con propiedades stem considerándolas como posibles iniciadoras de tumores y probablemente responsables de las recurrencias observadas en pacientes. Más aún, Korkaya *et al*, describieron en un modelo de cáncer de mama el enriquecimiento en células con propiedades stem luego del tratamiento con docetaxel. Sin embargo, demostraron que estas células tenían una dependencia de la vía PI3K/AKT y por lo tanto eran sensibles a inhibidores de la misma. Estos autores observaron que la combinación de tratamientos de docetaxel más perifosina (inhibidor de AKT) en ratones con xenotransplantes de tumores mamarios logra reducir el crecimiento tumoral y que las células residuales no son stem, como sí ocurre cuando solo se trata con docetaxel [66]. En relación a esto mismo, varios autores han demostrado que una baja expresión de PTEN, que llevaría a un aumento de la activación de la vía PI3K/AKT, es signo de mal pronóstico y resistencia a la terapia [85, 86]. En coherencia con esto, nosotros demostramos que el inhibidor de PI3K, LY294002, redujo significativamente la capacidad de formar mamoesferas en los modelos LM05-E y MCF-7 (Figura 10 A y B).

En la primera parte de este trabajo hemos demostrado que el tamoxifeno lleva a una reducción del tamaño tumoral *in vivo* o del total de células *in vitro* acompañado por un enriquecimiento perdurable en células con propiedades stem (Figuras 2, 5 y 6). A pesar de la gran cantidad de estudios que relacionan los tratamientos de quimio y radioterapia con este fenómeno pocos lo han relacionado con la terapia endócrina. Un antecedente interesante en este aspecto es un trabajo que demostró que el análisis molecular de expresión génica de células residuales luego del tratamiento con quimioterapia o terapia endócrina mostraba un enriquecimiento en células con una firma similar a la obtenida al evaluar mamoesferas o células CD44+/CD24<sup>bajo</sup> [75]. Otro trabajo demostró que el estradiol aumenta el número de células con propiedades stem y, contrariamente a lo observado por nosotros, que el tamoxifeno lo disminuye [87]. En particular demuestran que el estradiol aumenta la capacidad de formar mamoesferas y que el tamoxifeno la reduce, sin embargo, las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo no son comparables con las nuestras. Esto se debe a que, con la finalidad de estudiar el efecto del estradiol en su modelo experimental, estos autores mantienen a las líneas celulares privadas de estrógenos cultivando con medio con suero *charcolizado* 10% durante el mes previo y durante la semana de tratamiento. En nuestras condiciones de trabajo el estradiol está siempre presente, incluso, el aumento en el número de mamoesferas formadas por la línea MCF-7 al tratarlas con estradiol en sus resultados es igual o menor al número de mamoesferas que nosotros obtenemos en los controles en condiciones basales. Esto indicaría que en realidad el estradiol es necesario para el mantenimiento de las células con propiedades stem y el tamoxifeno intervendría a este nivel lo que es coherente dado que todas las líneas utilizadas por estos autores, al igual que las nuestras, son dependientes de estrógenos para su crecimiento. Otros autores demostraron que el tratamiento de mamoesferas con tamoxifeno detuvo el crecimiento

de las mismas y en concentraciones más altas incluso llegó a reducir su tamaño. Sin embargo, observaron que la capacidad de autorrenovación de las mismas no se vio comprometida, sugiriendo una menor sensibilidad de células con propiedades stem al tamoxifeno y un leve aumento en la capacidad de formar mamoesferas luego de un pre-tratamiento corto con tamoxifeno [68]. Estos autores no observaron un aumento en la tumorigenicidad al inocular células pre-tratadas con tamoxifeno como hubieran esperado. En nuestros resultados si observamos que los tumores provenientes de ratones tratados con tamoxifeno mostraban un enriquecimiento en marcadores de células con propiedades stem y mayor agresividad. En particular observamos que las células residuales luego del tratamiento mostraban mayor marcación para  $\beta 1$  y  $\alpha 6$  integrinas (Figura 3), mayor capacidad de formar mamoesferas (Figura 2), un mayor porcentaje de células CD29+/CD24<sup>bajo</sup> (Figura 4) que son consideradas capaces de regenerar la glándula mamaria [79] y una mayor tasa de crecimiento al eliminar el tratamiento y permitirles crecer en ausencia del mismo. Una posible explicación de porqué estos autores no lograron observar el resultado que esperaban se deba a la metodología experimental dado que ellos utilizaron como modelo células humanas MCF-7 en ratones NUDE. Existen evidencias de que los xenotransplantes no conforman buenos modelos dada la inmunodeficiencia de los ratones que modifica las señales del microambiente [88]. En nuestro caso utilizamos el modelo M05 en ratones BALB/c, lo que nos permite estudiar la respuesta a la terapia en un contexto donde el microambiente tumoral es propio y el sistema inmune es competente, siendo por lo tanto la progresión tumoral observada clínicamente más relevante. Incluso, demostramos que los tumores que pierden su dependencia hormonal se encuentran enriquecidos en células con propiedades stem (Figura 3). Existe otro trabajo en bibliografía que aborda el efecto del estradiol sobre las células con propiedades stem. En este trabajo los autores observan

que el estradiol lleva a la diferenciación de células stem reduciendo el número de mamoesferas que las células son capaces de formar al igual que la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de células stem [69]. Estos autores también demuestran que el tratamiento con tamoxifeno a dosis bajas ( $1.10^{-7}M$ ) incrementa la capacidad de formar mamoesferas, similar a lo observado por nosotros (Figura 2, 5 y 6). Sin embargo, ellos proponen como mecanismo que el tamoxifeno desplazaría al estradiol evitando la diferenciación de las células con propiedades stem, aumentando así el número de mamoesferas que las células son capaces de formar y no una menor sensibilidad a la terapia endócrina por parte de las células stem como proponemos nosotros basándonos en nuestros resultados. Por otro lado, los mismos autores reportan que las mamoesferas tanto de las líneas celulares humanas MCF-7 como T47D presentan una mayor expresión de genes pluripotenciales relacionados al mantenimiento de células stem y que además, estos aumentan al tratar a las células con tamoxifeno [69], ambos resultados similares a los observados por nosotros en la línea celular MCF-7 (Figura 7A). Nosotros además demostramos que el tamoxifeno lleva a un aumento de la expresión de otros genes de mantenimiento como son OCT-4 y Nanog en el modelo murino LM05-E (Figura 7B).

Por otro lado, existe una gran discusión con respecto a las características de las células stem. En particular uno de los temas generalmente abordados es la expresión del receptor de estrógenos en estas células. Los tumores positivos para el receptor de estrógenos suelen ser menos agresivos que los tumores negativos para el mismo. Sin embargo, dado que las células stem suelen ser una población poco representada en los tejidos, menos diferenciada y además suelen no responder a las terapias, varios autores propusieron estudiar si estas células tenían una expresión diferencial de este receptor en tumores o líneas celulares consideradas positivas para este receptor. En primer lugar, los

autores que estudiaron a las células stem en mama normal observaron que estas células son positivas para el receptor de estrógenos ([4] y [89]), sin embargo, en células stem tumorales de tumores considerados positivos se observó que eran negativas para este receptor ([66, 90-92]). Otros proponen que existe una jerarquía de células stem, en las cuales la principal es negativa para el receptor de estrógenos y esta da lugar a una stem de jerarquía menor que es positiva para el mismo y esta se divide con mayor frecuencia y es responsable de dar lugar a progenitoras definidas que finalmente se dividen para dar lugar a las células diferenciadas del tejido [93]. Algunos autores estudiaron en líneas positivas para el receptor de estrógenos si su expresión se modula al crecer las células en forma de mamoesferas dado que estas se encuentran enriquecidas en células stem. Al igual que lo observado por nosotros en la línea celular MCF-7 (Figura 7D), estos autores observaron una menor expresión del mismo ([90] y [69]), sin embargo, observaron que el receptor residual era funcional mediante ensayos de transfección de plásmidos ERE-LUC ([69]). En concordancia con este resultado, nosotros observamos que a pesar de la menor expresión de este receptor se pudo detectar receptor fosforilado en serina 118 tanto por *western blot* como por inmunofluorescencia (datos no mostrados).

Por otro lado, nosotros estudiamos los efectos del microambiente tumoral sobre las células de las líneas células LM05-E y MCF-7 [33]. En particular demostramos que el medio condicionado de fibroblastos, al igual que la laminina y fibronectina, tienen influencia sobre la respuesta al tamoxifeno en las células epiteliales induciendo resistencia [33]. En este trabajo nos propusimos estudiar si estos elementos de matriz son capaces de modular a la población con propiedades stem. Con este fin, evaluamos si el tratamiento de ambas líneas celulares con elementos del microambiente tumoral podría modular la capacidad de formar mamoesferas y/o el porcentaje de células con alta actividad de ALDH1. Observamos que todos los elementos del microambiente

tumoral fueron capaces de reducir la capacidad de formar mamoesferas en ambos modelos celulares, y más aún, este efecto perduró en el tiempo aún en ausencia de tratamiento (Figura 8). De forma similar, observamos que los mismos tratamientos modularon de igual forma la población positiva para ALDH1 en la línea celular LM05-E (Figura 9). Estos últimos resultados no pudieron ser evaluados en la línea celular MCF-7 dado que el kit Aldefluor® utilizado no funciona adecuadamente en esta línea celular. Existen múltiples evidencias de que las células con alta actividad de ALDH1 pueden ser consideradas células stem o progenitoras [40, 66, 92], por lo tanto, este resultado y el anterior se refuerzan mutuamente indicando que los elementos del microambiente tumoral tenderían a reducir la población con propiedades stem en los modelos MCF-7 y LM05. Existen pocas evidencias en bibliografía en este aspecto. Un trabajo que aborda el efecto de elementos de matriz extracelular sobre células stem embrionales demostró que la fibronectina y el fragmento laminina-111 son necesarias para diferenciación del endodermo ([94]). En particular demuestran que estos elementos llevan a una disminución de la expresión de Nanog y su sustracción lleva a un aumento de OCT-4, y además que la mayoría de los medios definidos que inducen diferenciación llevan a que estos factores de matriz se sobreexpresen [94]. Más aún, otros autores han demostrado que la integrina  $\beta 1$ , la cual es el principal receptor de estos elementos de matriz, es necesaria para la diferenciación del endodermo ([95]). Por otro lado, también observamos que el efecto de laminina y la fibronectina relacionado a la disminución de la capacidad de formación de mamoesferas era abolido si se co-cultivaba con un inhibidor de MEK, indicando que este efecto sería mediado por la vía de señalización de las MAPK/ERK (Figura 10). En coherencia con lo observado por nosotros, se ha descrito que los factores de matriz celular se unen a las integrinas y señalizan mediante la vías de las MAPK/ERK y Rho-ROCK ([96]) y pueden regular la pluripotencialidad

([97, 98]), la proliferación ([99]) y la diferenciación ([100, 101]) en células stem embrionales. Además demostramos que estos elementos de matriz extracelular no afectaban la capacidad clonogénica al tratar a la línea celular completa pero sí afectaban la clonogenicidad de las células provenientes de las mamoesferas (Figura 11). Estos resultados se pueden explicar considerando que las mamoesferas se encuentran enriquecidas en células stem, progenitoras y otros intermediarios que se encuentran poco representados en la línea celular completa y probablemente tengan una mayor capacidad clonogénica que las células diferenciadas. Más aún, se observó claramente en la línea LM05-E que el porcentaje de células con capacidad clonogénica en las mamoesferas es considerablemente mayor que de la de la línea celular completa y que luego del tratamiento con elementos de matriz extracelular alcanza niveles similares a los de estas últimas. Por otro lado, observamos que estos mismos tratamientos llevaron a una reducción en la capacidad de formación de mamoesferas secundarias y de la expresión de genes asociados al mantenimiento de células stem (Figura 12). La reducción en el número de mamoesferas secundarias indica que los tratamientos llevaron a una menor cantidad de células con propiedades stem dentro de las mamoesferas lo cual es coherente con el segundo resultado donde se observa una menor expresión de genes necesarios para el mantenimiento de estas células. Estos resultados, en conjunto con los anteriores, podrían indicar que los elementos del microambiente tumoral fibronectina y laminina inducirían una diferenciación de células con propiedades stem en los modelos LM05-E y MCF-7. Queda por delante determinar si este efecto está relacionado con la inducción de resistencia al tamoxifeno.

## **Conclusión:**

Demostramos tanto in vivo como in vitro que el tamoxifeno, la terapia endócrina de mayor utilización en pacientes con cáncer de mama positivo para receptores hormonales, lleva a un incremento en la población celular con propiedades stem en los modelos utilizados y que además el microambiente tumoral es capaz de modular a esta población celular. Observamos que las células residuales después del tratamiento dan lugar a tumores más agresivos indicando que la interrupción de la terapia puede aumentar la probabilidad de futuras recurrencias. En coherencia con este razonamiento se observó que aproximadamente un 25% de las mujeres que recibieron un tratamiento con tamoxifeno durante 5 años tienen recurrencias dentro de los 5 y los 15 años desde el inicio del tratamiento mientras que este número baja hasta un 21% al prolongar el tratamiento a 10 años [102]. De estos resultados se desprende que es necesario evaluar la eficacia del mantenimiento de esta terapia por periodos más prolongados, estudiando en particular si existen marcadores que puedan predecir dicha eficacia. Por lo tanto, un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados permitirá adecuar el tratamiento con el fin de lograr la reducción en el número de recurrencias a largo plazo en tumores con este tipo de respuestas, lo cual es uno de los principales desafíos clínicos en el contexto de esta patología.

# Bibliografía

1. Watson, C.J. and P.A. Kreuzaler, *Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution*. Int J Dev Biol. **55**(7-9): p. 757-62.
2. Wesolowski, R. and B. Ramaswamy, *Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management*. Gene Expr, 2011. **15**(3): p. 105-15.
3. Nguyen, D.H. and P.T. Truong, *A debate on locoregional treatment of the primary tumor in patients presenting with stage IV breast cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2011. **11**(12): p. 1913-22.
4. Lalanne, C.M., et al., *[TNM classification in cancer of the breast]*. Int J Cancer, 1966. **1**(6): p. 613-22.
5. Pasqualini, J.R., et al., *Concentrations of estrone, estradiol and their sulfates, and evaluation of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma*. Int J Cancer, 1997. **70**(6): p. 639-43.
6. van Landeghem, A.A., et al., *Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue*. Cancer Res, 1985. **45**(6): p. 2900-6.
7. Yamaguchi, Y., et al., *Tumor-stromal interaction through the estrogen-signaling pathway in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4653-62.
8. Yamaguchi, Y., *Microenvironmental regulation of estrogen signals in breast cancer*. Breast Cancer, 2007. **14**(2): p. 175-81.
9. Frasor, J., et al., *Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype*. Endocrinology, 2003. **144**(10): p. 4562-74.
10. Zhou, J., et al., *Malignant breast epithelial cells stimulate aromatase expression via promoter II in human adipose fibroblasts: an epithelial-stromal interaction in breast tumors mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2328-34.
11. Welsh, J., *Induction of apoptosis in breast cancer cells in response to vitamin D and antiestrogens*. Biochem Cell Biol, 1994. **72**(11-12): p. 537-45.
12. Chen, H., et al., *Tamoxifen induces TGF-beta 1 activity and apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells in vitro*. J Cell Biochem, 1996. **61**(1): p. 9-17.
13. Jordan, C., *Historical perspective on hormonal therapy of advanced breast cancer*. Clin Ther, 2002. **24 Suppl A**: p. A3-16.

14. Dowsett, M., et al., *Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7512-7.
15. Dowsett, M., et al., *HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(23): p. 8452-8.
16. Konecny, G., et al., *Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(2): p. 142-53.
17. Wang, Z., et al., *A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9063-8.
18. Song, R.X., et al., *Role of receptor complexes in the extranuclear actions of estrogen receptor alpha in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13 Suppl 1**: p. S3-13.
19. Levin, E.R. and R.J. Pietras, *Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **108**(3): p. 351-61.
20. Wang, Z., et al., *Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(4): p. 1023-7.
21. Acconcia, F. and R. Kumar, *Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors*. Cancer Lett, 2006. **238**(1): p. 1-14.
22. Atanaskova, N., et al., *MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance*. Oncogene, 2002. **21**(25): p. 4000-8.
23. Holm, C., et al., *Phosphorylation of the oestrogen receptor alpha at serine 305 and prediction of tamoxifen resistance in breast cancer*. J Pathol, 2009. **217**(3): p. 372-9.
24. Hammes, S.R. and E.R. Levin, *Extranuclear steroid receptors: nature and actions*. Endocr Rev, 2007. **28**(7): p. 726-41.
25. Acconcia, F., et al., *S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- $\alpha$  functions*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(3): p. 878-83.
26. Pedram, A., et al., *A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22278-88.

27. Razandi, M., et al., *Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(5): p. 1633-46.
28. Kim, H.J. and D. Bar-Sagi, *Modulation of signalling by Sprouty: a developing story.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 441-50.
29. Faivre, S., G. Kroemer, and E. Raymond, *Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents.* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(8): p. 671-88.
30. Littlepage, L.E., M. Egeblad, and Z. Werb, *Coevolution of cancer and stromal cellular responses.* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 499-500.
31. Bissell, M.J. and D. Radisky, *Putting tumours in context.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 46-54.
32. Shekhar, M.P., et al., *Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression.* Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1320-6.
33. Pontiggia, O., et al., *The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through beta1 integrin.* Breast Cancer Res Treat. **133**(2): p. 459-71.
34. Seaberg, R.M. and D. van der Kooy, *Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions.* Trends Neurosci, 2003. **26**(3): p. 125-31.
35. Potten, C.S. and M. Loeffler, *Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt.* Development, 1990. **110**(4): p. 1001-20.
36. Clarke, M.F. and M. Fuller, *Stem cells and cancer: two faces of eve.* Cell, 2006. **124**(6): p. 1111-5.
37. Poulson, R., et al., *Adult stem cell plasticity.* J Pathol, 2002. **197**(4): p. 441-56.
38. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche.* Nature, 2001. **414**(6859): p. 98-104.
39. Cariati, M. and A.D. Purushotham, *Stem cells and breast cancer.* Histopathology, 2008. **52**(1): p. 99-107.
40. Ginestier, C., 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.

41. Giordano, A., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition and Stem Cell Markers in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer*. *Mol Cancer Ther.* **11**(11): p. 2526-34.
42. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 704-15.
43. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 442-54.
44. Shih, J.Y. and P.C. Yang, *The EMT regulator slug and lung carcinogenesis*. *Carcinogenesis*. **32**(9): p. 1299-304.
45. Woodward, W.A., et al., *On mammary stem cells*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 16): p. 3585-94.
46. Kordon, E.C. and G.H. Smith, *An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell*. *Development*, 1998. **125**(10): p. 1921-30.
47. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. *J Exp Med*, 1996. **183**(4): p. 1797-806.
48. Challen, G.A. and M.H. Little, *A side order of stem cells: the SP phenotype*. *Stem Cells*, 2006. **24**(1): p. 3-12.
49. Shackleton, M., et al., *Generation of a functional mammary gland from a single stem cell*. *Nature*, 2006. **439**(7072): p. 84-8.
50. Stingl, J., et al., *Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells*. *Nature*, 2006. **439**(7079): p. 993-7.
51. Liu, R., et al., *The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(3): p. 217-26.
52. Ponti, D., et al., *Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties*. *Cancer Res*, 2005. **65**(13): p. 5506-11.
53. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
54. Santisteban, M., et al., *Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2009. **69**(7): p. 2887-95.
55. Shipitsin, M., et al., *Molecular definition of breast tumor heterogeneity*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(3): p. 259-73.

56. Cohn, E., et al., *RARalpha1 control of mammary gland ductal morphogenesis and wnt1-tumorigenesis*. Breast Cancer Res. **12**(5): p. R79.
57. Stingl, J., *Detection and analysis of mammary gland stem cells*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 229-41.
58. Bhat, P.V. and H. Samaha, *Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(2): p. 195-7.
59. Chute, J.P., et al., *Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11707-12.
60. Hess, D.A., et al., *Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1648-55.
61. Armstrong, L., et al., *Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1142-51.
62. Kok, M., et al., *Mammosphere-derived gene set predicts outcome in patients with ER-positive breast cancer*. J Pathol, 2009. **218**(3): p. 316-26.
63. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
64. Phillips, T.M., W.H. McBride, and F. Pajonk, *The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(24): p. 1777-85.
65. Li, X., et al., *Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(9): p. 672-9.
66. Korkaya, H., et al., *Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling*. PLoS Biol, 2009. **7**(6): p. e1000121.
67. Croker, A.K. and A.L. Allan, *Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat. **133**(1): p. 75-87.
68. Ao, A., et al., *Response of estrogen receptor-positive breast cancer tumorspheres to antiestrogen treatments*. PLoS One. **6**(4): p. e18810.

69. Simoes, B.M., et al., *Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast*. *Breast Cancer Res Treat.* **129**(1): p. 23-35.
70. Simian, M., et al., *A spontaneous estrogen dependent, tamoxifen sensitive mouse mammary tumor: a new model system to study hormone-responsiveness in immune competent mice*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **113**(1): p. 1-8.
71. Pontiggia, O., et al., *Establishment of an in vitro estrogen-dependent mouse mammary tumor model: a new tool to understand estrogen responsiveness and development of tamoxifen resistance in the context of stromal-epithelial interactions*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **116**(2): p. 247-55.
72. Brooks, S.C., E.R. Locke, and H.D. Soule, *Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma*. *J Biol Chem*, 1973. **248**(17): p. 6251-3.
73. Lengerke, C., et al., *Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma*. *BMC Cancer.* **11**: p. 42.
74. Zhang, S., et al., *Retinol (vitamin A) maintains self-renewal of pluripotent male germline stem cells (mGSCs) from adult mouse testis*. *J Cell Biochem.* **112**(4): p. 1009-21.
75. Creighton, C.J., et al., *Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(33): p. 13820-5.
76. Cariati, M., et al., *Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(2): p. 298-304.
77. Murphy, L.C., S.V. Seekallu, and P.H. Watson, *Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation*. *Endocr Relat Cancer.* **18**(1): p. R1-14.
78. Zhang, M., et al., *Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4674-82.
79. Sleeman, K.E., et al., *Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland*. *J Cell Biol*, 2007. **176**(1): p. 19-26.
80. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
81. Lippman, M., G. Bolan, and K. Huff, *The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture*. *Cancer Res*, 1976. **36**(12): p. 4595-601.

82. Rios-Doria, J., et al., *The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 1372-9.
83. Shafee, N., et al., *Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3243-50.
84. Hambardzumyan, D., M. Squatrito, and E.C. Holland, *Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors*. Cancer Cell, 2006. **10**(6): p. 454-6.
85. Shoman, N., et al., *Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen*. Mod Pathol, 2005. **18**(2): p. 250-9.
86. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 117-27.
87. Fillmore, C.M., et al., *Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(50): p. 21737-42.
88. Rosen, J.M. and C.T. Jordan, *The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1670-3.
89. Clarke, R.B., et al., *A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells*. Dev Biol, 2005. **277**(2): p. 443-56.
90. Asselin-Labat, M.L., et al., *Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(14): p. 1011-4.
91. O'Brien, C.S., et al., *Resistance to endocrine therapy: are breast cancer stem cells the culprits?* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(1): p. 45-54.
92. Morimoto, K., et al., *Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression*. Cancer Sci, 2009. **100**(6): p. 1062-8.
93. Ponti, D., et al., *Breast cancer stem cells: an overview*. Eur J Cancer, 2006. **42**(9): p. 1219-24.
94. Taylor-Weiner, H., J.E. Schwarzbauer, and A.J. Engler, *Defined Extracellular Matrix Components are Necessary for Definitive Endoderm Induction*. Stem Cells.

95. Liu, J., et al., *Integrins are required for the differentiation of visceral endoderm*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 233-42.
96. Prowse, A.B., et al., *Stem cell integrins: implications for ex-vivo culture and cellular therapies*. Stem Cell Res. **6**(1): p. 1-12.
97. Hunt, G.C., P. Singh, and J.E. Schwarzbauer, *Endogenous production of fibronectin is required for self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells*. Exp Cell Res. **318**(15): p. 1820-31.
98. Domogatskaya, A., et al., *Laminin-511 but not -332, -111, or -411 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro*. Stem Cells, 2008. **26**(11): p. 2800-9.
99. Hayashi, Y., et al., *Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal*. Stem Cells, 2007. **25**(12): p. 3005-15.
100. Flaim, C.J., S. Chien, and S.N. Bhatia, *An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation*. Nat Methods, 2005. **2**(2): p. 119-25.
101. Brafman, D.A., et al., *Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions*. Cell Death Differ. **20**(3): p. 369-81.
102. Davies, C., et al., *Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial*. Lancet. **381**(9869): p. 805-16.