

Tesis Doctoral

Rol de la vía PI3K/AKT/mTOR en la progresión del cáncer de mama

Riggio, Marina

2016-04-12

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

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

Cita tipo APA:

Riggio, Marina. (2016-04-12). Rol de la vía PI3K/AKT/mTOR en la progresión del cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Riggio, Marina. "Rol de la vía PI3K/AKT/mTOR en la progresión del cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-04-12.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**“Rol de la vía PI3K/AKT/mTOR en la
progresión del cáncer de mama”**

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

Marina Riggio

Director: Dra. Virginia Novaro

Consejero de Estudios: Dra. Anabella Srebrow

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET).

Buenos Aires, 2016

Fecha de defensa: 12-4-2016

“Rol de la vía PI3K/AKT/mTOR en la progresión del cáncer de mama”

Antecedentes: El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en mujeres y una de las primeras causas de muerte por cáncer en el mundo. A pesar de los avances en el diagnóstico y en el tratamiento para esta enfermedad, un alto porcentaje de los tumores progresan y metastatizan en órganos distantes. PI3K/AKT/mTOR es la vía mutada con mayor frecuencia en tumores sólidos; alrededor del 70% de los tumores de mama presentan alguna mutación en esta vía, lo cual se asocia con un peor pronóstico y resistencia a la terapia endócrina, contra HER-2, radio y quimioterapia. Existen tres isoformas para Akt: AKT1, AKT2 y AKT3, con discrepancias sobre sus funciones específicas. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol diferencial de AKT1 y AKT2 en los procesos de proliferación, migración e invasión celular a lo largo de la progresión tumoral en cáncer de mama. **Antecedentes:** En trabajos previos del laboratorio utilizando un modelo de carcinomas mamarios murinos habíamos demostrado que la sobreactivación de la isoforma AKT1 era capaz de inducir el crecimiento tumoral hormono-independiente. Los tumores generados resultaron ser más diferenciados que los tumores de los que derivaron, con formación de estructuras ductales y mayor expresión de citoqueratina 8 y laminina I, y menor expresión de citoqueratina 14. **Metodología:** Para extrapolar los resultados obtenidos en otros modelos experimentales, utilizamos tres líneas celulares humanas de cáncer de mama (IBH-7, IBH-6 y T47D), analizamos el efecto de sobreactivar o silenciar específicamente cada isoforma sobre el fenotipo tumoral en cultivo y en xenotransplantes. **Resultados:** En las líneas celulares IBH-7 e IBH-6 demostramos que AKT1 induce el crecimiento de tumores mamarios, a través de la activación de la proteína ribosomal S6 y el aumento en la expresión de ciclina D1. Además, la sobreactivación de AKT1 induce el crecimiento tumoral hormono-independiente a través de la fosforilación de receptores hormonales en ausencia de agergado exógeno de hormona. En consecuencia, la sobreactivación de AKT1 fue capaz de inducir resistencia al tratamiento con ICI182780 (Fulvestrant), un

antagonista del receptor de estrógenos. Coincidente con los antecedentes mencionados, el fenotipo tumoral obtenido con la sobreactivación de AKT1 es de tipo glandular diferenciado, con aumento en la expresión de las proteínas luminales E-cadherina y laminina-I. Sorprendentemente, el silenciamiento de AKT1 endógeno disminuyó la proliferación e incrementó la migración e invasión celular *in vitro* a través de la inducción del eje β 1-integrina/FAK/MMP9, e *in vivo*, siendo los tumores resultantes altamente infiltrantes. Por otro lado, la sobreactivación de AKT2 también indujo tumores con características infiltrantes pero sin modificar el crecimiento tumoral. Por el contrario, el silenciamiento de AKT2 endógeno disminuyó la motilidad celular en cultivo, regulando proteínas del citoesqueleto como F-actina y vimentina. El grado de invasión de los xenotransplantes IBH-6 y T47D con distintos niveles de AKT1 y AKT2 se asoció con la pérdida en la expresión de E-cadherina y un aumento en la expresión de vimentina, marcadores de progresión tumoral. Encontramos además que el silenciamiento de AKT1 induce un aumento en la expresión de AKT2 endógeno, sugiriendo una regulación entre isoformas. Por último, en un ensayo preliminar encontramos que el tratamiento con inhibidores de PI3K/AKT/mTOR si bien disminuye el crecimiento tumoral, aumenta la incidencia de metástasis pulmonares. Este resultado puede ser relevante en el diseño de terapias con inhibidores específicos de dicha vía. En conjunto, nuestros resultados muestran funciones diferentes, y en algunos casos opuestas, para AKT1 y AKT2 en la progresión del cáncer de mama. Demostramos que AKT1 tiene un rol relevante en el crecimiento tumoral, regulando proteínas involucradas en la supervivencia y proliferación celular y activando en forma ligando-independiente los receptores hormonales, esto último conlleva a la adquisición de resistencia a la terapia endócrina. En un estadio tumoral más avanzado, tanto la disminución de AKT1 a través de la activación del eje β 1-integrina/FAK/MMP9, como el aumento de AKT2 a través de la regulación del citoesqueleto de actina, llevarían a una mayor agresividad tumoral dada por un aumento de la invasión celular. **Conclusión:** En base a nuestros resultados, proponemos que tanto la pérdida de AKT1 como la ganancia de AKT2 podrían ser consideradas como biomarcadores para clasificar a los tumores mamarios con características más agresivas.

La relevancia de nuestro trabajo radica en el análisis exhaustivo de la función de la vía PI3K/AKT/mTOR, diferenciando el rol particular de AKT1 y AKT2 y de sus proteínas *target downstream*, que a futuro podría aplicarse en el diseño de terapias dirigidas a cada tipo y estadio tumoral para lograr un mayor efecto terapéutico.

Palabras clave: Cáncer de mama, PI3K/AKT/mTOR, hormono-independencia, progresión tumoral, receptores hormonales, invasión celular.

“Role of PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer tumor progression”

Background: Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death among females worldwide. Despite the early diagnosis and the improvement in the treatments, a considerable amount of tumors progress and metastasize. PI3K/AKT/mTOR is the most frequently mutated pathway in solid tumors; approximately 70% of breast tumors display an activating mutation in one component of the pathway, and it is associated with a poor outcome and resistance to conventional therapy. There are three AKT isoforms: AKT1, AKT2 and AKT3, with different specific functions. **Specific aims:** The main aim of this thesis was to study the specific role of AKT1 and AKT2 during proliferation, cell migration and invasion through breast cancer progression. **Background:** We have previously demonstrated that AKT1 overactivation was sufficient to induce hormone-independent breast tumor growth. The resultant tumors were differentiated, with high levels of cytokeratin 8 and laminin-I and low levels of cytokeratin 14 expression. **Methodology:** In this study, we used three human breast cancer cell lines, IBH-7, IBH-6 and T47D and we analyzed the effect of up- or downregulation of AKT1 or AKT2 on tumor phenotype, in culture and in xenografts. **Results:** We demonstrated that AKT1 induced tumor growth through ribosomal S6 protein and cyclin D1 increase. Moreover, AKT1 upregulation lead to hormone-receptors activation, even in the absence of exogenous hormone supply. Consequently, AKT1 overexpression induced resistance to the estrogen receptor downregulator, ICI182780 (Fulvestrant). Moreover, AKT1 overexpressing tumors displayed glandular differentiation, with high levels of E-cadherin and laminin-I. AKT1 silencing decreased cell proliferation and, surprisingly, increased cell migration and invasion in cell culture, through the β 1-integrin/FAK/MMP9 axe. Besides, silenced AKT1 tumors were highly invasive of the adjacent adipose and muscle tissue, and induced lung metastasis. On the other hand, AKT2 overactivation also induced more invasive tumors and lung metastasis, with no changes in tumor growth although. On the opposite, AKT2 downregulation decreased motility in cell culture, by regulating

cytoskeleton proteins as F-actin and vimentin. We also found that AKT1 silencing induced an upregulation in AKT2 expression, suggesting a cross regulation between the two isoforms. Finally, in a preliminary study we found that PI3K/AKT/mTOR inhibitors are capable of decreasing breast tumor size but of inducing more aggressive tumors and lung metastasis. This effect could have great implications in the management of new targeted therapies against the pathway. Altogether, our results clearly show different, and in some cases opposite roles for AKT1 and AKT2 isoforms in breast cancer progression. We demonstrated that AKT1 has a relevant role in tumor growth, through the regulation of proteins involved in cell survival and proliferation, and through the activation of hormone receptors, ultimately leading to endocrine resistance. On the other hand, the downregulation of AKT1, as well as the upregulation of AKT2, can increase cell invasion and tumor aggressiveness. **Conclusion:** We propose that AKT1 loss and/or AKT2 gain should be considered as biomarkers to better classify invasive mammary tumors. The relevance of this work is the deep analyses of PI3K/AKT/mTOR pathway, differentiating AKT1 and AKT2 functions, and its downstream proteins in breast cancer progression, which could be useful in the future to design targeted therapies for each tumor type and stage.

Key words: Breast cancer, PI3K/AKT/mTOR, hormone-independence, tumor progression, hormone receptors, cell invasion.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mi directora de tesis, Virginia Novaro, que me eligió para este proyecto en el año 2008, y me enseñó todo, desde el trabajo de mesada, hasta a buscar trabajos en PubMed. Pero principalmente me enseñó a pensar como científico y me transmitió el entusiasmo y la pasión por esta carrera. Gracias por confiar en mí y darme la libertad para diseñar mis experimentos sin dejar de guiarme.

Agradezco a Claudia Lanari, que me abrió las puertas de su laboratorio y me permitió aprender y desarrollarme profesionalmente. Gracias también por la confianza depositada en mí para continuar el trabajo de Viqui.

Agradezco a los organismos que hicieron posible que realizara mi trabajo doctoral: ANPCyT, CONICET, INC, Fundación Fiorini y Fundación Roemmers.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio, Lauril, Colo, Ani, Tomi, Pipi, MGoros, Viqui, Seba, Clara, Eme, Caro, Vic, Pao, Ceci, Michelle, Jime, Sol, Andrés, Aye y Virgi, que hacen que el laboratorio haya sido mi hogar todos estos años.

Gracias a mi familia por apoyar la carrera que elegí y alentarme en todo momento, aunque a veces no entienden muy bien lo que hago.

Por último, agradezco a Gusti, mi gran compañero, que me banca en todo, me escucha y siempre tiene las palabras adecuadas para hacerme sentir bien. Gracias por compartir la vida conmigo.

| | |
|--|-----------|
| Indice | |
| Abreviaturas | 11 |
| Introducción | 14 |
| Glándula mamaria y hormonas sexuales | 15 |
| Cáncer de mama y terapia endócrina | 17 |
| Progresión tumoral y metástasis | 19 |
| Clasificación tumoral en cáncer de mama | 21 |
| Biomarcadores aceptados y en estudio para la clínica | 23 |
| PI3K/AKT/mTOR en cáncer de mama | 24 |
| Rapamicina y "Rapalogs" | 26 |
| Inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en la terapia antitumoral | 26 |
| Isoformas de AKT y progresión tumoral | 28 |
| Adhesión celular y arquitectura del tejido epitelial | 30 |
| E-cadherina y β 1-integrina en la progresión tumoral | 33 |
| Antecedentes de nuestro grupo | 35 |
| Objetivos | 37 |
| Objetivo general | 38 |
| Objetivos específicos | 38 |
| Materiales y Métodos | 39 |
| LÍNEAS CELULARES | 40 |
| ENSAYOS IN VITRO | 40 |
| Mantenimiento de las líneas celulares | 40 |
| Cultivo en 3 dimensiones (3D) | 40 |
| Transfección de líneas celulares | 40 |
| Infección de líneas celulares | 42 |
| Ensayo de crecimiento celular en suspensión (mamosferas) | 42 |
| Tratamiento de cultivos celulares con inhibidores endócrinos y de quinasas | 43 |
| Ensayo de proliferación por conteo celular | 43 |

| | |
|---|-----------|
| Ensayo de migración celular por cierre de herida | 43 |
| Ensayo de invasión celular | 44 |
| Extractos proteicos y western blot (WB) | 44 |
| Inmunofluorescencia (IF) | 45 |
| Cultivos en 2D | 45 |
| Cultivos en 3D | 46 |
| ENSAYOS IN VIVO | 46 |
| Animales | 46 |
| Generación de tumores | 47 |
| Línea celular IBH-7 | 47 |
| Línea celular IBH-6 | 47 |
| Línea celular T47D | 48 |
| Tratamiento con inhibidores endócrinos y de quinasas en animales | 48 |
| Extractos proteicos totales a partir de muestras de tumores para analizar por WB | 48 |
| Inmunohistoquímica (IHQ) | 49 |
| Conteo de mitosis y apoptosis | 49 |
| Evaluación de focos metastásicos | 50 |
| Análisis estadístico | 50 |
| Anticuerpos | 51 |
| Resultados | 54 |
| CAPÍTULO I | 55 |
| Efectos de la sobreactivación de AKT1 sobre el crecimiento tumoral y la hormono-independencia en líneas celulares de cáncer de mama humano. | 55 |
| Línea celular IBH-7 | 55 |
| Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la capacidad tumorigénica de la línea IBH-7. | 58 |
| Línea celular IBH-6 | 60 |
| Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la capacidad tumorigénica de la línea IBH-6. | 63 |

| | |
|---|------------|
| Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la sensibilidad endócrina de la línea IBH-6. | 66 |
| Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la histología de xenotranplantes de la línea IBH-6. | 70 |
| CAPÍTULO II | 75 |
| Rol de AKT1 y AKT2 en la migración e invasión celular durante la progresión tumoral. | 75 |
| Efectos en cultivo celular | 75 |
| AKT1 y AKT2 tienen roles opuestos en la regulación de la migración e invasión celular. | 86 |
| Efecto de AKT1 y AKT2 en el fenotipo tumoral de xenotransplantes | 91 |
| Línea celular IBH-6 | 91 |
| Línea celular T47D | 94 |
| Implicancia de discriminar las isoformas AKT1 y AKT2 | 98 |
| Conclusiones | 100 |
| Discusión | 103 |
| Isoformas de AKT y resistencia endócrina | 104 |
| Isoformas de AKT y regulación de proteínas downstream involucradas en invasión tumoral | 105 |
| Referencias | 111 |

Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| AB | <i>Alcian Blue</i> |
| AJ | <i>Adherent Junctions</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| DAB | 3-3´diaminobencidina |
| DCIS | Carcinoma ductal in situ |
| E ₂ | Estradiol |
| eIF4E | <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i> |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| EMT | Transición epitelio mesenquimal |
| ER | Receptor de estrógenos |
| FA | <i>Focal adhesions</i> |
| FAK | <i>Focal Adhesion Kinase</i> |
| FDA | <i>Food and drug administration</i> |
| FTIC | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| CK | Citoqueratina |
| GLUT4 | Transportador de glucosa tipo 4 |
| GSK3 β | <i>Glycogen synthase kinase 3β</i> |
| HD | Hormono-dependiente |
| HER2 | Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano |
| HI | Hormono-independiente |
| IBC | Carcinoma ductal invasivo |
| ICI | ICI182780 o Fulvestrant |
| IF | Inmunofluorescencia |
| IGF-1 | Factor de crecimiento insulínico tipo 1 |
| IHQ | Inmunohistoquímica |
| ILK | <i>Integrin-linked kinase</i> |

| | |
|-------|--|
| Ip | Intraperitoneal |
| IP | Ioduro de propidio |
| IRS-1 | <i>Insuline receptor substrate-1</i> |
| LTR | <i>Long terminal repeat</i> |
| MAPK | Proteínas quinasas activadas por mitógeno |
| MDSC | <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> |
| MMP2 | Metaloproteasa 2 |
| MMP9 | Metaloproteasa 9 |
| MPA | Acetato de Medroxiprogesterona |
| mTOR | <i>mammalian Target of Rapamycin</i> |
| NFAT | <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> |
| NSG | NOD/LtSz-scid/IL- 2Rgamma null |
| PAS | <i>Periodic Acid Schiff</i> |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PK1 | <i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i> |
| PFA | Paraformaldehído |
| PGK | Fosfoglicerato kinasa |
| PH | <i>Plecstrin homology</i> |
| PI3K | Fosfatidil inositol 3 quinasa |
| PIP3 | Fosfatidil inositol 3,4,5 tri-fosfato |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PR | Receptor de progesterona |
| PTEN | <i>Phosphatase and tensin homolog</i> |
| Rb | Retinoblastoma |
| RTKs | Receptores de tirosina quinasa |
| Sc | Subcutáneo |
| SFB | Suero fetal bovino |
| TAM | <i>Tumor associated macrophages</i> |
| TJ | <i>Tight Junctions</i> |

| | |
|-------|-------------------------------------|
| TRITC | <i>Tetramethylrhodamine</i> |
| TSC2 | <i>tuberous Sclerosis Complex 2</i> |
| WB | Western blot |

Introducción

Glándula mamaria y hormonas sexuales

La glándula mamaria consta de dos componentes anatómicos fundamentales: los acinos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche, y los ductos, conjunto de estructuras ramificadas, tubulares y huecas, cuyo lumen confluye progresivamente en canalículos cada vez más gruesos hasta terminar en los conductos galactóforos, inmediatamente por detrás del pezón. Los acinos están compuestos por células epiteliales rodeadas de mioepitelio y membrana basal. La membrana basal es un subtipo de matriz extracelular que rodea a las células epiteliales, formada principalmente de laminina I, colágeno IV, nidógeno y proteoglicanos del tipo heparán sulfato y es la responsable del sostén y mantenimiento de la estructura funcional del órgano. Las células epiteliales tienen la función de sintetizar las proteínas de la leche y las células mioepiteliales de favorecer la liberación de la leche hacia la luz y por el ducto. Esta estructura única que presenta la glándula mamaria, junto con el microambiente tisular que la rodea, juegan un papel esencial durante el desarrollo, la diferenciación y el normal funcionamiento de la mama (Fig. 1A) (Nelson and Bissell 2006). La interacción entre las células epiteliales y la matriz extracelular también es crítica para el desarrollo, la diferenciación y la función normal de la mama. Por ejemplo, las células mioepiteliales secretan laminina-I para formar la membrana basal dirigiendo la polarización de las células epiteliales y regulando la morfogénesis de los ductos (Adriance et al. 2005). La desregulación de la interacción entre las células epiteliales y del epitelio con la-matriz extracelular genera una ruptura en la arquitectura normal de la mama y puede llevar a la disfunción y a la progresión tumoral (Fig. 1B).

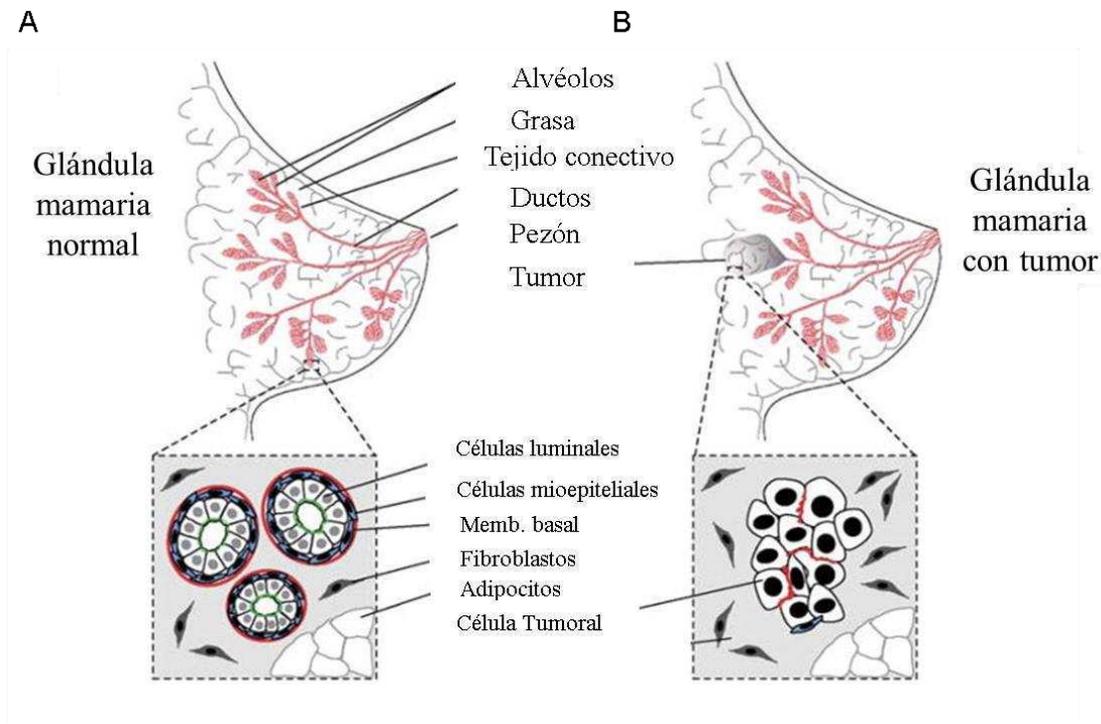


Fig. 1: Esquema de la glándula mamaria A) Normal o B) Tumoral. Adaptado de Nelson and Bissell, 2005.

La glándula mamaria es un tejido hormono-dependiente, que comienza a desarrollarse durante la embriogénesis, y continúa su desarrollo y diferenciación durante la preñez y la lactancia, en respuesta a las hormonas sexuales estrógeno y progesterona, secretadas por los ovarios.

En la glándula mamaria normal, el rol de los estrógenos a través de su receptor (ER) se asocia con la proliferación epitelial durante el ciclo menstrual y la ramificación de los conductos mamarios durante la preñez. Su participación es esencial en la patogénesis del cáncer de mama, existiendo evidencias clínicas que muestran la relación entre los estrógenos y diversos factores epidemiológicos de riesgo asociados a esta enfermedad (Kelsey et al. 1993).

La progesterona por su parte, promueve el desarrollo glandular de la mama en la pubertad y favorece la diferenciación alveolar durante la preñez (Obr and Edwards 2012). A diferencia de los estrógenos el rol de la progesterona en el cáncer de mama es más

controvertido. Sin embargo, numerosos trabajos asocian a la progesterona y otros progestágenos, a través de su receptor (PR), con un aumento de la carcinogénesis mamaria (Kordon et al. 1993) (Nagasawa et al. 1988) (Lydon et al. 1999) (Conneely et al. 2003) (Daniel et al. 2011) (Knutson et al. 2012).

Cáncer de mama y terapia endócrina

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres en el mundo y la segunda causa de muerte por cáncer, después del de pulmón. Se estima que durante el 2016 en Estados Unidos el cáncer de mama habrá llegado al 29% del total de nuevos casos diagnosticados, y al 15% del total de muertes por cáncer (Siegel et al. 2016). Argentina es un país con incidencia media alta de cáncer (217 nuevos casos en ambos sexos por año cada 100.000 habitantes, Fig. 2A). En nuestro país, el cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia en mujeres. Se estima que se producirán 18.000 nuevos casos por año (70 casos por cada 100.000 mujeres, Fig. 2B), que representan casi un 18% del total de casos de cáncer diagnosticados y 36% del total de casos de cáncer diagnosticados en mujeres. Además, Argentina, luego de Uruguay, es el país de América con mayor tasa de mortalidad por cáncer de mama, con 19,9 defunciones cada 100.000 mujeres (<http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/cancer-de-mama> 2015).

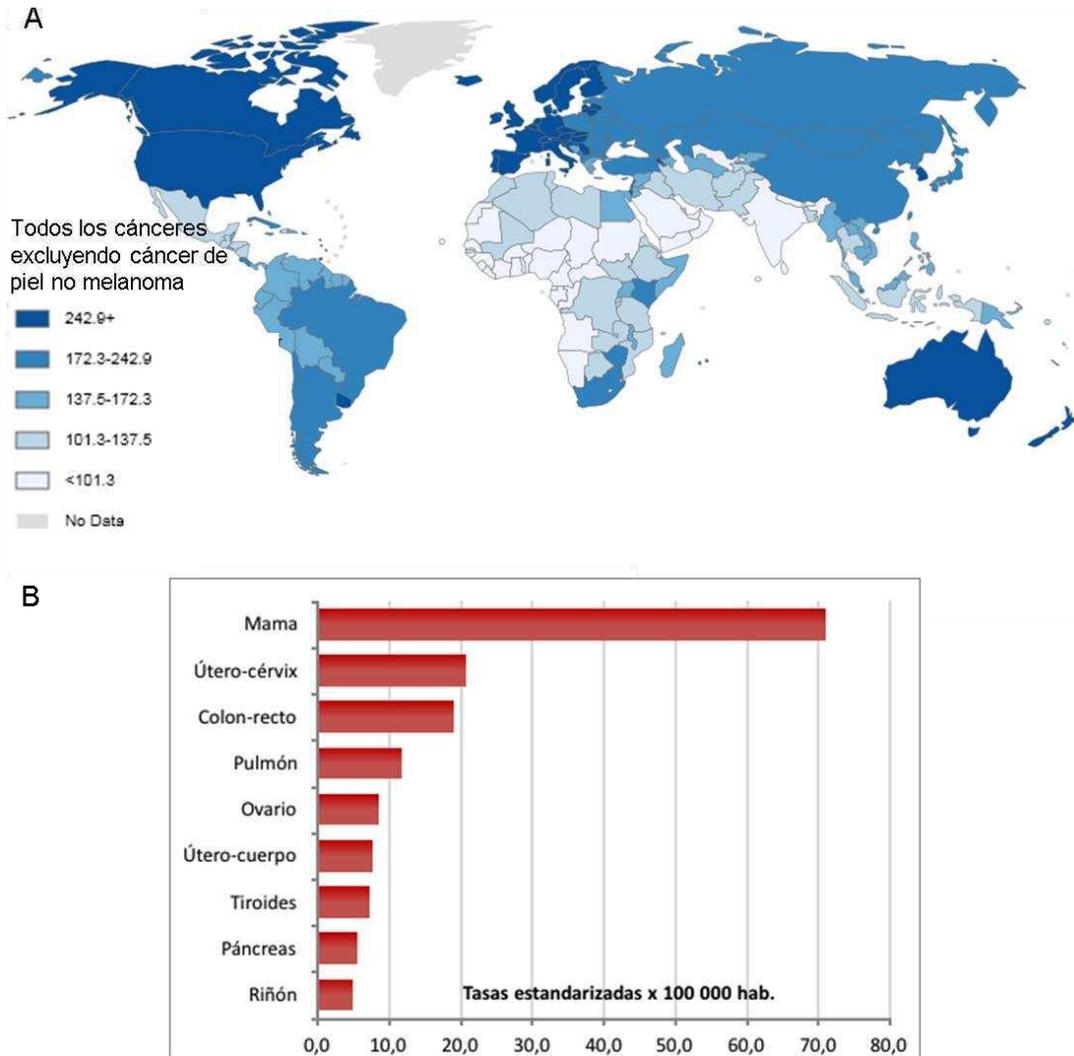


Fig. 2: Estadísticas de cáncer. A) Incidencia de cáncer a nivel mundial en el año 2012. B) Tasas estimadas de cáncer en mujeres en Argentina. Información elaborada por SIVER/INC en enero de 2014, en base a los datos de Globocan 2012.

Alrededor del 75% de los carcinomas mamarios expresan receptores hormonales ER alfa ($ER\alpha$) y PR y son por lo tanto susceptibles al tratamiento endócrino. La terapia endócrina dirigida a inhibir la síntesis de estradiol (E_2 , ej. inhibidores de aromataza) o a bloquear la señalización a través del ER (ej. Tamoxifeno, Fulvestrant) es la más utilizada como tratamiento para dicho tipo de carcinomas. Pese a que la efectividad de la terapia antiestrogénica es elevada, un alto porcentaje de tumores malignos ER y PR positivos son insensibles a la terapia desde un inicio (*resistencia de novo*), o desarrollan resistencia a

la misma luego del tratamiento (resistencia adquirida) y subsecuentemente hay recurrencia de la enfermedad. Entender los mecanismos de resistencia endócrina es uno de los grandes desafíos que se plantean en la lucha contra el cáncer de mama. Es por ello que en los últimos años se ha avanzado en la búsqueda de terapias combinadas entre distintos agentes endócrinos, o con inhibidores de distintas vías de señalización intracelular para evadir la resistencia endócrina.

Si bien los antiprogéstágenos no son utilizados ampliamente para el tratamiento del cáncer de mama, numerosas publicaciones avalan el rol de la progesterona en la patogénesis mamaria. Trabajos previos de otros y de nuestro grupo avalan considerar al PR como un blanco terapéutico adyuvante al de los agentes antiestrogénicos para el cáncer de mama, revisado en (Lanari et al. 2012).

Progresión tumoral y metástasis

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la mayor parte de las muertes por cáncer se deben a la aparición de metástasis: células que se desprenden del tumor primario y colonizan órganos distantes. El término "progresión tumoral" describe el proceso por el cual un tumor incrementa su agresividad y, en algunos casos adquiere la capacidad de metastatizar en órganos distantes (Chambers et al. 2002) (Gupta and Massague 2006). A pesar de estudiarse desde hace décadas, los mecanismos que conducen a la progresión tumoral aún no está bien descripto. El establecimiento de un foco metastásico requiere de una serie de pasos secuenciales e interconectados. Como mencionamos más arriba, primero se desregula la interacción entre las células epiteliales y del epitelio con la matriz, produciendo la ruptura en la arquitectura normal de la mama (Fig. 1B). El crecimiento inicial del tumor primario es progresivo y los nutrientes ingresan en forma pasiva. Cuando la masa tumoral alcanza un tamaño de entre 1-2 mm de diámetro, secreta señales angiogénicas que inducen la vascularización del tumor. Luego, el proceso de invasión del estroma tumoral se produce por diferentes mecanismos (ver más adelante) hasta alcanzar un vaso sanguíneo o linfático e ingresar a la circulación, donde la mayoría de las células tumorales son destruidas. Las que sobreviven llegan a los

capilares y se adhieren a las células endoteliales de órganos distantes. Allí se extravasan, probablemente por mecanismos similares a los de intravasación, y se establecen en nichos metastásicos propicios completando el proceso metastásico (Fig. 3) (Fidler 2003).

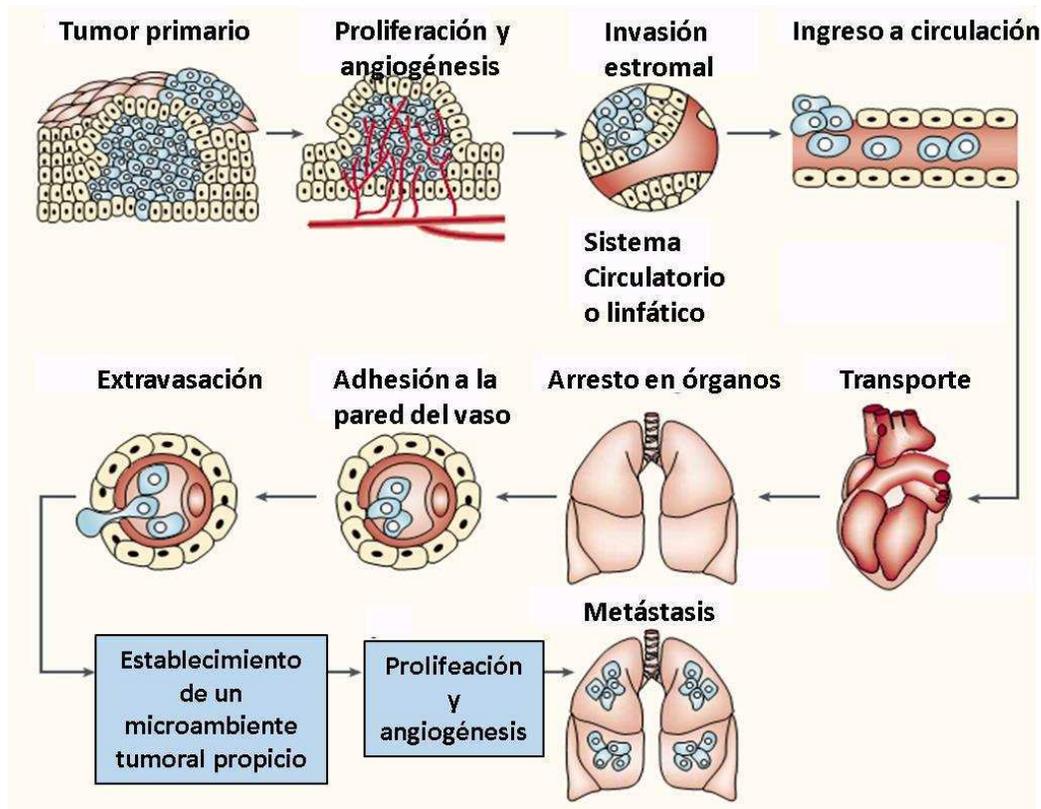


Fig. 3: Esquema de progresión del tumor primario y formación de focos metastásicos. Adaptado de Fidler 2003.

Desde el punto de vista de la arquitectura tumoral, los carcinomas ductales *in situ* (DCIS, del inglés Ductal Carcinoma *In Situ*) se encuentran separados del estroma por una membrana basal intacta. Aunque los DCIS no son obligatoriamente precursores de los carcinomas invasivos (IBC, Invasive Breast Carcinoma), alrededor del 40% de los DCIS progresarán a IBC si no se tratan (Fig.4) (Sakr et al. 2014) siendo este último subtipo el responsable del mayor número de muertes por cáncer de mama. Identificar marcadores de cada paso de la progresión tumoral puede contribuir a determinar cómo progresará

cada tumor, y a diseñar una estrategia terapéutica adecuada a cada estadio de la enfermedad.

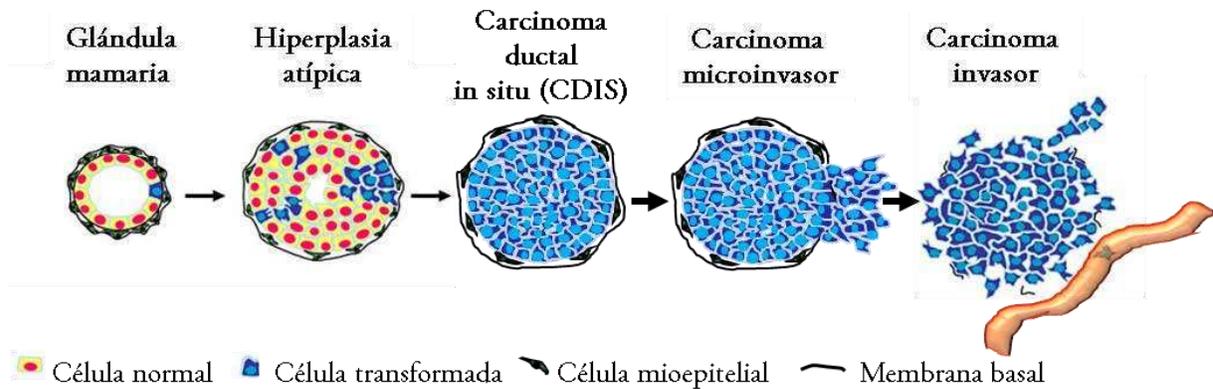


Fig. 4: Esquema de progresión tumoral de la glándula mamaria. Adaptado de (Kouros-Mehr et al. 2008).

Clasificación tumoral en cáncer de mama

Desde el punto de vista histológico, los carcinomas mamarios se clasifican principalmente en ductales y lobulillares de acuerdo a si se asemejan a los conductos (80% de los casos) o lobulillos mamarios o acinos (10-15% de los casos), respectivamente (Banin Hirata et al. 2014). Entre el 5 y el 10% restante se lo considera de tipo aberrante que incluye una serie de subtipos, ej. mucinosos, medulares o papilares.

Hasta los años '70, los tumores de mama se clasificaban por un lado por histología, y por otro lado según la presencia o ausencia de ER. En aquel momento, la elección del tratamiento a seguir se basaba únicamente en marcadores clinicopatológicos con valor pronóstico (es decir, aquellos marcadores que preveen cuál será el resultado clínico independientemente del tratamiento): tamaño tumoral, presencia de metástasis ganglionar y grado histológico, y en los marcadores predictivos ER, PR y HER2 (es decir, aquellos marcadores que pueden estimar la eficacia de un tratamiento) (Reis-Filho and Puztai 2011).

En el año 2000 comenzó a utilizarse en cáncer de mama la clasificación molecular, que se basa en patrones de expresión génica de los tumores (Perou et al. 2000).

Originalmente, la clasificación se basó en la expresión de citoqueratinas (CK) de expresión luminal (CK8 y 18) o de expresión basal mioepitelial (CK5, 6, y 17). En la práctica, la expresión de estas CK correlacionan con la expresión de receptores hormonales; aquellos tumores que expresan ER, expresan CK de tipo luminal y aquellos que no expresan ER, expresan predominantemente CK del tipo basal. Además se identificó un tercer grupo con sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2) que generalmente no expresa ER. Por lo tanto, a partir del trabajo de Perou y colaboradores y teniendo en cuenta la expresión de receptores hormonales, HER2 y el índice de proliferación Ki67, los tumores se agruparon en cuatro grandes grupos:

- Luminales A: ER α (+) y bajo Ki67.
- Luminales B: ER α (+) y alto Ki67.
- Basales: ER α (-) y HER2 (-).
- HER-2: ER α (-) y HER2 (+).

Esta clasificación determinó desde el año 2000 el tratamiento a seguir: en líneas generales los tumores luminales van a terapia hormonal (endócrina), los HER2+ a terapia contra HER2 (ej. Trastuzumab, etc.) y los de tipo basal a quimioterapia.

Esa clasificación además reforzó el concepto de que el cáncer de mama es una enfermedad que afecta el mismo órgano, y se origina, en la mayoría, de los casos de la misma estructura anatómica, pero es sumamente heterogénea desde el punto de vista histológico y biológico, así como también en la respuesta terapéutica. Esta clasificación puso de manifiesto también que la respuesta terapéutica está determinada por características moleculares intrínsecas a cada tumor, más que por factores anatómicos como el tamaño tumoral o la presencia de ganglios positivos (Reis-Filho and Pusztai 2011).

En los últimos años, se han generado múltiples plataformas genéticas que analizan la expresión de genes particulares y permiten predecir el riesgo de metástasis y recurrencia de la enfermedad. Entre ellos se encuentra el Oncotype DX Assay, el MammaPrint Score, y el PAM50/risk of recurrence, entre otros (Gyorffy et al. 2015) y permiten predecir el

riesgo de recurrencia y/o derivar a las pacientes a tratamientos personalizados y más selectivos de acuerdo al subtipo tumoral.

Biomarcadores aceptados y en estudio para la clínica

En la actualidad los factores pronósticos utilizados en la clínica son: TNM (tamaño tumoral, número de ganglios positivos y presencia de metástasis), y además se usa: grado tumoral, que determina el grado de diferenciación del tumor y se basa para su determinación en el grado nuclear (describe cuan aberrantes son los núcleos) y el índice mitótico, tipo histológico (ductal, lobulillar, tipo especial) y subtipo histológico (infiltrante o no). Sin embargo, los marcadores que se siguen analizando en forma rutinaria en las pacientes con cáncer de mama son: ER, PR y HER2. Basándose en estos parámetros, y en el marcador de proliferación celular Ki67, como se mencionó más arriba, los tumores actualmente se clasifican en; **Luminal A:** ER+, PR+ (>20%), HER2-, Ki67 “bajo”, riesgo de recurrencia “bajo” (si es analizable); **Luminal B-(HER2-):** ER+, HER2- y al menos uno: Ki67 “alto”, PR <20%, riesgo de recurrencia “alto” (si es analizable); **Luminal B-(HER2+):** ER+, HER2+, con PR o Ki67 positivo; **HER2+, no-luminal:** ER-, PR-, HER2 sobreexpresado o amplificado y **triple negativo (ductal):** ER-, PR- y HER2-. En base a esta clasificación se determina el destino terapéutico de cada paciente, como indicamos arriba. De todos estos marcadores, los únicos con valor predictivo son ER y HER2, que determinan si las pacientes responderán a las terapias dirigidas contra dichos *target* terapéuticos (Kourea et al. 2014).

En los últimos años se ha propuesto un rol predictivo también para Ki67, ya que la adición de quimioterapia a la terapia endócrina adyuvante en pacientes ER+, Ki67 “alto” ha demostrado un beneficio adicional en términos de supervivencia (Nitz et al. 2014). Además, niveles “bajos” de Ki67 en tumores de mama han sido utilizados como marcadores de respuesta neoadyuvante endócrina.

Otro factor que se estudia cada vez con más énfasis es el microambiente tumoral. Los linfocitos que infiltran el tumor, en particular células T citotóxicas CD8+ y células T regulatorias FOXP3+, macrófagos asociados al tumor (TAMs) y células mieloides

supresoras (MDSCs) han sido propuestos como candidatos con valor pronóstico y predictivo, revisado en (de la Cruz-Merino et al. 2013).

La vía de PI3K/AKT/mTOR, como se mencionará más adelante, tiene una clara participación en la progresión tumoral y resistencia a distintos agentes antitumorales. Sin embargo, aún no se han identificado marcadores predictivos confiables y de rutina para el uso de inhibidores específicos de dicha vía en la clínica.

PI3K/AKT/mTOR en cáncer de mama

La vía PI3K/AKT/mTOR es una vía de señalización intracelular ampliamente estudiada por su rol fundamental en la proliferación, supervivencia, migración y regulación del metabolismo celular (Hers et al. 2011). Se activa por diversas señales extracelulares, como factores de crecimiento (IGF-1, PDGF, IRS-1), que ejercen su acción a través de receptores con actividad de tirosina quinasa (RTKs) y otros, como PKC, SHP1, Rac, Rho y Src (Jiang and Liu 2008). PI3K consta de dos subunidades; la subunidad reguladora p85, y la subunidad catalítica p110. Cuando p85 es reclutada en la membrana, se une a p110 y cataliza la síntesis de PIP3, que se une al sitio de homología a plecstrina (PH) de proteínas como AKT. Una vez en la membrana, AKT sufre un cambio conformacional que facilita la fosforilación en Thr308 por PDK1 y en Ser473 por mTORC2, para su completa activación (Toker 2012). Una vez activada, AKT se transloca al citoplasma y núcleo, donde ejerce sus funciones a través de numerosos efectores como GSK3 β , S6, mTOR (mammalian Target of Rapamycin), eIF4E, TSC2, entre otros (Hers et al. 2011) (Fig.5).

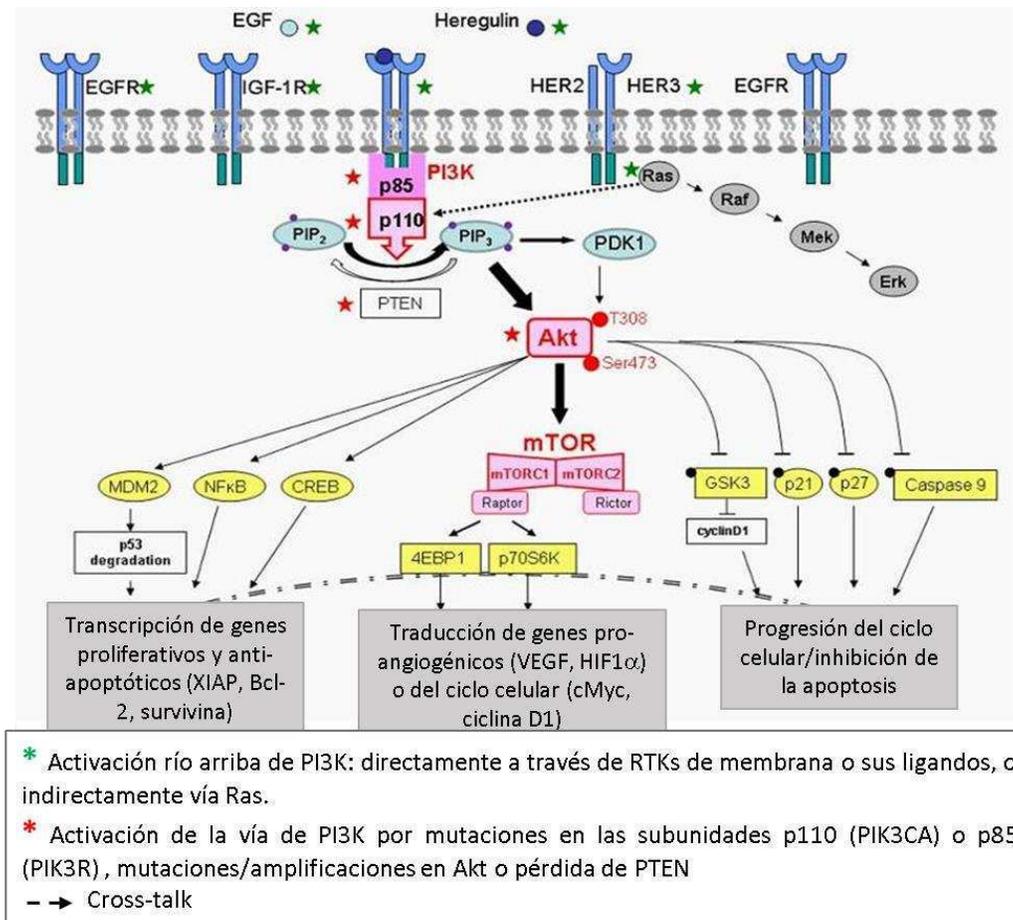


Fig. 5: La vía de PI3K/AKT/mTOR es la vía más comúnmente mutada en la mayoría de los tumores sólidos. Tomado de (Leary et al. 2013).

Alteraciones en la regulación de esta vía pueden llevar al desarrollo de cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y desórdenes neurológicos. De hecho, es la vía más comúnmente hiperactivada en la mayoría de los tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, próstata, gástrico y de páncreas (Kreisberg et al. 2004) (Cheng et al. 2005). Se estima que alrededor del 70% de los tumores de mama presentan alguna mutación en esta vía (Chia et al. 2015). Un trabajo reciente describió ciertas mutaciones en la vía de PI3K/AKT que podrían tener un rol importante en la progresión de DCIS a IBC en pacientes ER+/HER2- (Sakr et al. 2014).

Además, cada vez más evidencias asocian a la vía PI3K/AKT con resistencia *de novo* y adquirida a la terapia endócrina (Tokunaga et al. 2006) y resistencia a la terapia contra HER2 (Knuefermann et al. 2003). Numerosos trabajos correlacionan también la

sobreactivación de la vía de PI3K/AKT con resistencia a quimioterapia. David VanderWeele y colaboradores descubrieron que la sobreactivación de AKT promovió resistencia a Paclitaxel en una línea celular hematopoyética no tumoral (VanderWeele et al. 2004). Además, el tratamiento con Doxorrubicina indujo un aumento en los niveles nucleares de AKT fosforilado (pAKT) en diversas líneas de cáncer de mama y ovario (Wallin et al. 2010). También se encontró una asociación entre la expresión de AKT1 y la resistencia a radioterapia en la línea celular endotelial HUVEC (Bozulic et al. 2008). Estos y otros trabajos han sido revisados en (Brown and Toker 2015).

Rapamicina y “Rapalogs”

La Rapamicina fue el primer inhibidor de mTOR en ser desarrollado, y fue aislado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* en la isla Rapa Nui. La Rapamicina se une a mTOR únicamente cuando ésta está unida a componentes del complejo mTORC1. Por esta razón, la Rapamicina es un inhibidor alostérico específico de mTORC1 (Chiarini et al. 2015). Sin embargo, exposiciones prolongadas o altas concentraciones de Rapamicina pueden resultar inhibitorias de mTORC2, probablemente porque secuestra moléculas recién sintetizadas de mTOR (Sarbasov et al. 2006) (Efeyan and Sabatini 2010).

La Rapamicina fue aprobada por la FDA como inmunosupresor para pacientes transplantados y se la utiliza también para recubrir los *stent* coronarios (Lamming et al. 2013). En 2002 se describió por primera vez la actividad antitumoral de Rapamicina, y desde entonces, numerosos trabajos han demostrado el efecto antineoplásico de este inhibidor, tanto *in vitro* como *in vivo* en distintos tipos de cáncer y en ensayos clínicos con pacientes. Sin embargo, esta droga presenta algunas limitaciones en la solubilidad y propiedades farmacocinéticas. Por esta razón se han generado distintos análogos de Rapamicina o “Rapalogs” como el Temsirolimus (CCI-779) y el Everolimus (RAD001) (Chiarini et al. 2015).

Inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en la terapia antitumoral

Existen en la actualidad en el mercado más de 30 drogas y 5 clases de inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR, entre ellos, inhibidores de PI3K, inhibidores duales de PI3K y mTOR, inhibidores de AKT, inhibidores catalíticos de mTOR y análogos de la Rapamicina. Estos agentes están siendo probados en ensayos clínicos como terapia contra distintos tipos de cáncer (Dienstmann et al. 2014). En la Tabla 1 se muestran los inhibidores en ensayo clínico para el cáncer de mama.

| Inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en fase I, II y III para cáncer de mama | | |
|--|---|--|
| Tipo de inhibidor | Acción | Agente y ensayo clínico |
| Pan-PI3K | Inhibe las 4 clases de subunidades p110 de PI3KIA: p110 α , p110 β , p110 γ , p110 δ | Buparlisib (BKM120), Pilaralisib (XL147), pictilisib (GDC-0941) |
| Pan-AKT | Inhibe las tres isoformas de AKT (AKT1, AKT2 y AKT3) | MK-2206, uprosertib (GSK2141795), ipatasertib (GDC-0068, AZD5363) |
| mTORC1 | Se une alostericamente e inhibe a mTORC1 | Everolimus*, Ridaforolimus, Temsirolimus, Sirolimus |
| mTORC1 y mTORC2 | Se une al sitio de unión al ATP de mTOR e inhibe a ambos complejos | AZD2014, AZD8055, INK128 (MLN0128), CC-223 |
| Inhibidor dual de PI3K y mTOR | Inhibe PI3K, mTORC1 y mTORC2 | Voxtalisib (XL765), Apitolisib (GDC-0980), Gedatolisib (PF-05212384), PI-103 |
| * Aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HR+, HER2-metastásico refractario a inhibidores de aromatasa. | | |

Tabla 1: Inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR en ensayo clínico para el tratamiento del cáncer de mama. Adaptada de (Chia et al. 2015).

Hasta el momento, el uso de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR como monoterapia en tumores sólidos no tuvo buenos resultados, debido al desarrollo de

distintos mecanismos de resistencia. Dicha resistencia puede darse por inhibición incompleta o reactivación de la vía, activación de mecanismos de sobrevida alternativos, etc. En muchos casos, la inhibición incompleta de la vía puede deberse a la concentración a la que se administra la droga, que resulta insuficiente por su toxicidad (Brachmann et al. 2012). La reactivación de la vía PI3K/AKT puede producirse con la administración de inhibidores de RTKs, PI3K o de AKT, por inhibición del *feedback* negativo que ejerce mTOR sobre los RTKs (Chandarlapaty et al. 2011) (Chakrabarty et al. 2012). La inhibición de PI3K puede llevar con frecuencia a la activación de mecanismos de sobrevida alternativos como MAPK (Carracedo and Pandolfi 2008) o a la amplificación de *MYC* (Liu et al. 2011).

El uso de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR se ha extendido en el diseño de terapias combinadas con inhibidores hormonales, para evitar o retrasar el surgimiento de resistencia endócrina. En 2012, de acuerdo a los resultados del estudio BOLERO-2, la terapia combinada Everolimus (inhibidor de mTOR) con Exemestano (inhibidor de aromatasa) fue incorporada a las guías del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para pacientes con cáncer de mama ER+/HER2- metastásico refractario a inhibidores de aromatasa (Baselga et al. 2012) (Yardley et al. 2013), revisado en (Lauring et al. 2013) y (Ciruelos et al. 2013). Un estudio posterior, sostiene que incluso dicha terapia podría resultar beneficiosa como tratamiento adyuvante sistémico de primera línea para evitar o retrasar la resistencia endócrina (Beck et al. 2014). Este inhibidor ha sido aprobado también para el tratamiento del cáncer de páncreas (tumores neuroendócrinos localmente avanzados y/o metastásicos), cáncer de riñón (carcinomas avanzados refractarios a quimioterapia) y astrocitoma de células gigantes (para adultos y niños con esclerosis tuberosa que no pueden ser operados) (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-everolimus> 2013).

Isoformas de AKT y progresión tumoral

Existen tres isoformas de AKT en mamíferos; AKT1, AKT2 y AKT3, que se transcriben a partir de distintos genes. Cada vez más trabajos demuestran que, a pesar de

la alta homología estructural y de secuencia que comparten, las distintas isoformas de AKT cumplen funciones específicas (Woodgett 2005) (Toker 2012). Sin embargo, no está claro aún el rol particular de cada isoforma, ya que los resultados varían según los modelos utilizados, siendo contexto y tipo celular dependiente.

Ju y colaboradores reportaron que AKT1 aumenta la motilidad de las células de cáncer de mama (Ju et al. 2007), mientras que el grupo de Joan Brugge demostró que el silenciamiento de AKT1 aumentó la migración celular en una línea de mama normal que sobreexpresa EGF-1. En este mismo modelo el bloqueo de AKT2 inhibió la proliferación celular, sugiriendo un rol anti-migratorio para AKT1 y proliferativo para AKT2 (Irie et al. 2005). Por otro lado, mientras AKT1 inhibe la migración de células tumorales en distintas líneas de cáncer de mama humanas por degradación de NFAT, AKT2 promueve la invasión de células tumorales por activación de β 1-integrina y GSK3 β , o por regulación de palladin (Arboleda et al. 2003) (Yoeli-Lerner et al. 2009) (Chin and Toker 2010). El laboratorio de Mina Bissell demostró que la sobreexpresión de AKT1 en una línea celular de epitelio mamario promueve la proliferación y sobrevida, pero ejerce un rol anti-migratorio fosforilando TSC2 y marcándolo para degradación. Este proceso reduce la actividad de Rho, la polimerización de F-actina y la formación de focos de adhesión (Liu et al. 2006). El grupo de William Muller demostró que la sobreactivación de AKT1 en el epitelio mamario de ratones HER+ aumentó la tumorigénesis (con un concomitante aumento de ciclina D1 y pRb) pero disminuyó la incidencia de metástasis (Hutchinson et al. 2004) mientras que la sobreexpresión de AKT2 incrementó la incidencia de metástasis pulmonares, sin afectar la latencia tumoral (Dillon et al. 2009). Maroulakou y colaboradores tuvieron resultados similares en ratones transgénicos para HER2 (Maroulakou et al. 2007).

El rol de las isoformas de AKT varía incluso entre distintos tipos de cáncer; al igual que en cáncer de mama, en cáncer de pulmón el grupo de Manfred Jücker demostró que AKT1 estimula la proliferación celular y la sobrevida, mientras que AKT2 regula preferencialmente la migración celular (Grabinski et al. 2011). Por otro lado, trabajos realizados en modelos de cáncer de ovario demostraron un rol tanto proliferativo como

promigratorio para AKT1 (Meng et al. 2006) mientras que otros describieron un rol promigratorio para AKT2 (Arboleda et al. 2003). En próstata en cambio, tanto AKT1 como AKT2 regularon negativamente la migración e invasión celular (Virtakoivu et al. 2012).

El rol de AKT3 en la progresión tumoral es todavía menos conocido. Algunos trabajos asocian la expresión de AKT3 a la regulación por microRNAs, modulando de diferentes formas la proliferación y la invasión de células tumorales en líneas celulares de cáncer de tiroides y hepatocarcinomas (Boufraquech et al. 2014) (Ma et al. 2015). Por otro lado, el grupo de Phung describió roles opuestos para AKT1 y AKT3 en la vasculatura tumoral, con AKT1 promoviendo y AKT3 inhibiendo la proliferación e invasión de células endoteliales (Phung et al. 2015). En cáncer de mama, AKT3 ha sido asociado a tumores triple negativos (Clark and Toker 2014).

En este trabajo nos focalizamos en el rol de las isoformas AKT1 y AKT2 en la progresión del cáncer de mama dado que son las isoformas que se ha descrito que tienen mayor participación en los carcinomas mamarios ER+, el tipo más frecuente y nuestro modelo de estudio.

Adhesión celular y arquitectura del tejido epitelial

El tejido epitelial, como el mamario, es un tejido no vascularizado, que recibe nutrientes y oxígeno del tejido adyacente, denominado estroma. El estroma está constituido por distintos tipos celulares, como células del sistema inmune, células endoteliales, células adiposas y fibroblastos, entre otros. El tejido epitelial está anclado a una membrana basal o matriz extracelular especializada, constituida por proteínas como colágeno VI, laminina y fibronectina.

La estructura y el normal funcionamiento de un tejido dependen de las interacciones de las células con sus vecinas (interacción célula-célula) y de las células con la matriz extracelular que las rodea (interacción célula-matriz extracelular) (Epifano and Perez-Moreno 2012). Defectos en dichas interacciones han sido asociados con un

aumento en la proliferación celular y el desarrollo de cáncer (Hanahan and Weinberg 2011).

Las interacciones célula-célula se dan a través de complejos denominados uniones adherentes o *adherent junctions* (AJ), uniones estrechas o *tight junctions* (TJ) y desmosomas (Perez-Moreno et al. 2003). Las interacciones célula-matriz extracelular se producen a través de puntos de adhesión focal (FA) y hemidesmosomas, que regulan la polaridad celular, proliferación y migración (Danen and Sonnenberg 2003) (Tsuruta et al. 2011). En todas estas interacciones intervienen proteínas cuyo dominio citoplasmático interacciona con proteínas que anclan dichos complejos a estructuras del citoesqueleto, como filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, que preservan la arquitectura celular (Epifano and Perez-Moreno 2012) (Fig. 6).

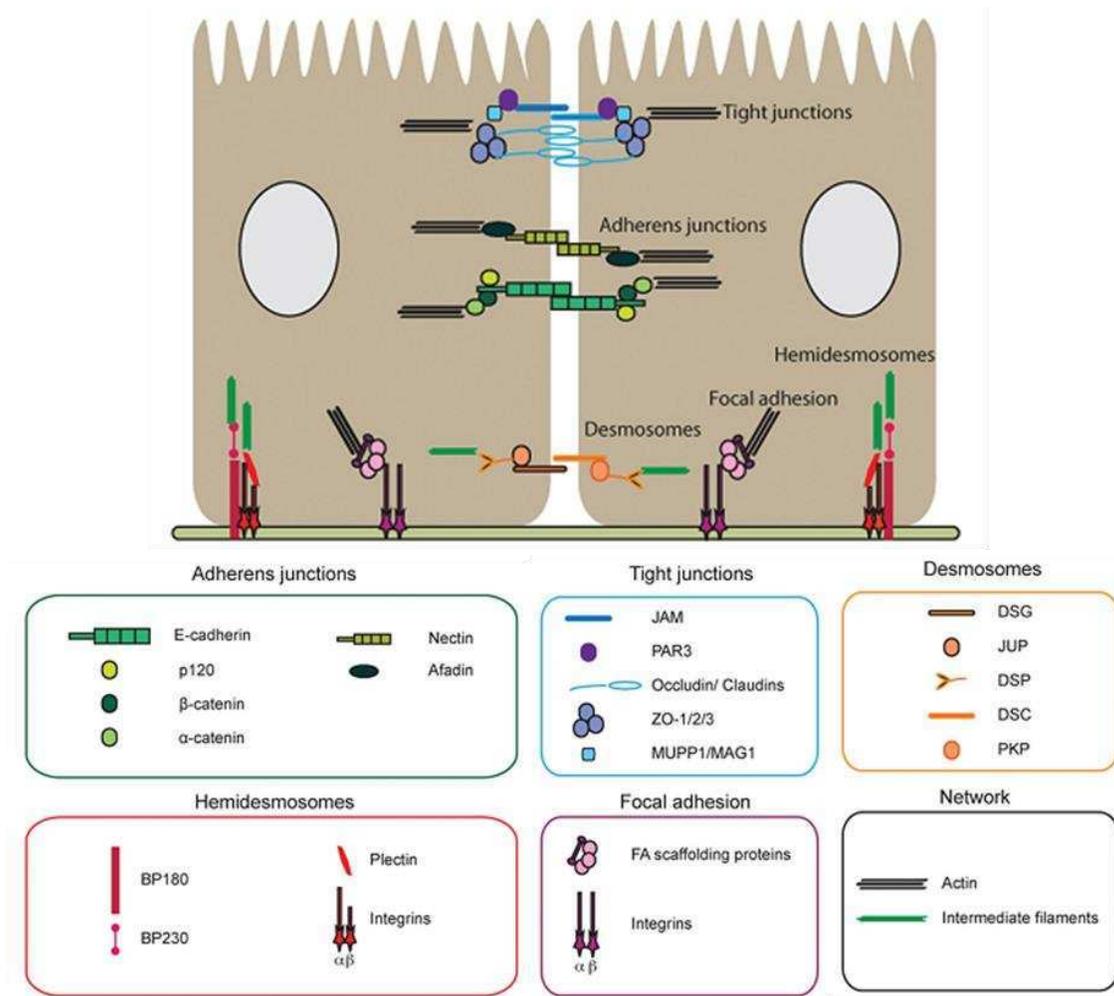


Fig. 6: Complejos proteicos implicados en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. Tomado de (Epifano and Perez-Moreno 2012).

En este trabajo haremos foco en dos proteínas relevantes durante la progresión tumoral: la E-cadherina, perteneciente al complejo de AJ, y las Integrinas, en particular la $\beta 1$ -Integrina, perteneciente a los FA. Las AJ son cruciales para determinar el destino celular dentro de un tejido, y son los primeros puntos de adhesión célula-célula, que luego dan origen a los TJ y desmosomas (Gumbiner 1996). Además, los FA y los AJ mantienen un *crossstalk* dinámico que favorece el funcionamiento y arquitectura de las células epiteliales: la señalización mediada por FA promueve la cohesión celular, regulando el citoesqueleto (Yano et al. 2004) (Martinez-Rico et al. 2010). En forma recíproca, los AJ han sido implicados en la regulación de la función de adhesión a la matriz extracelular mediada por los FA (Balzac et al. 2005).

E-cadherina y β 1-integrina en la progresión tumoral

Además de las funciones relacionadas con la adhesión celular y organización del citoesqueleto, los AJ y FA han sido implicados en numerosos procesos celulares, incluidos proliferación celular, migración, invasión, diferenciación y apoptosis. La pérdida o falla en la regulación de alguna proteína de estos complejos puede llevar al aumento en la proliferación celular, pérdida de diferenciación y la adquisición de características tumorigénicas e invasivas de los tejidos (Cavallaro and Christofori 2004) (Desgrosellier and Cheresch 2010). De hecho, el fenómeno de progresión tumoral suele asociarse a la pérdida de E-cadherina, con la concomitante transición hacia un fenotipo más invasivo (Canel et al. 2013). Sin embargo, también se ha observado invasión de grupos de células que pierden parcialmente la expresión de E-cadherina, a lo que se llamó "invasión celular colectiva" (Christiansen and Rajasekaran 2006). Lo que finalmente determina si una célula o grupo de células adquirirá características migratorias y/o invasivas es el balance entre E-cadherina e integrinas.

Las integrinas son glicoproteínas de la membrana que, como mencionamos más arriba, median las interacciones célula-matriz extracelular, y transducen las señales a través de su unión a proteínas con actividad de quinasa como FAK, SRC, ABL, ILK, etc. (Epifano and Perez-Moreno 2012). Las integrinas están constituidas por dos subunidades, α y β , de las cuales hay descritas hasta el momento 18 subunidades α y 8 subunidades β , que dan origen a más de 20 posibles combinaciones de dímeros que regulan diferencialmente múltiples procesos biológicos (Humphries et al. 2006). Las integrinas transmiten señales "inside-out", es decir hacia el exterior de la célula a través de su unión a fibronectina y otras proteínas de la matriz y señales "outside-in", es decir, desde el exterior hacia el interior de la célula, actuando como sensores del microambiente y modulando el estado del citoesqueleto (Moser et al. 2009).

El rol de las integrinas en los procesos de migración e invasión celular ha sido ampliamente estudiado (Guo and Giancotti 2004) (Mitra and Schlaepfer 2006). La sobreexpresión de integrinas se asocia con un peor pronóstico en cáncer (Lu et al., 2008), progresión tumoral (Nam et al. 2013) (Zawistowski et al. 2013) y resistencia a la terapia

(Folgiere et al. 2008) (Lesniak et al. 2009) (Huang et al. 2011) (Pontiggia et al. 2012) (Jahangiri et al. 2014). Incluso la expresión de $\beta 1$ -integrina ha sido propuesta como marcador de un fenotipo más agresivo en DCIS (Nam et al. 2013).

El grupo de Kenneth Anderson describió un aumento en la migración e invasión de células de mieloma múltiple por activación de PI3K/AKT, a través de la fosforilación de FAK, y su unión a $\beta 1$ -integrina y a proteínas del citoesqueleto (Tai et al. 2003). Sin embargo, existen muy pocos trabajos que relacionen la regulación de $\beta 1$ -integrina y las isoformas de AKT. En células de cáncer de mama y ovario el aumento en la migración e invasión inducido por AKT2 está asociado a un aumento de $\beta 1$ -integrina (Arboleda et al. 2003). Sin embargo, en próstata tanto AKT1 como AKT2 demostraron ser reguladores negativos de $\beta 1$ -integrina, aunque por diferentes mecanismos (Virtakoivu et al. 2012).

Teniendo en cuenta la relevancia de la vía PI3K/AKT en la biología del cáncer, es fundamental entender los mecanismos particulares de activación de cada isoforma, así como también identificar los sustratos específicos de cada una de ellas, que regulan diferencialmente los procesos de supervivencia, invasión y metástasis. Este conocimiento es indispensable a la hora de clasificar mejor a los tumores en cuanto a su pronóstico y de diseñar terapias antitumorales selectivas con el objetivo de maximizar la eficacia en cada estadio de la enfermedad y minimizar los efectos adversos en las pacientes.

Antecedentes de nuestro grupo

El presente trabajo de tesis surge de resultados anteriores en los que utilizamos el modelo de carcinomas mamarios murinos generados por la administración continua de acetato de medroxiprogesterona (MPA), un análogo sintético de la progesterona con mayor vida media que la hormona endógena. Dicho modelo fue originado en el laboratorio de la Dra. Lanari, revisado en (Lanari et al. 2009). Los tumores que crecen únicamente en presencia de MPA se denominan hormono-dependientes (HD), mientras que las variantes que crecen sin necesidad del aporte de MPA se denominan hormono-independientes (HI). Ambas variantes tumorales presentan una histología ductal y expresan ER y PR. Encontramos que la variante C4-HI presenta aumentada la actividad de la vía de PI3K/AKT con respecto a su contraparte C4-HD. Otra diferencia importante entre las variantes C4-HD y C4-HI es que los tumores C4-HI son histológicamente diferenciados, con mayor expresión de citoqueratina 8, marcador luminal, y mayor deposición de laminina I en el estroma. Teniendo en cuenta resultados de la bibliografía que asocian a la isoforma AKT1 con el proceso de tumorigénesis mamaria, nos interesó estudiar si la activación de la vía PI3K/AKT podía estar involucrada en la adquisición del fenotipo hormono-independiente. La sobreactivación de AKT1 en cultivos primarios derivados de tumores C4-HD indujo un aumento en la activación de proteínas río abajo de AKT, como GSK β , involucrada en el metabolismo de la glucosa. Las células infectadas con la construcción myristoylada de AKT1 (myrAKT1) o con el plásmido vacío fueron inoculadas en ratones *nude* en ausencia de MPA. Las células C4-HD myrAKT1 fueron capaces de generar tumores sin el agregado exógeno de hormona, es decir tumores hormono-independientes. Los tumores C4-HD myrAKT1 presentaron una tasa de crecimiento mayor a la de los tumores control C4-HD ACL-4.1, mayores niveles fosforilación de S6, de ER y de PR. Otro resultado interesante fue que los tumores C4-HD myrAKT1 presentaron una histología diferenciada típica de los tumores C4-HI, con formación de luces ductales, acompañada de una mayor expresión de citoqueratina 8 y laminina I, y menor expresión de citoqueratina 14 (Riggio Tesina de Licenciatura FCEN/UBA 2009) (Riggio et al. 2012).

A partir de esos resultados, para este trabajo de tesis decidimos profundizar el estudio del rol de las isoformas de AKT en el fenotipo tumoral, extrapolando el análisis a líneas celulares de cáncer de mama humano, tanto en cultivo como en xenotransplantes.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue discriminar el rol específico de AKT1 y AKT2 en los procesos de proliferación, migración e invasión que se desencadenan durante la progresión tumoral en el cáncer de mama.

Objetivos específicos

- ✚ Estudiar el rol de las isoformas AKT1 y AKT2 sobre la proliferación celular y el crecimiento tumoral hormono-independiente en modelos experimentales de carcinogénesis mamaria.
- ✚ Analizar el rol de AKT1 en la adquisición de resistencia endócrina.
- ✚ Evaluar el papel de las isoformas AKT1 y AKT2 en los procesos de adhesión, migración e invasión celular.

Materiales y Métodos

LÍNEAS CELULARES

En este trabajo de tesis utilizamos las líneas celulares de cáncer de mama humano IBH-7, IBH-6 (generadas en el IBYME por la Dra. Isabel Lüthy) y T47D (ATCC, Virginia, USA). La línea IBH-7 deriva de una paciente pre-menopáusica de 40 años de edad con un carcinoma ductal invasivo. La línea IBH-6 deriva de una paciente pre-menopáusica de 34 años de edad con carcinoma avanzado, que recibió quimioterapia neoadyuvante seguida de mastectomía. Ambas líneas expresan los receptores hormonales ER, PR y receptor para EGF (Vazquez et al. 2004).

La línea celular T47D deriva de una metástasis pleural obtenida de una paciente de 54 años de edad con un carcinoma ductal infiltrante (Keydar et al. 1979).

ENSAYOS *IN VITRO*

Mantenimiento de las líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantienen en medio DMEM/F12 (Sigma Aldrich) suplementado con 10% suero fetal bovino (Natocor). La línea IBH-7 requiere además 2 µg/ml de insulina para crecer, mientras que la línea T47D se suplementa con 1 nM de insulina en el medio de cultivo.

Cultivo en 3 dimensiones (3D)

Las células se siembran en *chambers-slides* de 8 hoyos (LabTek, NUNC), con un *coating* previo de 50 µl Matrigel (BD Biosciences). Se dejan adherir durante 48 horas en el mismo medio de cultivo que se utiliza para el cultivo en 2D.

Transfección de líneas celulares

Para la sobreexpresión estable de la isoforma AKT1 se utilizó el plásmido retroviral pACL4.1-myrAKT1, que generamos en el año 2009 en el laboratorio del Dr. Colman-Lerner, utilizado en (Riggio et al. 2012). El vector retroviral pACL-4.1, de 10 Kpb, fue generado por el Dr. Colman Lerner, IFIBYNE, UBA-CONICET (no

publicado) y permite expresar el gen de interés bajo el control del LTR retroviral. Además expresa bajo el control del promotor constitutivo de la fosfoglicerato kinasa (PGK) la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada al gen de resistencia a geneticina (GFP-Neo).

El gen de *AKT1* utilizado posee una delección en el dominio de homología a plectrina (PH, $\Delta 4-129$), por lo que dicha proteína se detecta a la altura de 47 KDa. La secuencia de myristoylación (myr) de 14 aminoácidos en el extremo amino-terminal mantiene a la proteína asociada a la membrana y por ende activa (Kohn et al. 1996).

Utilizamos también el vector ACL-4.1-PTEN para estudiar el efecto de inhibir la vía PI3K/AKT. Este supresor tumoral es una fosfatasa que actúa quitándole un grupo hidroxilo a PIP3, e impidiendo el reclutamiento de AKT en la membrana para su posterior fosforilación y activación. En este caso también el vector ACL-4.1 se utilizó como control.

La sobreexpresión de AKT2 se realizó con el vector de expresión pCDNA3-myrAKT2 (Addgene, plásmido #9016). Ambos plásmidos fueron introducidos en las líneas celulares por transfección estable con Lipofectamina 2000 (Life Technologies). Las células fueron sembradas en medio fresco en una confluencia de alrededor del 70%, 24 horas antes de la transfección. Se colocaron 0,8 μg de DNA en un tubo con Optimem (Life Technologies). Esta solución fue transferida a un tubo que contenía Lipofectamina 2000, también diluida en Optimem, según indicación del fabricante. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para formar partículas liposomadas, que contienen en su interior la construcción génica. Estas partículas son las que ingresan a la célula por fusión con la membrana plasmática. Pasado el tiempo de incubación, se añadió a las células la solución que contenía los liposomas hasta cubrir el hoyo, y se incubó a 37°C durante 6 horas. Luego, se removió el sobrenadante, se agregó medio DMEM/F12 + 10% SFB. Cuarenta y ocho horas después se seleccionaron las células que incorporaron el inserto de forma estable en el genoma con Geneticina (Calbiochem, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se utilizó como control de selección un hoyo que contenía células sin transfectar. El mantenimiento de las células se realizó con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Geneticina.

Infección de líneas celulares

El silenciamiento estable de *AKT1* o *AKT2* se realizó mediante una infección con partículas lentivirales que contenían el inserto de interés. El vector para silenciar *AKT1* es el TRCN0000022937 y el vector para silenciar *AKT2* es el TRCN0000055260, ambos de Sigma. El vector control es el shc-002 Non-Target shRNA Control Vector.

Para la generación de las partículas lentivirales se utilizaron las células empaquetadoras HEK-293T. Dado que los vectores poseen el genoma de un lentivirus defectivo, es decir que no poseen los genes necesarios para la replicación y encapsidación del virus, la generación de los lentivirus se realizó con el agregado exógeno de dos plásmidos que contienen los genes que codifican para proteínas del core (gag) y transcriptasa reversa (pol), y glicoproteínas de la envoltura (env). Las concentraciones de cada plásmido para la generación de lentivirus es: 10 µg del gen *target*, 10 µg de los genes gag-pol y 5 µg de env.

Se plaquearon 5×10^6 células 24 horas antes de la transfección en una placa de 100 mm². El protocolo de transfección con Lipofectamina es el mismo que se describió más arriba, con la diferencia que luego de las 6 horas de incubación con las partículas liposomadas, se cambió el medio y se agregaron 10 ml de DMEM/F12 + 10% SFB. 48 horas más tarde se colectó ese medio, donde se encontraban las partículas lentivirales. Se realizó una centrifugación a 1000 rpm para descartar los detritos celulares y se guardó el sobrenadante a -80°C hasta su utilización.

Para la infección de las líneas IBH-6, IBH-7 y T47D, las células fueron plaqueadas en una confluencia de alrededor del 60% y 24 horas después se cambió el medio por 50% medio que contenía lentivirus y 50% DMEM/F12 + 10% SFB fresco. La infección se realizó durante 24 horas en presencia de polybrene (un facilitador de la transferencia génica) y 48 horas más tarde se realizó la selección de las células infectadas en forma estable con Puromicina (Invivo Gen, 5 µg/ml). Como control de selección se utilizaron células sin infectar.

Ensayo de crecimiento celular en suspensión (mamosferas)

Las células fueron sembradas y mantenidas en DMEM/F12 suplementado con B27 (Invitrogen), 40 ng/ml FGF2 (Sigma) y 20 ng/ml EGF (Sigma), según Dontu y colaboradores (Dontu et al. 2003). Al cabo de 60 días en cultivo, se cuantificó el número total de cúmulos por placa. Este ensayo se realizó sólo para la línea IBH-6.

Tratamiento de cultivos celulares con inhibidores endócrinos y de quinasas

Se sembraron 4×10^4 células IBH-6 ACL-4.1 o IBH-6 myrAKT1 en medio DMEM/F12 + 1% SFB charcolizado (depletado de hormonas) en placas de 12 hoyos. Al día siguiente se removió el medio y se adicionó medio fresco con los inhibidores ICI182780 $1 \mu\text{M}$ (Fulvestrant, Faslodex), Rapamicina 100 nM (LC Laboratories) o la combinación de ambas drogas. El tratamiento se realizó por 72 horas. Finalizado ese tiempo se tripsinizaron las células y se contaron en cámara de Neubauer. El ensayo se realizó por triplicado, con tres réplicas por experimento.

Ensayo de proliferación por conteo celular

Se sembraron 4×10^4 células por hoyo en placa de 12 hoyos. Las células IBH-6 se mantuvieron durante 4 días en medio DMEM/F12 + 5% SFB. Las células T47D se mantuvieron durante 5 días en medio DMEM/F12 + 1% SFB charcolizado suplementado con 20 ng/ml insulina (o 10 nM IGF-1). Al finalizar el experimento se cuantificó el número de células totales. Dicho ensayo se realizó por triplicado, con tres réplicas por experimento.

Ensayo de migración celular por cierre de herida

Para este ensayo se sembraron las células en placa de 6 hoyos. Al llegar a confluencia se ayunaron por 24 horas en DMEM/F12 + 1% SFB charcolizado, se realizó la herida con un tip y se incubaron las células en medio 5 % SFB por 21 horas. Se tomaron fotografías en 4 zonas de cada hoyo en tiempo 0 (T0) y luego de las 21 horas de incubación (Tf).

Con el programa *ImajeJ* se cuantificó el área de cada foto y se graficó en GraphPad Prism el porcentaje de cierre de la herida (T0-Tf). Este ensayo se realizó por triplicado, con dos réplicas por experimento (se promediaron las áreas de 8 fotos en cada experimento).

Ensayo de invasión celular

Las células creciendo en 2D fueron ayunadas con DMEM/F12 + 1% SFB charcolizado por 24 horas previo a la realización de dicho ensayo. Se sembraron 5×10^4 células en insertos con poro de 8 μm (BD Biosciences), que tenían un *coating* previo de una dilución 1:6 de Matrigel (BD Biosciences) en DMEM/F12. Dichos insertos se colocan dentro de una placa de 24 hoyos. Por encima de las células se colocó DMEM F12 1% SFB charcolizado, y por debajo del inserto, DMEM/F12 + 5% SFB de manera de crear un gradiente para que las células puedan migrar. Al cabo de 24 horas se fijaron las células con Metanol y se tiñeron con Cristal Violeta. Se removieron las células que no invadieron, es decir, las que quedaron del lado superior del inserto, y se cuantificaron las células que se adhirieron a la cara inferior del inserto. Este ensayo se realizó por triplicado.

Extractos proteicos y western blot (WB)

Las células fueron ayunadas con medio DMEM/F12 + 1% SFB charcolizado 24 horas antes de realizar los extractos. Los extractos fueron realizados con *buffer* RIPA, junto con inhibidores de proteasas y fosfatasa al 0,1%. Las células fueron incubadas por 15 minutos en agitación a 4°C y luego se realizó una centrifugación a 12.000 rpm (Centrifuga 5415 R, Eppendorf) a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante contiene el extracto total de proteínas (nuclear y citoplasmático). Los extractos fueron inmediatamente congelados a -70°C previa determinación de la concentración proteica por el Método de Lowry.

Los extractos proteicos se separaron en un gel de poliacrilamida discontinuo utilizando el sistema de *buffers* discontinuos de *Laemmli*. Previo a la separación, las proteínas se diluyeron en solución desnaturalizante (*cracking buffer*) y se incubaron a 100°C

durante 5 minutos. En cada gel se sembraron las muestras correspondientes (100 µg de proteína/calle) junto con un marcador de peso molecular. La separación se realizó durante 20 minutos a 20 mA/gel hasta que las muestras pasaran el gel concentrador, y por aproximadamente 120 minutos a 25 mA/gel en el gel separador.

Concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 100 V. A continuación, las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (leche al 5% en TBS-Tween o BSA al 5% en TBS-Tween, dependiendo del anticuerpo), toda la noche (ON). Al terminar el bloqueo, las membranas se lavaron con TBS-Tween y luego se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, a 4°C, ON, en agitación. Al día siguiente el anticuerpo primario fue lavado con TBS-Tween, y se agregó el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa. Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas mediante el agregado de un sustrato que genera una señal quimioluminiscente al ser modificado por la enzima peroxidasa. Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica. Finalmente, las placas fueron escaneadas utilizando un escáner digital, y las bandas se cuantificaron utilizando el programa *ImageJ*.

Inmunofluorescencia (IF)

Cultivos en 2D

Las células fueron fijadas con PFA 4% en PBS 1X por 15 minutos a temperatura ambiente y luego lavadas con PBS 1X. En algunos casos, ej. anticuerpos citoplasmáticos y/o nucleares, se realizó previamente una permeabilización con Tritón X100 0,25% en PBS 1X, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS 1X, se bloquearon durante 1 hora con SFB 10% en PBS 1X, en cámara húmeda, a temperatura ambiente. Concluido el bloqueo, las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo, ON, a 4° C. A continuación las células fueron lavadas con PBS 1X, e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, con el anticuerpo secundario fluoresceinado diluido en solución de bloqueo. Luego de

tres lavados con PBS 1X, se contrastaron los núcleos con yoduro de propidio (IP) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 10 minutos, para finalmente montar los vidrios con Vectashield (VECTOR) y sellar con esmalte.

Los preparados se conservaron a -20°C y se observaron con un microscopio confocal Nikon Eclipse E800. Las fotos correspondientes fueron tomadas con el software EZ-C1 2.10. En todos los casos, al determinar la intensidad a la que se tomaron las fotografías, se restó el *background* ocasionado por el anticuerpo secundario. Esto constituye el control de especificidad de la señal, ya que se omite el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS 1X. Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y en iguales condiciones de procedimiento.

Cultivos en 3D

Las células fueron fijadas con PFA-sacarosa 4% en PBS 1X por 15 minutos a temperatura ambiente para conservar la estructura de los cúmulos y luego lavadas con PBS 1X. A continuación se realizó una permeabilización con Tritón X100 0,25% en PBS 1X, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS 1X, se bloquearon durante 1 hora con SFB 10% en PBS 1X, en cámara húmeda, a temperatura ambiente. Concluido el bloqueo, las células se incubaron con F-actina unida a TRITC, diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las células fueron lavadas con PBS 1X y, se contrastaron los núcleos con yoduro de propidio (IP) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para finalmente montar los vidrios con Vectashield (VECTOR) y sellar con esmalte.

ENSAYOS *IN VIVO*

Animales

Se utilizaron ratones hembras *nude*, provenientes del Bioterio de Universidad de La Plata y ratones hembras y machos *NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null* (NSG) vírgenes de dos meses de edad provenientes de Jackson Laboratories, USA y criadas en el Bioterio

del IBYME. Los animales fueron mantenidos con una dieta a base de alimento balanceado *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) a una temperatura entre 20 y 23°C. Los animales fueron manipulados según normas internacionales acordes con la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996), y el protocolo aprobado por el Comité de Ética Institucional (CE023/2014 y CE036/2015).

Los experimentos *in vivo* fueron realizados al menos por duplicado, con un mínimo de 3 ratones por grupo experimental.

Generación de tumores

Línea celular IBH-7

La línea IBH-7 crece como xenotransplante únicamente en presencia de un pellet de Estradiol (E_2) de 0,5 mg (Bruzzone et al. 2009). Los ratones fueron divididos en dos grupos: un grupo con E_2 , colocado 7 días antes de la inoculación de las células y un grupo sin E_2 . Se inocularon 1×10^7 células IBH-7 ACL-4.1 o IBH-7 myrAKT1 por ratón *nude* en forma subcutánea en el flanco lateral derecho, a la altura de la cuarta mama. Cuando los tumores fueron palpables comenzó a medirse el tamaño tumoral cada tres días con un calibre Vernier, para determinar largo y ancho y así calcular el área tumoral en mm^2 . Con estos datos se elaboraron las curvas de crecimiento [Tamaño tumoral (mm^2) vs. Tiempo].

Línea celular IBH-6

Tanto para los experimentos del Capítulo I, realizados en ratones hembras *nude* como los experimentos del Capítulo II, realizados en ratones machos NOD/SCID se inocularon 5×10^6 células por ratón en el flanco lateral derecho, a la altura de la cuarta mama. Cuando los tumores fueron palpables, comenzaron a medirse para realizar las curvas de crecimiento, del mismo modo que se indicó para la línea IBH-7.

Línea celular T47D

La línea celular T47D crece *in vivo* únicamente en ratones NOD/SCID en presencia de Matrigel y con el agregado de un pellet subcutáneo de 0,25 mg de E₂. Se inocularon 7,5x10⁶ células por ratón en el flanco lateral derecho, a la altura de la cuarta mama. Cuando los tumores fueron palpables, comenzaron a medirse para realizar las curvas de crecimiento del mismo modo que se indicó para las líneas IBH-7 e IBH-6.

Tratamiento con inhibidores endócrinos y de quinasas en animales

Las células fueron inoculadas en los animales, como se describió anteriormente y, cuando los tumores alcanzaron un tamaño de alrededor de entre 20 y 50 mm² comenzaron los tratamientos. Este ensayo se realizó sólo para las líneas IBH-6 ACL-4.1 e IBH-6 myrAKT1. La administración de ICI182780 (5mg) se realizó en forma subcutánea (sc) una vez a la semana. La administración de Rapamicina (5mg/kg/día) se realizó en forma intraperitoneal (ip) día por medio. El vehículo de la Rapamicina es PBS-Tween80 (5,2%)-PEG400 (5,2%). Los tratamientos fueron realizados por 15 días y el tamaño tumoral se midió cada dos días para realizar la curva de Tamaño tumoral vs. Tiempo. Finalizado ese tiempo, se sacrificaron los animales y se pesaron los tumores para corroborar el valor final del tamaño tumoral registrado en las curvas. De cada tumor, una porción se conservó a -80°C para posterior extracción proteica y otra porción se fijó en formol 4% para su posterior inclusión en parafina y corte en micrótopo. Ninguna de las drogas utilizadas presentan toxicidad a las dosis ensayadas.

Extractos proteicos totales a partir de muestras de tumores para analizar por WB

La porción de cada tumor conservada a -80°C fue incubada con 4 veces su peso en volumen de buffer A conteniendo 1% de cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem). Las porciones tumorales fueron homogeneizadas con un homogeneizador (Teckmar) a velocidad media, manteniéndolas constantemente en hielo, repitiendo la operación 4 veces por 5 segundos cada una, hasta obtener los homogenatos. Estos se dejaron reposar en hielo durante 15 minutos y luego fueron sonicados a frecuencia media

durante 10 segundos 3 veces. Se los dejó reposar otros 20 minutos en hielo y se los centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contenía el extracto proteico total, se guardó rápidamente a -80°C para ser usado posteriormente en WB.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Cortes tumorales de 10 μm se desparafinaron en xileno durante 30 minutos y se rehidrataron por pasajes sucesivos en soluciones de etanol/agua destilada, de concentración decreciente (etanol 100%, 96% y 70%). A continuación, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 10% en etanol /agua destilada al 70%, durante 20 minutos. Luego de una serie de lavados con PBS 1X (*ver Apéndice*) se bloqueó con SFB al 10% en PBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Los cortes histológicos se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en SFB al 10% en PBS 1X, ON, a 4°C en cámara húmeda. Luego, se realizaron una serie de lavados en PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalmente, se realizaron una serie de lavados con PBS 1X y se procedió a revelar los anticuerpos. Las reacciones antígeno–anticuerpo fueron detectadas utilizando el Complejo Avidina Biotina (ABC kit Vectastain VECTOR) y revelando con 3-3´diaminobencidina (DAB, DAKO). Para contrastar la marca positiva, los núcleos fueron teñidos con hematoxilina (Biopur). Los cortes se deshidrataron pasándolos por alcoholes de graduación creciente, y se incubaron en xileno, para luego montarlos en medio sintético (DPX, Sigma Aldrich). Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS 1X.

Los cortes histológicos se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E800. Las fotos se tomaron con una máquina digital Nikon asociada a este microscopio utilizando el *software* ACT-2U. Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y en iguales condiciones de procedimiento.

Conteo de mitosis y apoptosis

Los cortes tumorales teñidos con hematoxilina-eosina se utilizaron para realizar el conteo de mitosis y apoptosis bajo un microscopio Nikon Eclipse E200. El porcentaje mitótico se calculó como el número de células en división sobre el número de células totales por campo y se multiplicó x 100. De manera similar se calculó el porcentaje de células en apoptosis. Se realizó un conteo de diez campos por cada muestra y se calculó la media \pm DS. Los valores que se analizaron en la Fig. 6 corresponden a un conteo de un mínimo de tres tumores por cada grupo.

Evaluación de focos metastásicos

Para evaluar la capacidad metastásica de las células transfectadas, los animales fueron inoculados con 5×10^6 células IBH-6 shAKT1 o $7,5 \times 10^6$ células T47D myrAKT2. Al cabo de 60 y 75 días respectivamente los animales fueron sacrificados.

Para evaluar si el tratamiento con Wortmannin era capaz de inducir metástasis se inocularon $7,5 \times 10^6$ células T47D *wt* en animales NOD/SCID. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de alrededor de 50 mm² comenzó a administrarse el Wortmannin en forma ip en una concentración de 1mg/kg/día. El vehículo utilizado fue solución fisiológica y las inyecciones se realizaron cada 3 días.

Finalizados los experimentos se realizaron necropsias completas de los animales, se extrajeron hígado, pulmón, útero y ovario y se fijaron en formol 4% para su posterior inclusión en parafina y corte en micrótomo. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizó la presencia o ausencia de metástasis en los grupos IBH-6 shAKT1, T47D myrAKT2 y T47D tratados con Wortmannin y se los comparó con su contraparte control (IBH-6 shco, T47D shco y T47D *wt*).

Análisis estadístico

Las diferencias entre medias de múltiples tratamientos se evaluaron con una prueba ANOVA de una vía. Las medias de cada grupo se compararon entre sí mediante el test de Tukey y con el grupo control con el test de Dunnet. Las diferencias entre medias de dos tratamientos se evaluaron con una prueba “t” de Student, utilizando

el programa GraphPad Prism (versión 5.0 para Windows, GraphPad Software Inc.). En las curvas de crecimiento y regresión tumoral se calcularon las pendientes de las mismas y se analizó si diferían significativamente entre sí, con el programa GraphPad Prism (versión 5.0 para Windows, GraphPad Software Inc.).

Cada experimento se repitió al menos dos veces, con un tamaño de muestra mínimo de 3 en cada réplica. En las figuras se muestra un experimento representativo.

Anticuerpos

| Anticuerpos 1° | Característica | Dilución |
|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| PI3K 110 β | Policlonal, Santa Cruz 602 | 1/500 (WB) 1/100 (IF) |
| pSer380/Thr382/383PTEN | Policlonal, Santa Cruz 101789 | 1/500 (WB) |
| PTEN | Policlonal, Santa Cruz 9145 | 1/500 (WB) 1/100 (IF) |
| pSer473AKT (pAKT) | Monoclonal, Cell Signalling #4060 | 1/1000 (WB) 1/100 (IF) |
| AKT1 | Policlonal, Santa Cruz H-136, sc-8312 | 1/500 (WB) 1/100 (IHQ/IF) |
| AKT2 | Policlonal, Cell Signaling #3063 | 1/1000 (WB) 1/100 (IHQ/ IF) |
| pSer240/244S6 (pS6) | Policlonal, Cell Signalling, #2215 | 1/1000 (WB) 1/100 (IHQ/IF) |
| S6 total | Monoclonal, Cell Signalling, #2217 | 1/1000 (WB) 1/100 (IHQ/IF) |
| pGSK-3 α/β | Monoclonal, Santa Cruz 81496 | 1/500 (WB) 1/100 (IF) |
| GSK-3 α/β | Monoclonal, Santa Cruz 7291 | 1/500 (WB) |
| pSer294PR | Lab. Dr. Edwards | 1/2000 |
| pSer190PR | Lab. Dr. Edwards | 1/5000 |

| | | |
|---------------------|--|------------------------------|
| PR | Policlonal, Santa Cruz H-190, sc-7208 | 1/500 (WB), 1/100 (IHQ) |
| pSer118ER α | Policlonal, Santa Cruz 101675 | 1/500 |
| pSer167ER α | Policlonal, Cell Signaling5587 | 1/1000 |
| ER α | Policlonal, Santa Cruz MC-20, sc-542 | 1/1000 |
| β -actina | Policlonal, Santa Cruz 1616 | 1/500 |
| Tubulina | Monoclonal, Neomarkers MS- 719-P | 1/500 |
| ERK1/2 | Policlonal, Santa Cruz K-23, sc- 94 | 1/1000 |
| Laminina 1 | Policlonal, Ly Laboratories | 1/100 |
| E-Cadherina | Monoclonal , Cell Signalling, #3195 | 1/1000 |
| Vimentina | Monoclonal, Sigma V6630 | 1/250 (IHQ) 1/100 (IF) |
| β 1-Integrina | Policlonal, Santa Cruz M-106, sc-8978 | 1/500 (WB) 1/100 (IHQ/IF) |
| β 1-Integrina | Policlonal, Cell Signaling 9699 | 1/100 |
| Ki67 | Policlonal, Abcam, ab- 15580 | 1/500 (IHQ), 1/100 (IF) |
| pY861FAK | Policlonal, Abcam, ab- 4804 | 1/1000 (WB) 1/100 (IF) |
| Citoqueratina 8 | Troma 1, DHSB | 1/100 |
| Citoqueratina 14 | Policlonal, Covance | 1/100 |
| MMP-9 | Policlonal, Cell Signalling, #3852 | 1/100 |

| | | |
|-------------|---|----------------------------|
| Cilclina D1 | Policlonal, Santa Cruz H-295, sc-753 | 1/100 (IHQ), 1/500 (WB) |
|-------------|---|----------------------------|

Resultados

CAPÍTULO I

Efectos de la sobreactivación de AKT1 sobre el crecimiento tumoral y la hormono-independencia en líneas celulares de cáncer de mama humano.

Línea celular IBH-7

Con el objetivo de evaluar si los efectos de la sobreactivación de AKT1 observados en el modelo murino (Riggio et al. 2012) se reproducían en otros modelos experimentales, transfectamos en forma estable las líneas celulares de cáncer de mama humano IBH-7 e IBH-6. Como se mencionó en Materiales y Métodos, el crecimiento de la línea celular IBH-7 depende del agregado de E₂ tanto al medio de cultivo, como a los ratones inmunosuprimidos para generar los xenotransplantes. Las células IBH-7 fueron transfectadas de forma estable para sobreactivar AKT1 (ver Materiales y Métodos). El vector ACL-4.1-myrAKT1 contiene una secuencia de myristoylación, que ancla la proteína a la membrana, manteniéndola constitutivamente activa. El vector vacío ACL-4.1 fue el control de transfección.

Al igual que en los cultivos hormono-dependientes C4-HD, comprobamos que la sobreactivación de AKT1 en la línea IBH-7 indujo una activación y/o aumento en la expresión de proteínas río abajo, reguladas por AKT (Fig. I.1A). Algunas de las proteínas estudiadas fueron la proteína ribosomal S6 y GSK3, involucradas en síntesis proteica y proliferación celular, y metabolismo de la glucosa, respectivamente. Observamos un aumento significativo en la fosforilación de S6 en Ser240/244 (pS6), el residuo que es sustrato de mTOR, y un aumento tanto en la fosforilación como en los niveles totales de GSK3 (Fig. I.1B).

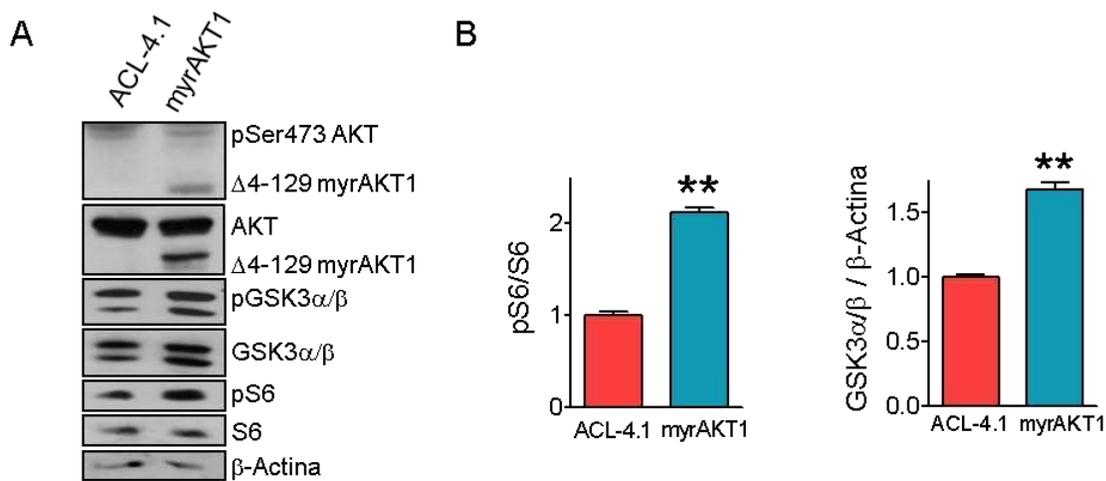


Fig. I.1: La sobreactivación de AKT1 en la línea celular IBH-7 induce la activación y expresión de proteínas reguladas por AKT. A) Extractos provenientes de células que expresan establemente una forma constitutivamente activada de AKT1 (myrAKT1) o el vector vacío (ACL-4.1) como control. Las células IBH-7-myrAKT1 presentan un aumento en la activación y/o en la expresión de proteínas río abajo de AKT, como S6 y GSK3 α/β . B) Cuantificación de WB provenientes de 3 extractos proteicos totales independientes. ** $p < 0,01$. β -actina se utilizó como control de carga. Los anticuerpos utilizados para determinar la fosforilación en Ser473 de AKT (pSer473 AKT) y AKT total reconocen la forma *wild type* endógena y la delecionada (Δ 4-129) de myrAKT1.

Al analizar el estado de los receptores hormonales, encontramos que la sobreactivación de AKT1 indujo un aumento en la expresión y en la activación del ER, (determinada por la fosforilación en Ser167) así como también en la fosforilación en Ser294 del PR (Fig. I.2A y B). Evaluamos la Serina 167 del ER porque es un sitio de fosforilación consenso de PI3K/AKT (Campbell et al. 2001). Hasta el momento no hay trabajos en la literatura que describan sitios de fosforilación en PR por PI3K/AKT.

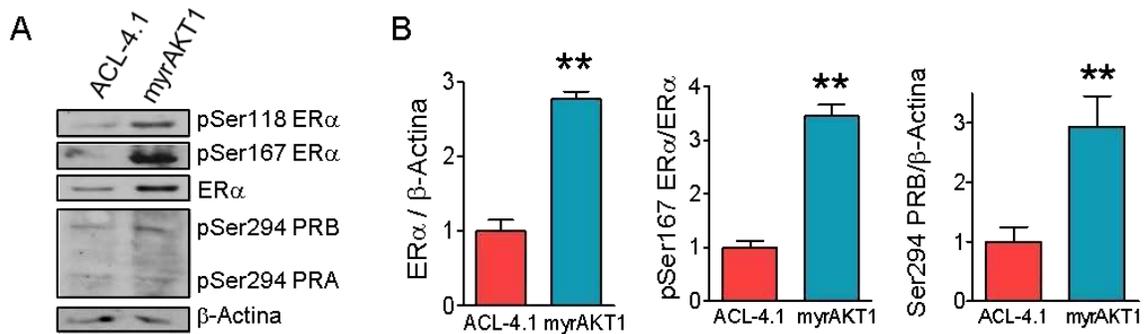


Fig. I.2: La sobreactivación de AKT1 en la línea celular IBH-7 induce la activación y expresión de receptores hormonales. A) Extractos provenientes de células que expresan establemente myrAKT1 o el vector vacío (ACL-4.1) como control. Las células IBH-7-myrAKT1 presentan un aumento en la fosforilación de la Ser167 del ER y un aumento en la expresión total de dicha proteína, así como también un aumento en la fosforilación en la Ser294 del PR. B) Cuantificación de WB provenientes de 3 extractos proteicos totales independientes. ** $p < 0,01$.

En cuanto a la morfología de las células, las IBH-7 *wt* son típicamente epiteliales. La sobreactivación de AKT1 incrementó la expresión de E-cadherina (Fig. I.3), que se vio reflejado en una mayor adhesión célula-célula y un menor tamaño celular.

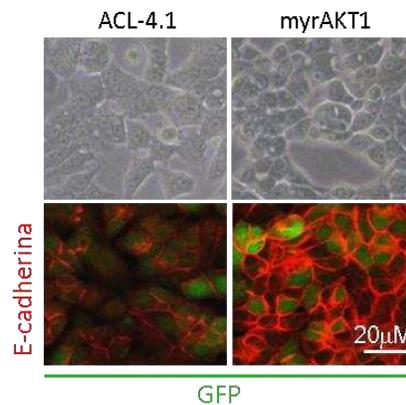


Fig. I.3: La sobreactivación de AKT1 aumenta la adhesión celular. Arriba: Micrografía en campo claro de las células creciendo en plástico. Las células IBH-7 myrAKT1 presentan una mayor adhesión célula-célula y un menor tamaño celular. Abajo: IF en las células IBH-7 myrAKT1 muestran un aumento en los niveles de E-cadherina (rojo). El color verde de las células se debe a la expresión de GFP presente en el plásmido ACL-4.1.

Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la capacidad tumorigénica de la línea IBH-7.

Con estos resultados obtenidos *in vitro*, decidimos estudiar el comportamiento de las células IBH-7 myrAKT1 *in vivo*. Para ello, inoculamos 10^7 células IBH-7 ACL-4.1 o IBH-7 myrAKT1, tanto en presencia como en ausencia de E₂ en ratones *nude*. Encontramos que, mientras que las células IBH-7 ACL-4.1 generaron tumores únicamente en presencia de E₂, las células que sobreexpresan AKT1 fueron capaces de generar tumores aún en ausencia del agregado exógeno de la hormona (Fig.I.4A). Las curvas de los tumores generados en presencia de E₂ fueron similares, independientemente de la presencia o no del AKT1, lo que sugiere que el efecto del E₂ es prevalente al del nivel de AKT1 induciendo el crecimiento tumoral.

Cuando los tumores alcanzaron el tamaño convenido de 50 mm² aproximadamente, los mismos fueron extirpados y procesados para su análisis histológico. En primer lugar se corroboró que los tumores mantuvieran la sobreactivación de AKT1 luego de casi dos meses de haber inoculado las células transformadas. Esto se realizó midiendo los niveles de pAKT y pS6 por inmunohistoquímica (Fig. I.4B). Si bien en los tumores IBH-7 ACL-4.1, crecidos en presencia de E₂, la vía de PI3K/AKT se encuentra activada, los tumores IBH-7 myrAKT1, presentaron mayores niveles de activación, tanto de AKT como de S6, aún en ausencia de la hormona.

El análisis histológico de los tumores no mostró diferencias significativas en la morfología de las células epiteliales (Fig. I.4C), ni en el grado nuclear (no mostrado). Sin embargo, el conteo de células mitóticas y apoptóticas demostró que los tumores myrAKT1 creciendo sin E₂ presentaron un mayor número de células en mitosis, pero también mayor cantidad de células apoptóticas que los otros dos grupos (Fig. I.4D). Esto podría explicar el hecho de que la curva myrAKT1 tenga una pendiente menor que la de los grupos creciendo con E₂.

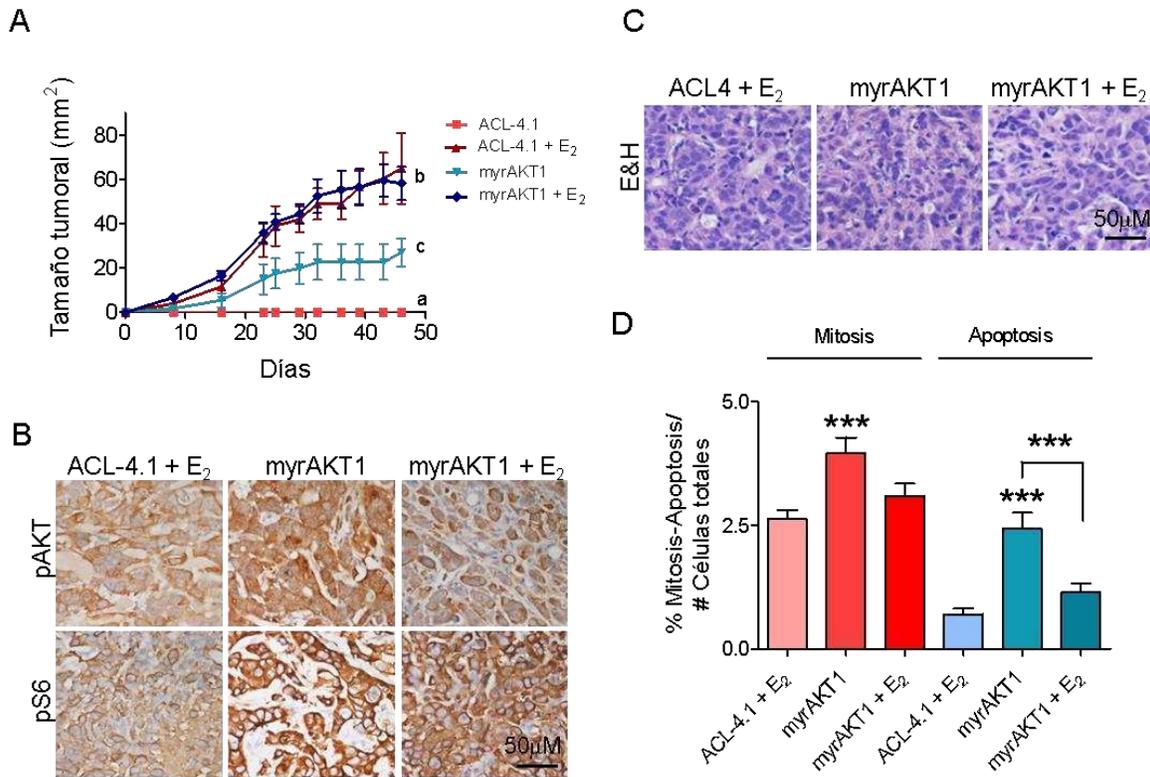


Fig. I.4: La sobreactivación de AKT1 promueve un crecimiento tumoral hormono-independiente. A) Las células IBH-7 myrAKT1 o IBH-7 ACL-4.1 fueron inoculadas en ratones *nude* en presencia o ausencia de E₂. Sólo las células que presentan sobreactivada la vía de PI3K/AKT fueron capaces de generar tumores en ausencia del agregado exógeno de E₂. B) IHQ de cortes provenientes de dichos tumores muestran que los tumores que tienen sobreactivado Akt1 mantienen la vía PI3K/AKT activada aún dos meses después de la inoculación. C) Hematoxilina Eosina de los tumores generados. D) Los tumores IBH-7 myrAKT1 presentan un mayor porcentaje de células en mitosis, así como también un mayor porcentaje de apoptosis, en comparación con los tumores que crecieron en presencia de E₂. n=6. Para la evaluación del % de mitosis y apoptosis se contaron 10 campos de cada tumor. a vs. c: p<0.05, b vs. c: p<0.01, ***; a vs. b: p<0,001.

Con estos resultados podemos concluir que en la línea IBH-7, al igual que en el modelo murino hormono-dependiente C4-HD, la sobreactivación de AKT1 es responsable de los cambios involucrados en los primeros eventos de la progresión tumoral, actuando a tres niveles. Además de la activación de diversas proteínas río abajo de AKT, como S6 o GSK3 β , que están involucradas en la sobrevida celular, encontramos que el aumento en la activación de AKT1 indujo una activación ligando-independiente

de los receptores hormonales ER y PR. Esta activación sería la responsable del crecimiento tumoral hormono-independiente, es decir, que ya no necesitaría del aporte exógeno de hormonas. Finalmente, encontramos que la activación de AKT1 indujo un aumento en la expresión de proteínas de unión célula-célula como E-cadherina, que sería inhibitorio de la invasión celular en los primeros estadios de la progresión tumoral.

Línea celular IBH-6

Con el objetivo de profundizar el análisis del efecto de la sobreactivación de AKT1 sobre los receptores hormonales, y evaluar si esta activación es la responsable directa de modificar la respuesta al tratamiento endócrino, utilizamos la línea celular de cáncer de mama humano IBH-6, que crece en forma hormono-independiente tanto in vitro como in vivo. El hecho de tener un modelo de crecimiento autónomo nos independiza del efecto del agregado exógeno de hormonas sobre los receptores hormonales.

La histología de los tumores generados por la inoculación de células IBH-6 *wild type* presenta dos poblaciones celulares bien diferenciadas, una con fenotipo epitelial, cuya morfología es típicamente poliédrica, y otra población sarcomatoide, con células de morfología fibroblástica, aunque positivas para citoqueratina 5/6 (Bruzzone et al. 2009).

Las células IBH-6 fueron transfectadas de forma estable con el vector ACL-4.1 myrAKT1, con el vector ACL-4.1 PTEN, o con el vector vacío ACL-4.1 (control).

La sobreactivación de AKT1 en la línea celular IBH-6 indujo, al igual que en la línea IBH-7 y en los cultivos C4-HD, un aumento en la activación y en la expresión de varias proteínas río abajo. Analizamos nuevamente S6 y GSK3 y observamos un aumento en la expresión y en la activación de dichas proteínas (Fig. I.5A y B). Como esperábamos, la sobreexpresión de PTEN inhibió la vía de PI3K/AKT, disminuyendo significativamente la activación de los sustratos (Fig. I.5A y B).

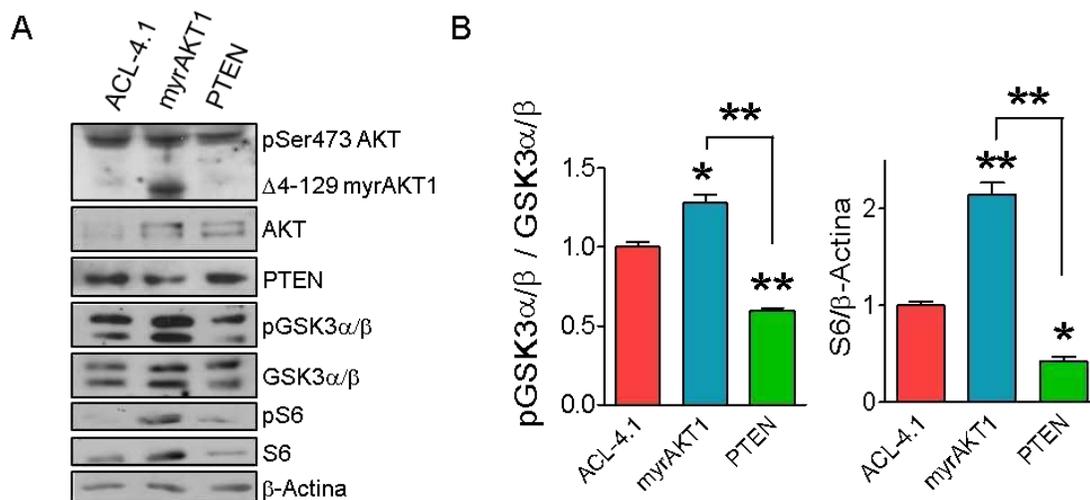


Fig. I.5: La sobreactivación de Akt1 en la línea celular IBH-6 induce la activación y expresión de proteínas reguladas por Akt. A) Extractos provenientes de células que expresan establemente una forma constitutivamente activada de Akt1 (myrAkt1), el supresor tumoral PTEN, o el vector vacío (ACL-4.1) como control. Las células IBH-6 myrAkt1 presentan un aumento en la activación y/o en la expresión de proteínas río abajo, como S6 y GSK3α/β, mientras que la inhibición de Akt por sobreexpresión de PTEN produce el efecto opuesto. B) Cuantificación de WB provenientes de extractos proteicos totales, n=3. * p<0,05, ** p<0,01. El anticuerpo utilizado para determinar la fosforilación en Ser473 de Akt (pSer473 Akt) reconoce la forma *wild type* endógena y la deletada (Δ4-129) de myrAkt1.

Al analizar los receptores hormonales, observamos que la modulación de la vía PI3K/AKT en la línea IBH-6 indujo una regulación en la expresión del ER y del PR. Mientras que la sobreactivación de AKT1 promovió una mayor expresión del ERα y de la isoforma B del PR, la inhibición de la vía con PTEN indujo el efecto opuesto (Fig. I.6A y B). El aumento en el nivel de fosforilación de la Ser167 del ERα se debe al aumento en el nivel de ERα total (Fig. I.6A y B).

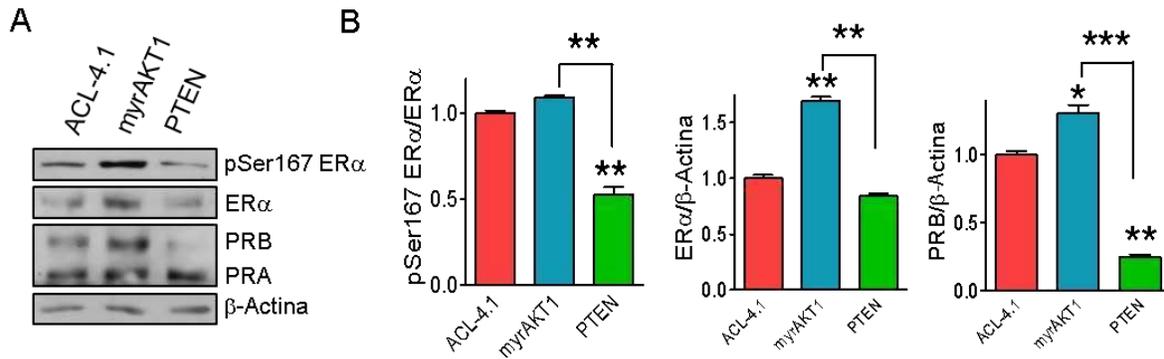


Fig. I.6: La sobreactivación de AKT1 en la línea celular IBH-6 induce la activación y expresión de receptores hormonales. A) Extractos provenientes de células que expresan establemente myrAKT1, el supresor tumoral PTEN, o el vector vacío (ACL-4.1) como control. Las células IBH-6 myrAKT1 presentan un aumento, mientras que las células IBH-6 PTEN presentan una disminución en la expresión de los receptores hormonales ER y PR. La sobreexpresión de PTEN indujo además una disminución en la fosforilación de la Ser167 del ER. B) Cuantificación de WB provenientes de extractos proteicos totales, n=3. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Analizamos la morfología de las células IBH-6 en cultivo, pero no encontramos cambios significativos en su estructura en 2D (no mostrado). Como estas células son de morfología ahusada, presentan muy bajos niveles de E-cadherina. Evaluamos entonces los niveles de FAK, quinasa de adhesión focal implicada en migración celular y encontramos que la activación constitutiva de AKT1 disminuyó los niveles de esta proteína, mientras que la sobreexpresión de PTEN la incrementó significativamente (Fig. I.7).

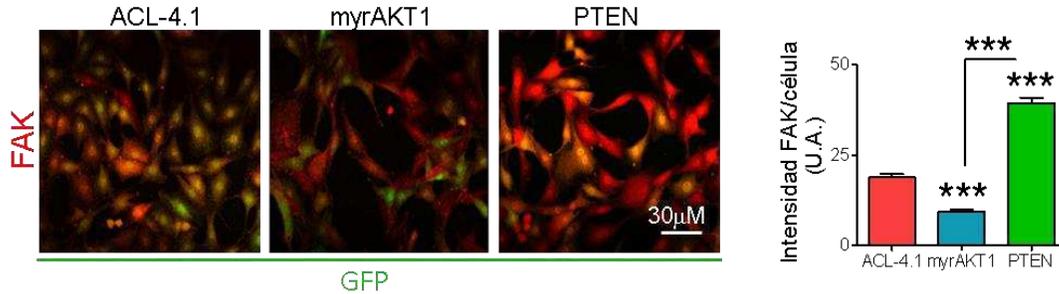


Fig. I.7: La sobreactivación de AKT1 en la línea celular IBH-6 disminuye los niveles de FAK. La sobreactivación de AKT1 indujo una disminución en los niveles de FAK, mientras que el aumento de PTEN incrementó significativamente dicha proteína. Izquierda: IF para FAK (rojo) en las células IBH-6 ACL-4.1, -myrAKT1 o -PTEN. El color verde de las células se debe a la expresión de GFP presente en el plásmido ACL-4.1. Derecha: Cuantificación de la intensidad de marca por célula. Se cuantificaron 10 fotos de cada línea. *** $p < 0,001$.

Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la capacidad tumorigénica de la línea IBH-6.

Analizamos primero la capacidad de las células IBH-6 de crecer en suspensión, mediante la formación de mamosferas. Este ensayo refleja el número de células con propiedades *stem* presentes en una población celular. Encontramos que la activación de AKT1 aumenta, mientras que su inhibición disminuye el número y el tamaño de las mamosferas formadas (Fig. I.8A). Este aumento en la pluripotencialidad por sobreactivación de AKT1 podría aumentar la tumorigenicidad *in vivo*.

En este trabajo, sabiendo que la línea IBH-6 es de crecimiento autónomo, nos interesó en especial analizar el efecto de AKT1 y de PTEN alterando el crecimiento tumoral para analizar si se reproduce lo obtenido en el modelo murino (Riggio et al. 2012). En aquel trabajo mostramos que los cultivos C4-HI, en los que la activación de la vía de PI3K/AKT es crucial para el crecimiento tumoral en ausencia de MPA, presentaron una menor tasa de crecimiento tumoral al ser transformados con PTEN. Para estudiar el efecto *in vivo* de la modulación de la vía PI3K/AKT, inoculamos 5×10^6

células IBH-6 ACL-4.1, -myrAKT1 o -PTEN en el flanco lateral izquierdo de ratones *nude*. Encontramos que la sobreactivación de AKT1 generó un crecimiento tumoral significativamente mayor que el de las células IBH-6 ACL-4.1 (Fig. I.8B). La histología de dichos tumores se analizará más adelante. Sin embargo, la sobreexpresión de PTEN no modificó la tasa de crecimiento tumoral respecto al grupo control. La incidencia, es decir, el porcentaje de ratones que desarrollaron tumor fue del 100% en los tres grupos. La latencia, es decir el tiempo de aparición de los tumores fue variable; mientras que los tumores IBH-6 ACL-4.1 tardaron alrededor de 14 días en ser palpables, los tumores IBH-6 myrAKT1 aparecieron, en promedio, en el día 8 post-inóculo. Los tumores IBH-6 PTEN en cambio, demoraron alrededor de 18 días (Fig. I.8C). Debemos destacar que ninguno de los ratones desarrolló metástasis al tiempo de sacrificio (aproximadamente 50 días post-inóculo).

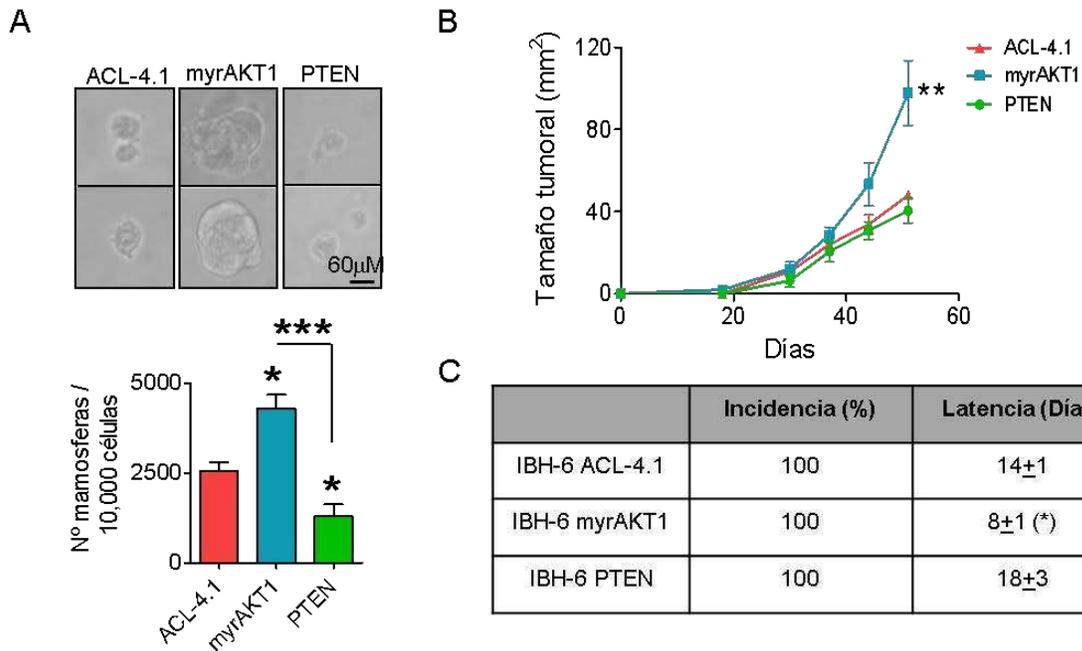


Fig. 1.8: La sobreactivación de AKT1 en las células IBH-6 aumenta el fenotipo *stem* y promueve el crecimiento tumoral. A) Las células IBH-6 ACL-4.1, -myrAKT1 o -PTEN fueron cultivadas en un medio que favorece el crecimiento en suspensión de células con fenotipo *stem*. Luego de 60 días se evaluó el tamaño y se cuantificó el número total de mamosferas. La sobreactivación de AKT1 aumenta, mientras que la sobreexpresión de PTEN disminuye la cantidad de mamosferas. B) Las células IBH-6 fueron inoculadas en ratones *nude* sin el agregado de hormonas por tratarse de una línea hormono-independiente. Las células IBH-6 myrAKT1 generaron tumores con una mayor tasa de crecimiento que las células control. La sobreexpresión de PTEN no modificó el crecimiento tumoral. C) Incidencia (% de ratones en los que se desarrolló tumor) y latencia (tiempo de aparición) de los tumores generados por manipulación de la vía PI3K/AKT. La sobreactivación de AKT1 disminuyó la latencia, mientras que sobreexpresión de PTEN generó tumores más tardíamente que el control. La incidencia tumoral no se modificó. n=6.* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Como resumen de lo analizado en la línea IBH-6 concluimos que la sobreactivación de AKT1 indujo, además de la activación de algunas proteínas *target*, como S6 y GSK3, un aumento en la activación y en la expresión de los receptores hormonales ER y PR, fundamentales para la proliferación celular de la glándula mamaria. Encontramos además que la activación de AKT1 incrementó el número de células con propiedades *stem*. Todos estos cambios contribuyeron a la generación de tumores cuyo

período de latencia fue menor que el de las células *wt*, y con una tasa de crecimiento significativamente mayor. La sobreactivación de PTEN en cambio, aunque modificó la expresión de proteínas río abajo de AKT, así como también los niveles de receptores hormonales, no fue suficiente para inhibir el crecimiento tumoral de la línea IBH-6.

Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la sensibilidad endócrina de la línea IBH-6.

El modelo IBH-6 en el que sobreactivamos AKT1 fue adecuado para estudiar la asociación entre la vía de PI3K/AKT y el fenómeno de resistencia endócrina, por no necesitar esta línea del agregado exógeno de E₂ para su crecimiento.

Como mencionamos en la Introducción, la vía de PI3K/AKT se encuentra un alto porcentaje de los carcinomas mamarios y esta sobreactivación se asocia con la resistencia a la terapia endócrina. Como objetivo de esta parte del trabajo nos propusimos evaluar si la sobreactivación de la isoforma AKT1, que mostramos induce la activación de los receptores hormonales en ausencia de ligando y un mayor crecimiento tumoral, es responsable de alterar la respuesta de los tumores mamarios a inhibidores hormonales y de generar resistencia a la terapia endócrina.

Estudiamos en primer lugar la respuesta *in vitro* de las células al tratamiento con ICI182780 (Fulvestrant), un antagonista del ER; al tratamiento con Rapamicina, un inhibidor de mTOR; o la combinación de ambos. Encontramos que la línea IBH-6 ACL-4.1 inhibe su crecimiento al ser tratada con ICI pero no con Rapamicina, en comparación con las células sin tratamiento (control) (Fig. I.9A). La sobreactivación de AKT1 en la línea IBH-6 *myrAKT1* en cambio, conlleva una disminución en la sensibilidad al tratamiento con ICI (Fig. I.9B). En estas células el tratamiento con Rapamicina *per se* tal como esperábamos, induce una disminución de la proliferación y, sorprendentemente, restituye la sensibilidad al ICI siendo el efecto del tratamiento combinado mayor al de cada droga administrada individualmente.

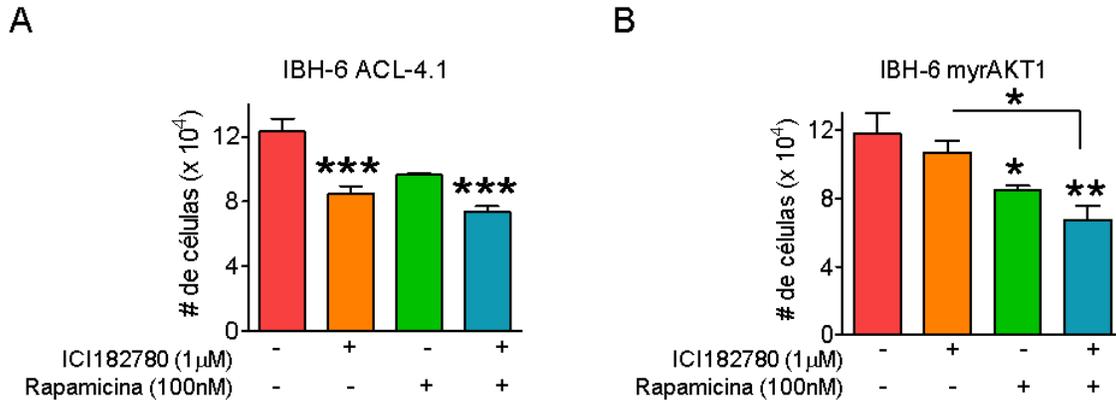


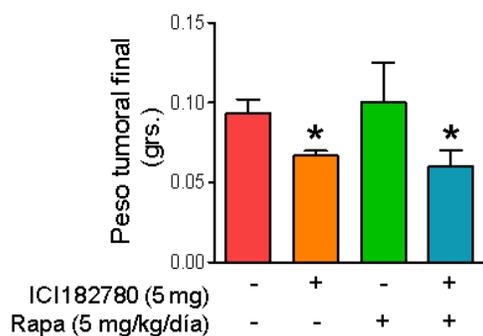
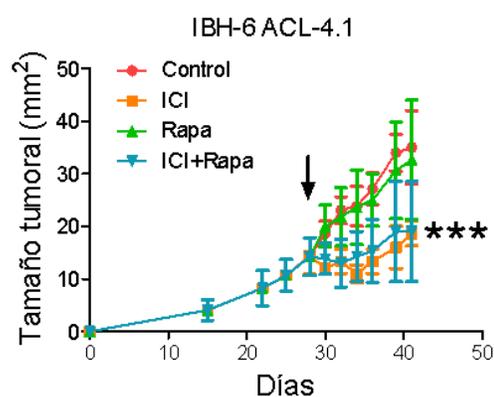
Fig. I.9: La sobreactivación de la vía de PI3K/AKT1 en la línea IBH-6 disminuye la sensibilidad al tratamiento endócrino y favorece la sensibilidad al tratamiento con un inhibidor selectivo de la vía. El tratamiento combinado restituye la sensibilidad endócrina en dichas células. Las células IBH-6 ACL-4.1 o -myrAkt1 fueron tratadas por 72 hs. con el antiestrógeno ICI182780 (ICI, Fulvestrant, 1mM), el inhibidor de mTOR Rapamicina (100nM), o la combinación de ambos. Al finalizar el tratamiento se contó el número remanente de células en cada *well*. A) Las células IBH-6 ACL-4.1 inhiben su crecimiento al ser tratadas con el antiestrógeno. Sin embargo, no responden significativamente al inhibidor de mTOR. B) Al sobreactivar AKT1 las células disminuyen la proliferación en presencia de Rapamicina, pero pierden la sensibilidad al tratamiento con ICI. Sin embargo, el tratamiento combinado con Rapamicina devuelve la sensibilidad al antiestrógeno. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A continuación, testamos el efecto de estos tratamientos sobre las células IBH-6 creciendo como xenotransplantes. Primero debemos destacar que al inocularse en ratones, las células IBH-6 myrAKT1 generaron tumores con una tasa de crecimiento mayor que las células control IBH-6 ACL-4.1, tal como lo muestran los tamaños tumorales (Fig. I.10A y B), ídem a lo mostrado en la Fig. I.8B. Con respecto al tratamiento con antiestrógenos, teníamos como antecedente lo que describió el grupo de la Dra. Lüthy (Bruzzone et al. 2009), donde el tratamiento de tumores IBH-6 con Tamoxifeno disminuye significativamente su crecimiento. En dicho trabajo la inhibición fue observada administrando el Tamoxifeno desde el día 1 post-inóculo. En nuestro caso, el tratamiento con ICI, Rapamicina, o la combinación de ambos comenzó cuando los tumores ya eran palpables para asemejar a lo que ocurre en la clínica. Semejante a lo

observado en cultivo, los tumores IBH-6 ACL-4.1 inhibieron su crecimiento al ser tratados con ICI, pero no con Rapamicina (Fig. I.10A, izquierda). También como se observó en cultivo, los tumores IBH-6 myrAKT1 no respondieron a ICI, es decir que el aumento en los niveles de AKT1 generó resistencia al antiestrógeno utilizado (Fig. I.10A, derecha). Sin embargo, el tratamiento con Rapamicina disminuyó significativamente el crecimiento tumoral IBH-6 myrAKT1, similar al efecto del tratamiento combinado. El peso tumoral final (gráficos inferiores en la Fig. I.10A y B) confirma los resultados observados en las curvas de crecimiento.

Es decir, la sobreactivación de AKT1 modifica la sensibilidad de los tumores; disminuye la sensibilidad a inhibidores hormonales y aumenta la sensibilidad a inhibidores de la vía PI3K/AKT.

A



B

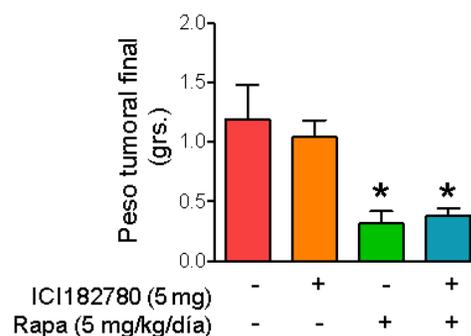
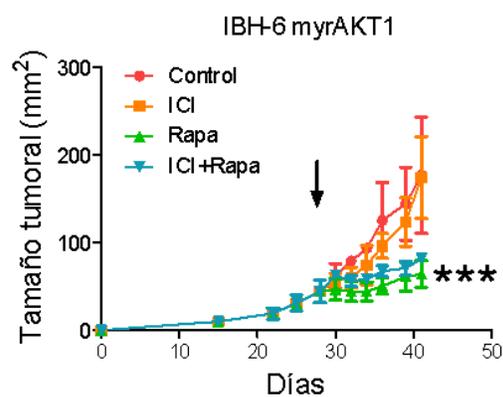


Fig. I.10: La sobreactivación de AKT1 en la línea celular IBH-6 creciendo como xenotransplante induce resistencia endócrina. Las células A) IBH-6 ACL-4.1 o B) -myrAKT1 fueron inoculadas en ratones inmunosuprimidos y cuando los tumores alcanzaron un tamaño de entre 30 y 50 mm² comenzaron los tratamientos con ICI (5mg), Rapa (5mg/kg/día) o la combinación de ambos. Los tratamientos fueron realizados por 15 días y el tamaño tumoral se midió cada dos días para realizar la curva de Tamaño tumoral vs. Tiempo (arriba). Las flechas indican el inicio de los tratamientos. Los tumores control IBH-6 ACL-4.1 respondieron al tratamiento con el antiestrógeno pero no al tratamiento con el inhibidor de mTOR. La sobreactivación de AKT1 en los tumores IBH-6 myrAKT1 vuelve a estos tumores resistentes a la inhibición hormonal, pero sensibles al inhibidor de mTOR. La Rapa sola o en combinación con el ICI tuvo un efecto inhibitorio del crecimiento IBH-6 myrAKT1. Finalizado el experimento, se sacrificaron los animales y se pesaron los tumores para confirmar los resultados (abajo). Este ensayo se realizó por duplicado, con tres animales por experimento. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

El análisis por *western blot* mostró que los tumores IBH-6 myrAKT1 que respondieron a Rapamicina presentaron una menor activación de AKT y de proteínas río abajo, como S6 (Fig. I.11B). Los tumores IBH-6 ACL-4.1 presentaron una menor expresión del ER luego de los tratamientos con Rapamicina o con ICI, sin embargo sólo el ICI acompaña esta disminución con una reducción en el tamaño tumoral (Fig. I.11A). Es interesante destacar también que la expresión del ER α en los tumores IBH-6 myrAKT1 es refractaria al efecto del ICI.

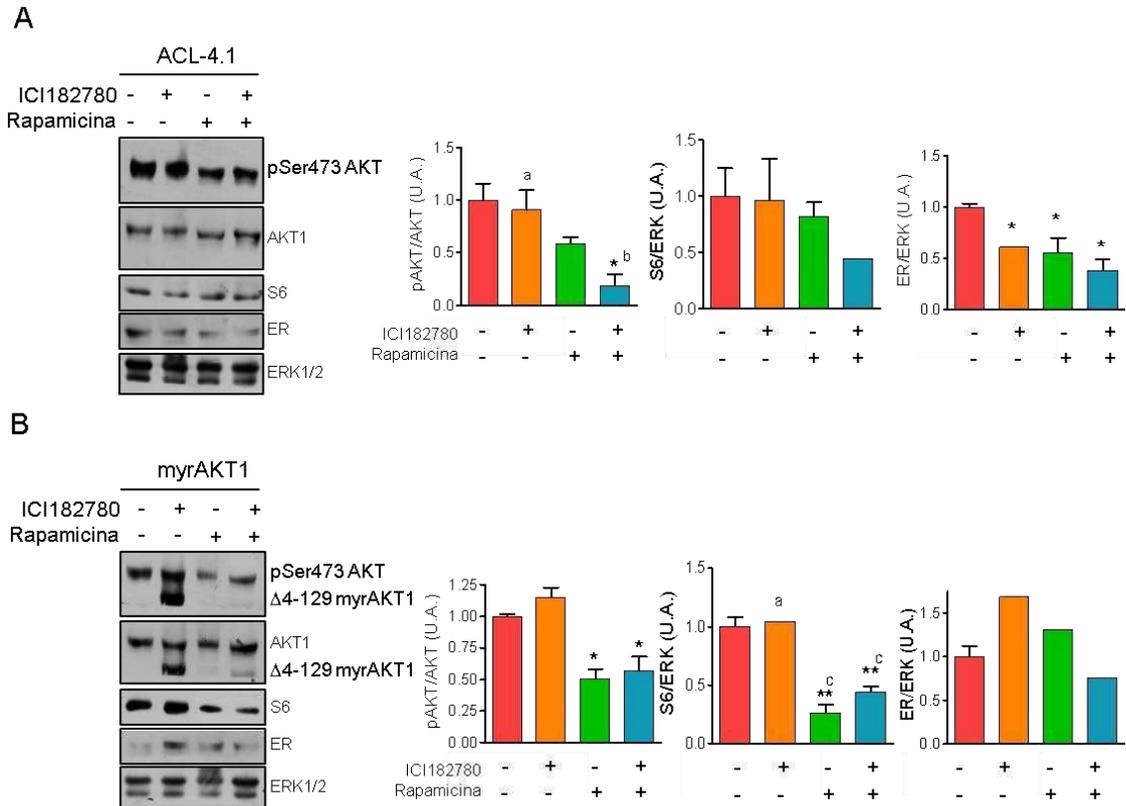


Fig. I.11: La Rapamicina disminuye la activación de AKT y el nivel de S6 en tumores IBH-6 myrAKT1. El ICI182780 disminuye el nivel de ER α en tumores IBH-6 ACL-4.1. Extractos proteicos provenientes de tumores A) IBH-6 ACL-4.1 y B) -myrAKT1 tratados con ICI182780 y/o Rapamicina fueron analizados por WB para evaluar las vías afectadas en cada caso. Los tumores que respondieron al tratamiento con Rapamicina presentaron una menor activación y/o expresión de la vía PI3K/AKT. Los tumores que respondieron al tratamiento con ICI presentaron una menor expresión de ER α . Los gráficos de barras representan la cuantificación de los WB respectivos *, a vs. b: $p < 0.05$; **, a vs. c: $p < 0.01$.

Efecto de la sobreactivación de AKT1 en la histología de xenotranplantes de la línea IBH-6.

La histología de los tumores generados a partir de las células IBH-6 fue significativamente diferente según los niveles de AKT1. Mientras que los tumores IBH-6 ACL-4.1 presentaron la morfología típica para IBH-6, con presencia de ambas poblaciones celulares, una menor proporción de células de tipo epitelial, poliédricas, y

una mayor proporción de células con morfología sarcomatoide, los tumores IBH-6 myrAKT1 presentaron una mayor proporción de células epiteloides (Fig. I.12A). Dichas células resultaron además ser positivas para pS6, lo que podría indicar que la sobreactivación de AKT1 promueve la proliferación del componente epitelial, y este incremento podía ser el responsable de las diferencias observadas en las curvas de crecimiento de la Figura I.8B. Otro resultado interesante que surge de la sobreactivación de AKT1 es que al incrementarse la población epiteloide dichos tumores presentan mayor grado nuclear que los tumores control (Fig. I.12C). El grado nuclear evalúa el tamaño y forma de los núcleos, siendo los de mayor grado, de crecimiento más rápido, hecho que se confirma con las curvas de la Fig. I.8B y I.10A vs. B).

En cuanto a los tratamientos realizados lo que observamos es que la Rapamicina afecta a ambas poblaciones celulares de forma diferencial: el componente epiteloide tiende a desaparecer (esto puede observarse en la tinción con Hematoxilina-Eosina como una menor proporción de células poliédricas, y en la IHQ con menor marca para pS6), mientras que el componente sarcomatoide sufre una degeneración que involucra liberación de mucina al espacio extracelular. Esta mucina resultó positiva para la tinción de Alcian Blue (AB) y negativa para Periodic Acid Schiff (PAS), siendo entonces mucopolisacáridos ácidos los predominantes en este compartimento (Fig. I.12A).

Por último podemos mencionar que si bien la Rapamicina no produjo una disminución en el tamaño de los tumores IBH-6 ACL-4.1, sí generó una remodelación del tejido fusocelular al igual que en los tumores IBH-6 myrAKT1, razón por la cual el grado nuclear resultó menor en todos los tumores tratados con este inhibidor (Fig. I.12C).

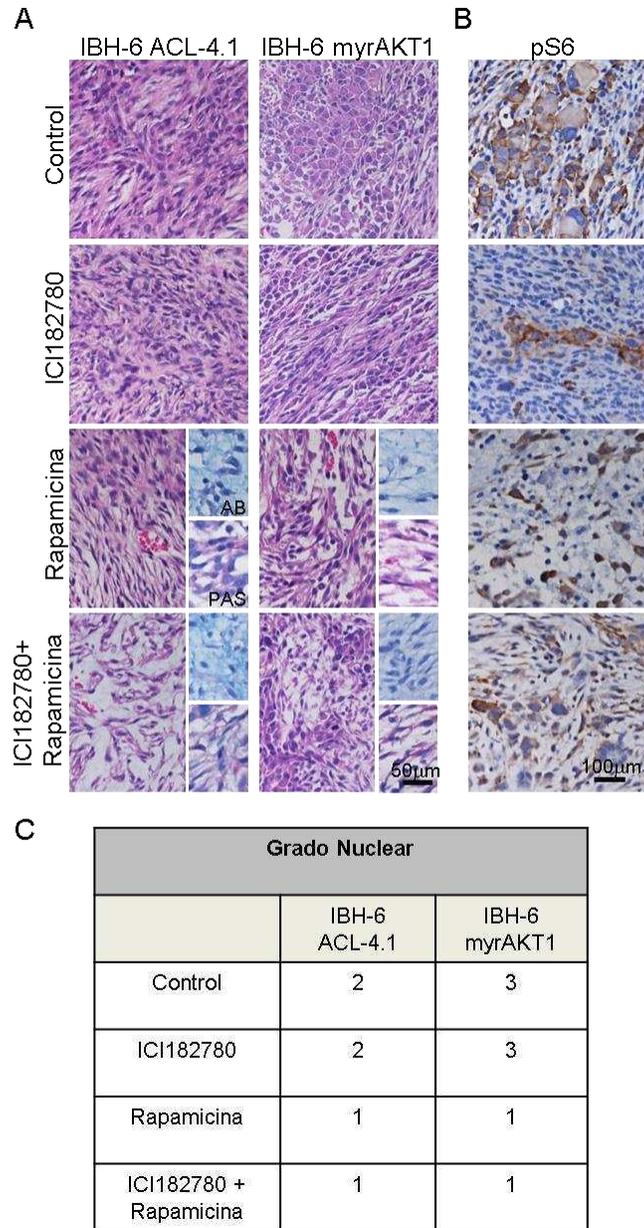


Fig. I.12: La sobreactivación de AKT1 induce cambios morfológicos en los tumores IBH-6.

A) Hematoxilina-Eosina de los tumores al finalizar los tratamientos. Los tumores IBH-6 myrAKT1 presentan una mayor proporción de células epiteloides que los -ACL-4.1, que son de tipo sarcomatoide. El tratamiento con Rapamicina induce una disminución del componente epiteloides, y una degeneración del componente sarcomatoide, con liberación de mucina al espacio extracelular, positiva para Alcian Blue (AB), y negativa para Periodic Acid Shiff (PAS). B) IHQ contra pS6 de los tumores IBH-6 myrAKT1, donde se ve que las células positivas son epiteliales. C) Cuadro comparativo del grado nuclear de los tumores. La sobreactivación de AKT1 genera tumores de mayor grado nuclear.

Como resumen de esta parte de resultados podemos decir que la sobreactivación de AKT1 indujo resistencia al antiestrógeno ICI, la cual pudo ser revertida al combinarse con el inhibidor específico de mTOR, Rapamicina. Además, cabe destacar que la histología de los tumores con sobreactivación de AKT1 resultó ser diferente a la de los tumores control, con una mayor proporción de células epiteliales y mayor grado nuclear. Dicho componente epitelial fue significativamente más afectado por el tratamiento con Rapamicina que el componente sarcomatoide. La población sarcomatoide, por efecto de la Rapamicina, degeneró liberando una sustancia de origen mucopolisacárido ácido.

Como conclusión de esta parte de los resultados podemos decir que la línea IBH-6 resultó un buen modelo para estudiar cómo la activación de la vía PI3K/AKT, en particular de la isoforma AKT1, es la responsable de alterar la respuesta hormonal de los tumores y de generar resistencia a la terapia endócrina. Cuando AKT1 está activada, la terapia combinada de Rapamicina e ICI tiene un efecto aditivo en disminuir la proliferación celular, lo que demuestra la posibilidad de revertir la resistencia mediante la incorporación de inhibidores específicos de la vía. Para sumar evidencias a esta conclusión, en otro modelo experimental, el de la línea celular humana de cáncer de mama T47D hemos comprobado también que la sobreactivación de AKT1 interfirió con la sensibilidad a la terapia con Mifepristona (antagonista del PR) (Polo et al. 2015), lo cual extiende nuestros resultados a otros modelos experimentales y a otras terapias endócrinas.

Todos los resultados presentados hasta aquí demuestran entonces que AKT1 tiene un rol preponderante en la proliferación y supervivencia celular, y que sería el responsable del crecimiento tumoral hormono-independiente por activación de los receptores hormonales aún en ausencia de ligando, un paso previo a la resistencia endócrina observada en la clínica. También es importante destacar que en todos los modelos analizados, AKT1 modifica la morfología de la célula hacia un fenotipo con diferenciación glandular y menos invasivo, aumentando incluso la expresión de algunos

marcadores de diferenciación como laminina I y E-cadherina, y disminuyendo la expresión de la proteína de invasión FAK. Algunos de estos resultados se han publicado en (Riggio et al. 2012).

CAPÍTULO II

Rol de AKT1 y AKT2 en la migración e invasión celular durante la progresión tumoral.

Efectos en cultivo celular

En el Capítulo I estudiamos el rol de PI3K/AKT en el crecimiento tumoral y comprobamos que la activación de AKT1 es suficiente para generar tumores de crecimiento hormono-independiente, por activación de proteínas involucradas en supervivencia celular como S6 y GSK3 β y por activación ligando-independiente de los receptores hormonales ER y PR. En el presente Capítulo analizaremos el rol específico de las isoformas 1 y 2 de AKT en la progresión tumoral en cáncer de mama, más específicamente en la migración e invasión celular. El abordaje experimental que utilizamos para esta parte del trabajo es el silenciamiento estable y específico de cada isoforma para determinar su acción diferencial por pérdida de función.

En primer lugar generamos partículas lentivirales que contienen las construcciones para silenciar específicamente *AKT1* (shAKT1) o *AKT2* (shAKT2), e infectamos la línea celular IBH-6, utilizada anteriormente. Algunos de los resultados fueron además validados en la línea celular T47D, y serán analizados más adelante. En todos los ensayos se utilizaron como control células infectadas con un vector cuya secuencia no se une a ninguna secuencia conocida del genoma (shco). Una vez seleccionadas las células que incorporaron en forma estable la construcción, comprobamos que efectivamente estuvieron silenciadas por *western blot* e inmunofluorescencia (Fig. II.1A y B, respectivamente).

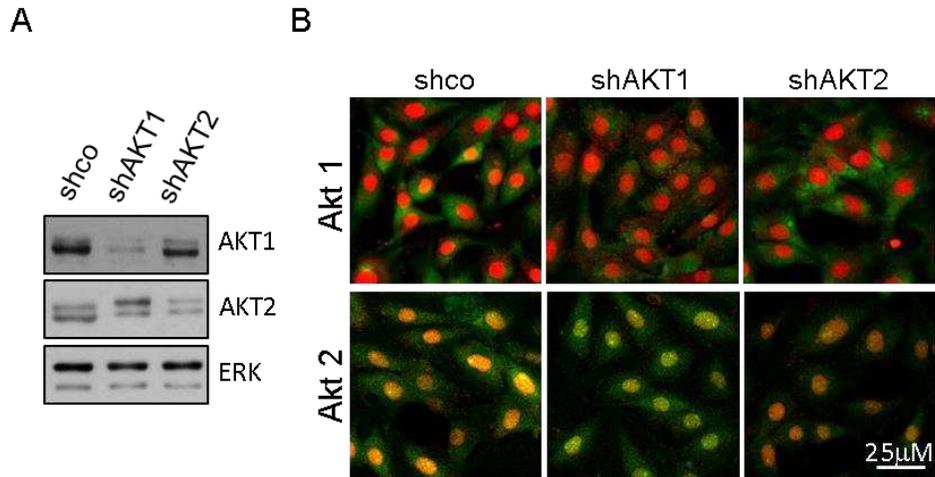


Fig. II.1: Silenciamiento de AKT1 o AKT2 en la línea celular IBH-6. Las células fueron transfectadas en forma estable con un shRNA para AKT1 (shAKT1) o AKT2 (shAKT2) o control (shco). El silenciamiento de las isoformas de AKT1 o AKT2 en la línea IBH-6 fue corroborado por A) WB realizados a partir de extractos celulares totales y utilizando anticuerpos específicos para cada isoforma y B) IF. Los núcleos se contratiñeron de rojo con IP.

A continuación, evaluamos el efecto del silenciamiento de cada isoforma en la proliferación celular en cultivo. Para ello sembramos las distintas líneas celulares en igual cantidad y evaluamos la velocidad de crecimiento a lo largo de 96 horas. El silenciamiento de AKT1 tiene un efecto inhibitorio mayor que el silenciamiento de AKT2 en la línea IBH-6, evaluado por conteo celular (Fig. II.2A) y por tinción con Ki67 (Fig. II.2B), un marcador de proliferación que se encuentra expresado en todas las fases del ciclo celular excepto en G₀. Mediante *western blot* de extractos provenientes de dichas células comprobamos que la inhibición de AKT1, pero no de AKT2 indujo una disminución en la expresión de ciclina D1 (Fig. II.2C) y en la activación y expresión de S6 (Fig. II.2D), lo que podría explicar la menor tasa de proliferación observada en los cultivos IBH-6 shAKT1. Estos resultados coinciden con los del laboratorio de Muller y colaboradores que describieron un aumento de la tumorigénesis mamaria por sobreactivación de AKT1, a través de ciclina D1 (Hutchinson et al. 2004).

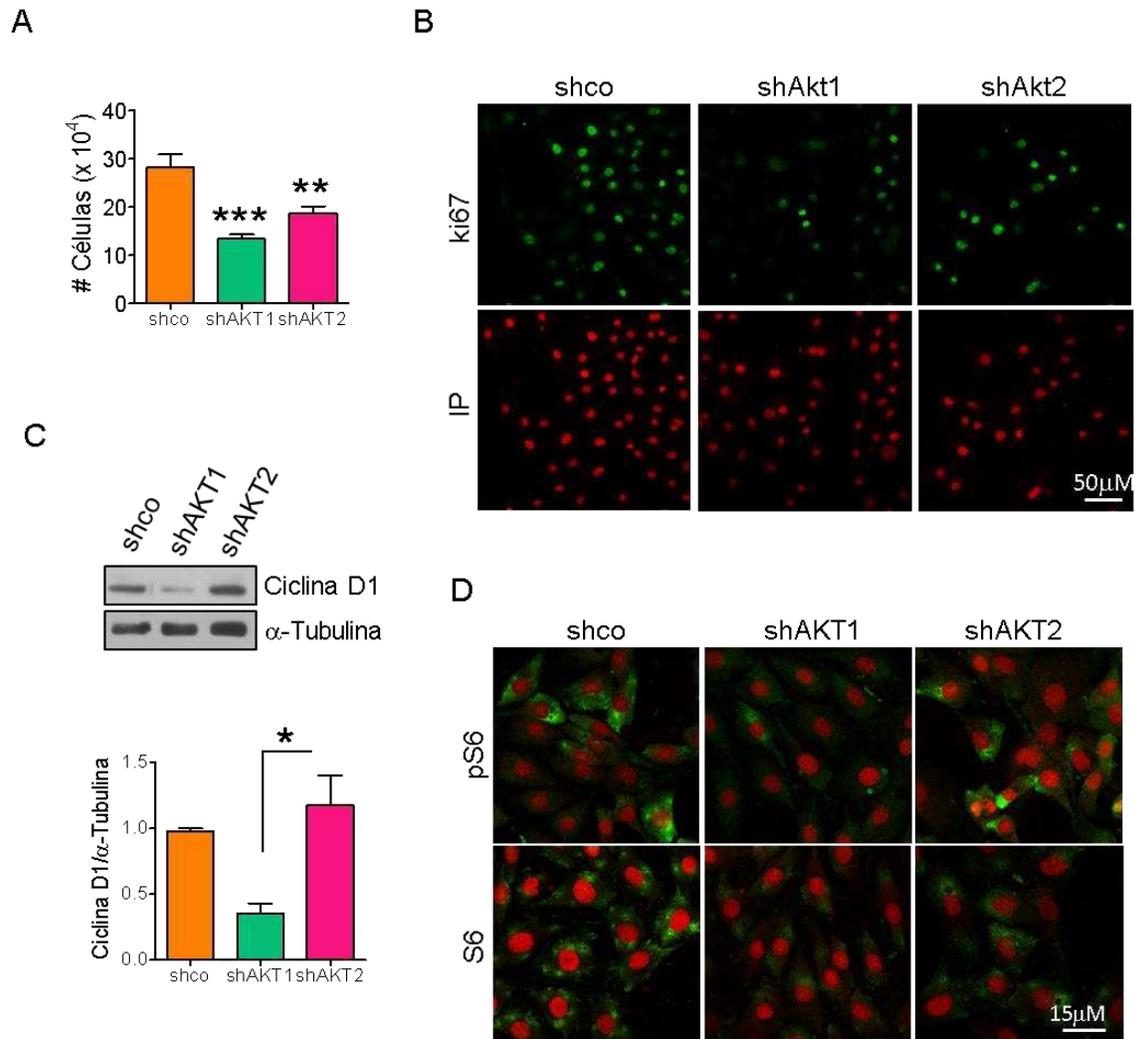


Fig. II.2: El silenciamiento de AKT1, pero no de AKT2, interfiere con la proliferación de la línea celular IBH-6 a través de disminuir los niveles de S6 y ciclina D1. El silenciamiento de AKT1 tuvo un efecto mayor sobre la proliferación celular que el silenciamiento de AKT2, analizado por A) conteo celular y por B) tinción con Ki67 (verde). La disminución de la proliferación celular inducida por el silenciamiento de AKT1 está regulada por C) Ciclina D1, medido por WB y por D) S6, medido por IF. Los núcleos fueron contrateñidos con IP. La cuantificación de los WB se realizó con extractos provenientes de tres muestras independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La sobreactivación de AKT2 (Fig. II.3A) no generó un cambio en la proliferación celular respecto de las células control, como sí lo hizo la sobreactivación de AKT1 (Fig.

II.3B). Este resultado obtenido en las células IBH-6 myrAKT1 es consistente con el ensayo *in vivo* realizado en ratones *nude* (Capítulo I, Fig. I.7B).

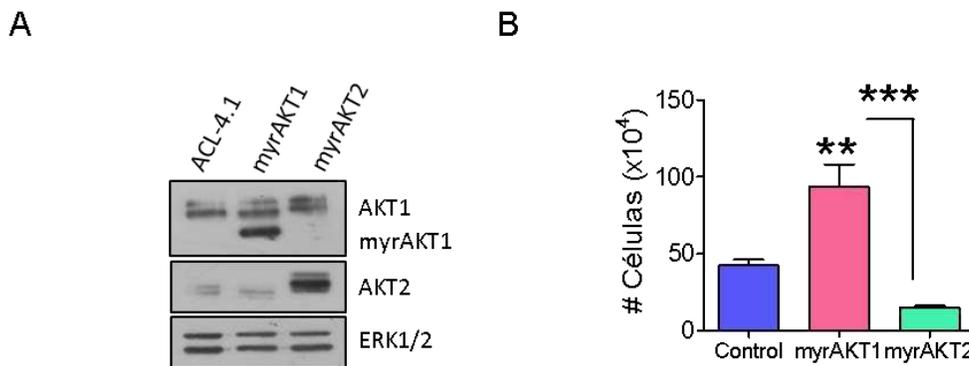


Fig. II.3: La sobreactivación de AKT1, pero no de AKT2, aumenta la proliferación celular de la línea IBH-6. Las células IBH-6 fueron transfectadas en forma estable con myrAKT1 o myrAKT2. Ambos plásmidos contienen una secuencia de myristoilación río arriba de la secuencia de AKT que mantiene a la proteína constitutivamente activada. A) WB realizados a partir de extractos celulares totales y revelados contra AKT1 o AKT2 (anticuerpos específicos). B) Ensayo de proliferación por conteo celular. Las células que sobreexpresan AKT1 presentan una mayor velocidad de crecimiento celular respecto de las células control *wt* y de las células myrAKT2. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En cuanto al rol de AKT en la migración celular, y habiendo trabajos que relacionan mayormente a AKT2, a través de distintos efectores, con este fenómeno (ver Introducción) decidimos evaluar el rol de las isoformas 1 y 2 de AKT en la adhesión al sustrato, la migración e invasión celular en la línea IBH-6.

Comenzamos analizando si la inhibición de alguna de las isoformas de AKT modifica la morfología de las células en 2 dimensiones (2D). Encontramos que, mientras que las células IBH-6 shAKT1 tienen una morfología muy similar a las IBH-6 shco, las células IBH-6 shAKT2, presentan un tamaño menor, aunque mantienen la morfología ahusada (Fig. II.4A). Esta diferencia en tamaño podría asociarse a que AKT2 regula el ingreso de glucosa a la célula, a través de la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática, en músculo, adipocitos y células respondedoras a insulina (Gonzalez and McGraw 2009).

La tinción con Faloidina, una proteína que se une a la actina polimerizada (F-actina) demostró que las células IBH-6 shAKT2 tienen una menor concentración de F-actina, en especial en los bordes de la célula (Fig. II.4B). La marca intensa en las fibras de actina que se observa en las células -shco y -shAKT1, pero no así en las -shAKT2, podría ser indicativo de una activa polimerización y despolimerización del citoesqueleto que la célula realiza para migrar. En línea con este resultado, el grupo de Vandermoere describió en 2006 una asociación entre la activación de PI3K/AKT, la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración celular en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, aunque sin discriminar entre isoformas (Vandermoere et al. 2007). Analizamos también los niveles de vimentina, otra proteína del citoesqueleto cuya expresión se asocia con el fenotipo invasivo. Encontramos, al igual que para F-actina, que las células IBH-6 shAKT2 presentaron niveles menores de expresión de vimentina (Fig. II.4C). Además, las células que tienen silenciada la isoforma AKT1 presentaron una polarización de dicha proteína, localizándose preferencialmente hacia un extremo de la membrana (Fig. II.4C, centro). La mayor expresión de vimentina en un extremo de la célula IBH-6 shAKT1 podría coincidir con el extremo por el cual la célula comienza a migrar e invadir. Esta posibilidad deberá ser analizada en futuros experimentos.

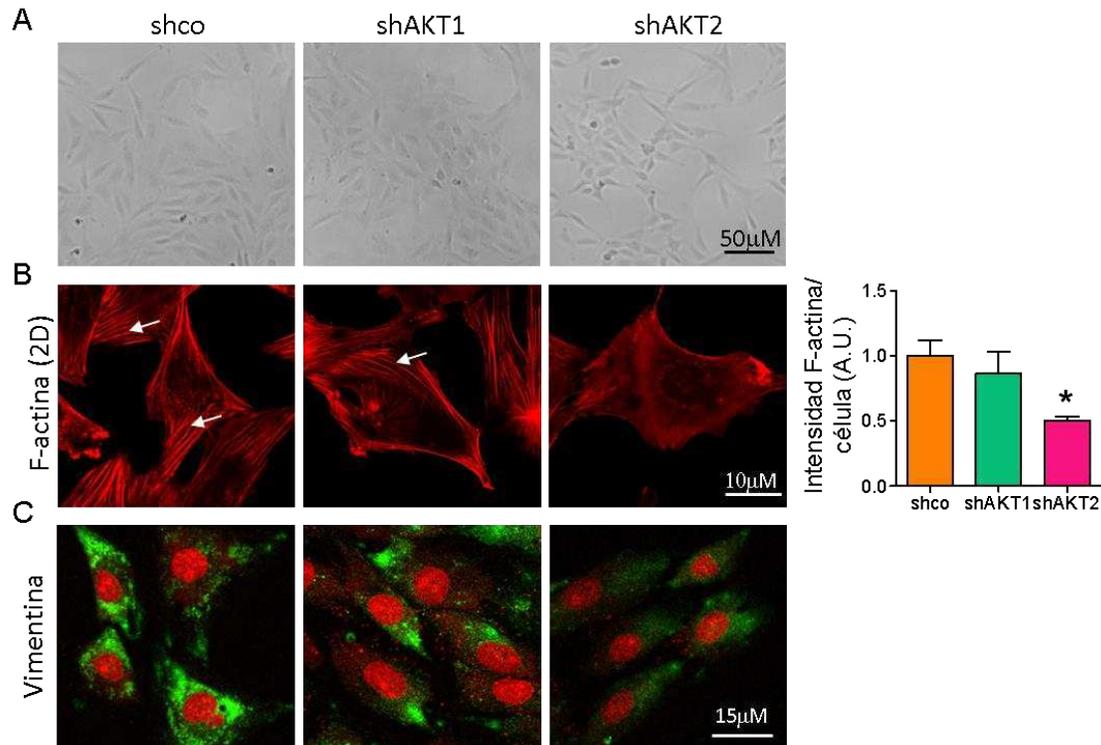


Fig. II.4: El silenciamiento de AKT2 reduce la adhesión celular al sustrato. A) Fotografía en campo claro de células IBH-6 creciendo adheridas a la placa. Las células IBH-6 shAKT2 presentan un menor tamaño comparadas con las células control (shco). El silenciamiento de AKT1 en IBH-6 no produce cambios en la morfología celular en 2D. B) IF para F-actina (en rojo) en las células adheridas a la placa. Tanto las células control -shco como las -shAKT1 presentan alta expresión de F-actina. Las flechas blancas señalan las fibras de actina, indicativo de activa polimerización y despolimerización del citoesqueleto. El silenciamiento de AKT2 disminuye la expresión de F-actina. C) Los niveles de vimentina (en verde) acompañan a los de F-actina; mientras que las células IBH-6 shAKT2 expresan menores niveles de vimentina que las células control, las células -shAKT1 presentan un patrón de expresión polarizado. Los núcleos se contratiñeron en rojo con IP. * $p < 0,05$.

El análisis morfológico de las células que sobreexpresan AKT1 (myrAKT1) o AKT2 (myrAKT2) mostró, contrariamente al efecto de su inhibición, que la sobreactivación de AKT2 confiere a las células un tamaño mayor (Fig. II.5A) y un aumento en los niveles de F-actina (Fig. II.5B). AKT1 por otro lado, no modifica ni el aspecto de las células en cultivo bidimensional, ni la expresión de F-actina. Estos

resultados nos confirman que es AKT2 la isoforma que estaría regulando preferencialmente al citoesqueleto de actina y la adhesión celular al sustrato.

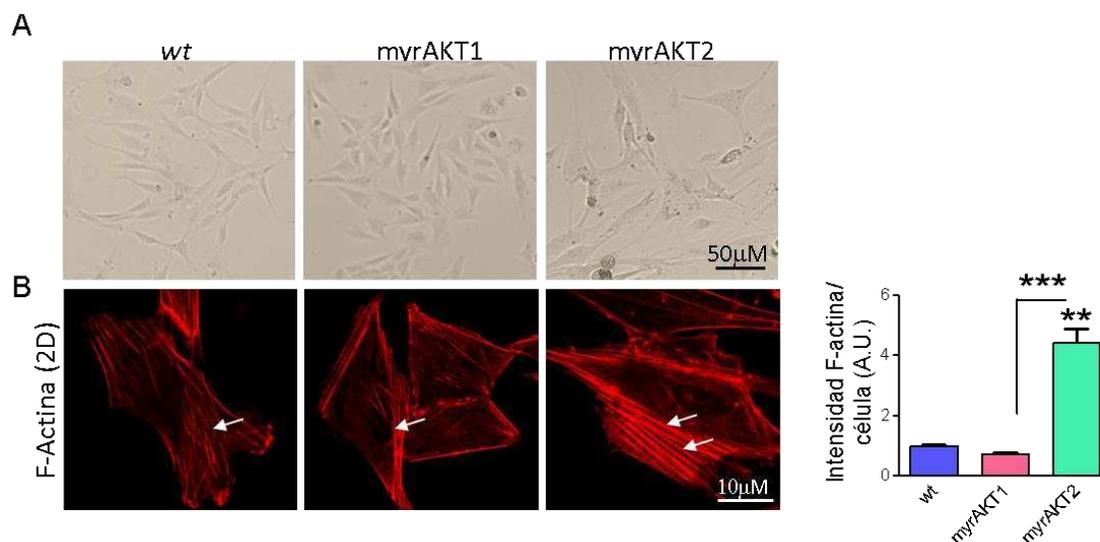


Fig. II.5: La sobreactivación de AKT2 aumenta la adhesión celular al sustrato. A) Fotografías en campo claro de células IBH-6 creciendo adheridas a la placa. Las células IBH-6 myrAKT2 presentan un mayor tamaño en comparación a las células control. La sobreactivación de AKT1 en IBH-6 no produce cambios en la morfología celular en 2D. B) IF para F-actina en las células adheridas a la placa. Las células que sobreexpresan AKT2 presentan mayor expresión de F-Actina (en rojo). Las flechas blancas señalan las fibras de actina, indicativo de activa polimerización y despolimerización del citoesqueleto. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A pesar de no observar cambios significativos en la morfología celular ahusada en 2D, las células IBH-6 shAKT2 expresan menor nivel de F-actina. Dado que esto podría asociarse con una menor invasión, cultivamos las células en Matrigel. En la Fig. II.6A (arriba) podemos observar que las células IBH-6 shco formaron cúmulos bien definidos, y algunos de ellos presentaron células que invadieron el Matrigel. Las células IBH-6 shAKT1 en cambio, formaron cúmulos que en su mayoría contenían células que invadieron la matriz, algunas de ellas llegando a adherirse al fondo de la placa. A diferencia de las líneas IBH-6 shco y -shAKT1, la línea IBH-6 shAKT2 formó cúmulos de pequeño tamaño, con escasas o prácticamente ninguna célula invadiendo el Matrigel.

La tinción con Faloidina, en este caso verde, para poder contrateñir los núcleos con ioduro de propidio, mostró más claramente estas diferencias entre las células con mayor adhesión célula-célula, que se agruparon principalmente sobre el Matrigel, y las células con mayor adhesión célula-matriz, con mayor capacidad invasiva, que atravesaron el Matrigel (Fig. II.6A, abajo).

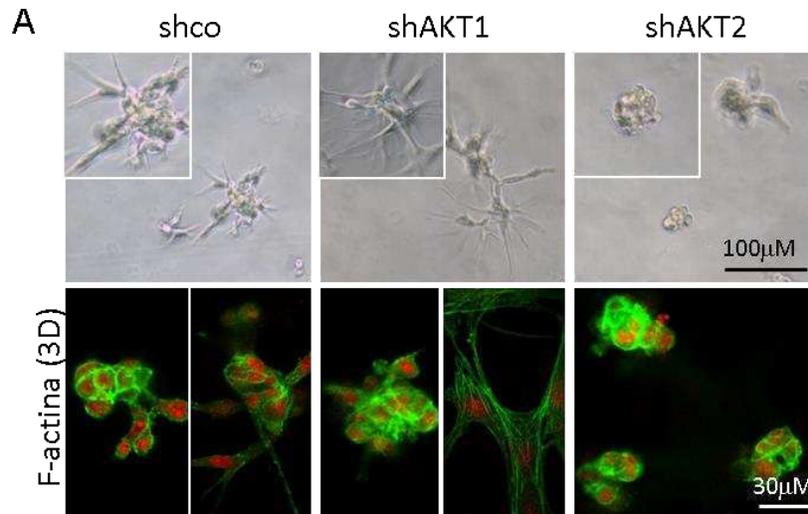


Fig. II.6: El silenciamiento de AKT1 promueve el fenotipo invasivo en 3D, mientras que el silenciamiento de AKT2 lo inhibe. Arriba: Fotografía en campo claro de las células IBH-6 creciendo sobre Matrigel (3D). Las células IBH-6 shAKT1 forman cúmulos más invasivos que las células control. Las células IBH-6 shAKT2 en cambio forman cúmulos de menor tamaño, que no invaden el Matrigel. Abajo: IF para F-actina (verde) en las células adheridas al Matrigel. Los núcleos se contrateñeron de rojo con IP.

Para cuantificar este comportamiento diferencial de las células sobre el Matrigel analizamos la capacidad migratoria e invasiva de las células. Mediante ensayos de cierre de herida comprobamos que las células que poseen inhibido el AKT2 presentaron una menor capacidad de migración (Fig. II.7A). Además, mediante ensayos de *transwell* en presencia de Matrigel, medimos la capacidad de invadir la matriz y adherirse en otro sustrato, y encontramos que las células IBH-6 shAKT2 mostraron una tendencia, aunque no significativa, de ser menos invasivas que las células control. Las células IBH-6 shAKT1 en cambio, resultaron ser significativamente más invasivas que las IBH-6 shco

(Fig. II.7B). Este resultado es consistente con trabajos previos que demuestran que la activación de AKT1 inhibe, mientras que su silenciamiento aumenta la invasión celular en cáncer de mama (Yoeli-Lerner et al. 2005) y que la inhibición de AKT1 induce cambios de tipo EMT, aumentando la migración en la línea celular MCF10A (Irie et al. 2005).

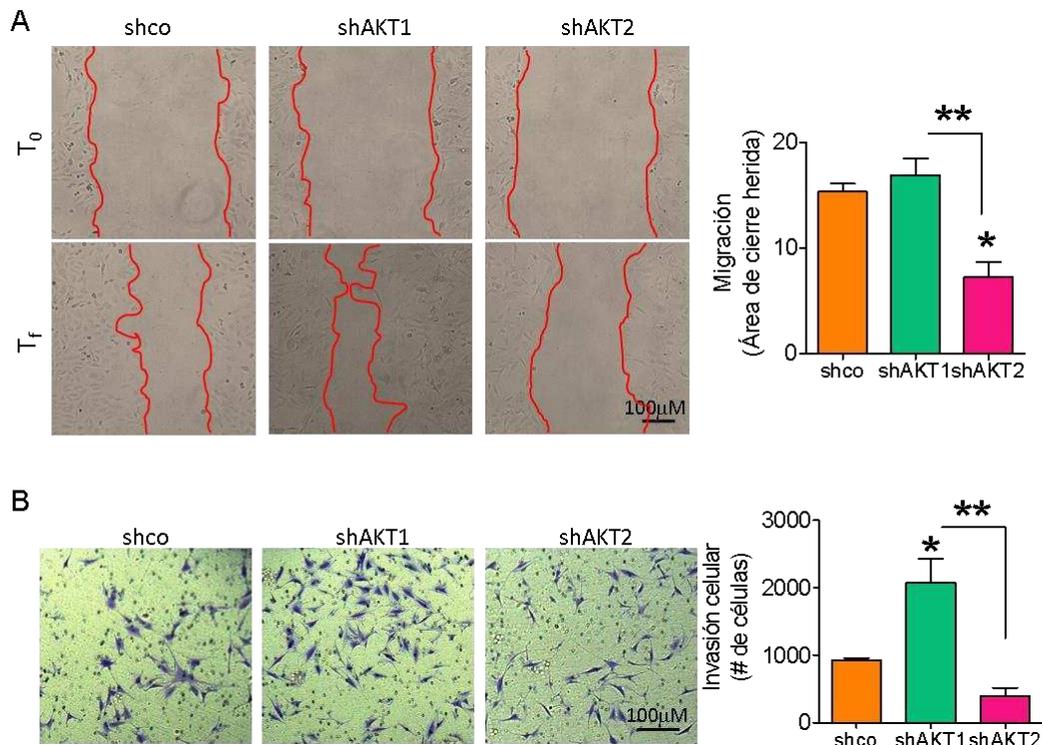


Fig. II.7: El silenciamiento de AKT2 disminuye la migración e invasión celular, mientras que el silenciamiento de AKT1 aumenta la invasión celular. A) Las células IBH-6 fueron sembradas en 2D y cuando llegaron a confluencia se realizó el ensayo de cierre de herida. Se cuantificó el área a tiempo 0 (T_0) y a las 21 horas (T_f) post herida. El gráfico representa el área de migración celular ($T_0 - T_f$). Las células IBH-6 shAKT2 migraron significativamente menos que las células shco o shAKT1. B) Las células fueron sembradas en insertos con poro de 8 μ M previamente cubiertos con Matrigel. 24 horas después se cuantificaron las células que fueron capaces de atravesar el Matrigel y adherirse al otro lado del inserto. Las células IBH-6 shAKT1 resultaron ser más invasivas que los otros dos grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Como mencionamos en la Introducción, el grupo de Slamon demostró que la sobreactivación de AKT2 lleva a un aumento en la invasión celular y a la generación de

metástasis a través de la activación de β 1-integrina en líneas celulares de cáncer de mama y ovario (Arboleda et al. 2003). Evaluamos entonces los niveles de β 1-Integrina y encontramos que, mientras que las células IBH-6 shAKT1 aumentaron la expresión de dicha proteína, medida por *western blot* y una mayor localización en los bordes de la célula (polarización) medida por inmunofluorescencia, la línea IBH-6 shAKT2 mostró una expresión homogénea en el citoplasma, similar a las células control (Fig. II.8A y B).

Analizamos a continuación los niveles de activación de FAK, una de las proteínas con actividad de quinasa que se activa en los puntos de adhesión focal y transducen la señal de las Integrinas. Los niveles de FAK fosforilada (pFAK) acompañaron a los de β 1-Integrina, siendo significativamente más elevados al silenciar AKT1, y con expresión polarizada (Fig. II.8C y D). Este resultado coincide con lo mostrado en la Fig. I. 7 donde observamos que la sobreactivación de AKT1 produce una disminución en los niveles de FAK. Por último, al silenciar AKT1 encontramos niveles más elevados de MMP9, un sustrato de FAK (Fig. II.8E). Esta metaloproteasa tiene la capacidad de degradar la matriz extracelular, aumentando la invasión y migración celular. Nos resta realizar un *western blot* y un zimograma para confirmar si lo que está incrementado son los niveles de la enzima, de la pro-enzima o de ambas. Analizamos también MMP2, otra metaloproteasa comúnmente sobreexpresada en tumores, pero no encontramos diferencias significativas en su expresión al modular la expresión de las isoformas de AKT (no mostrado).

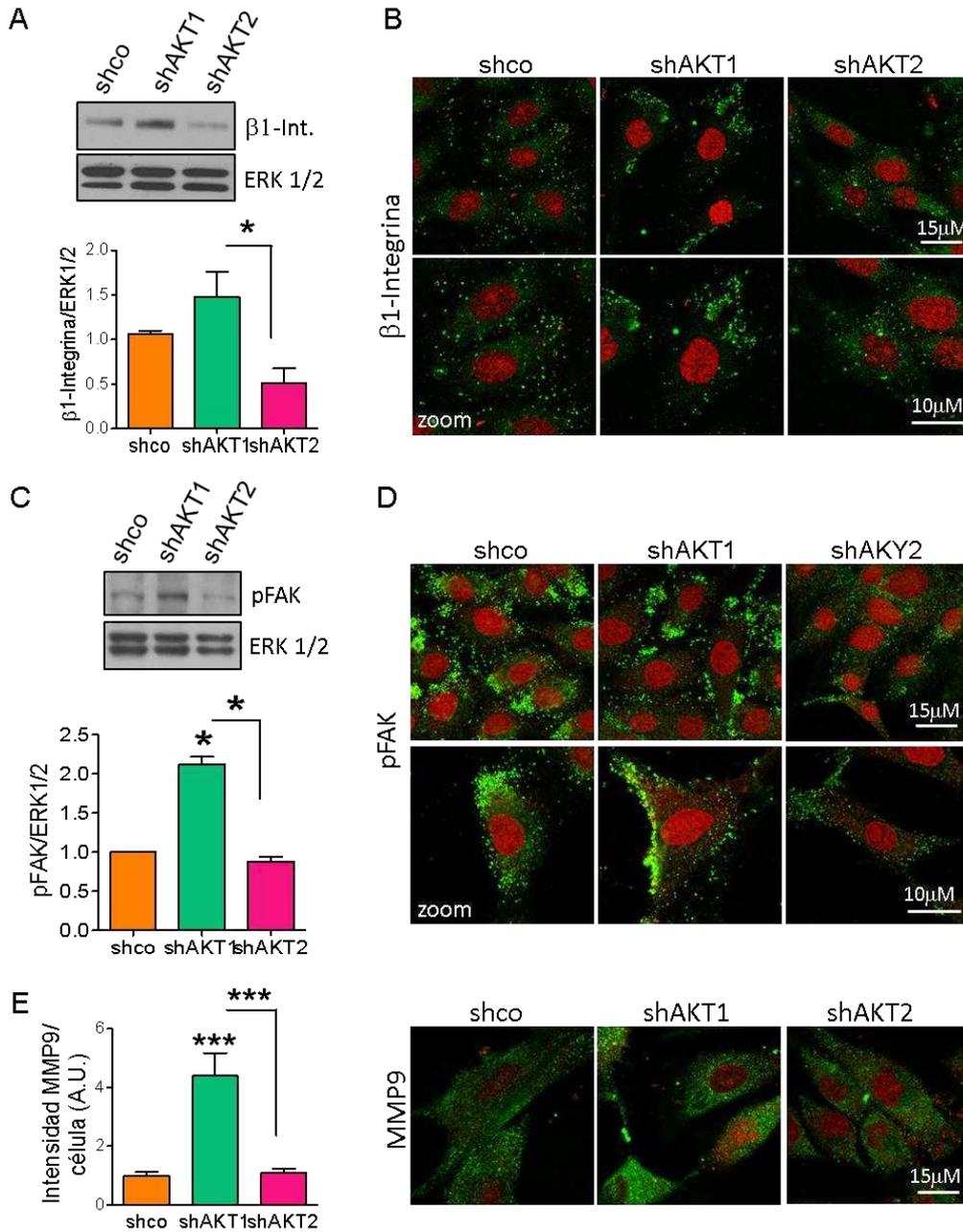


Fig. II.8: AKT1 regula la expresión de las proteínas $\beta 1$ -integrina, pFAK y MMP9. El silenciamiento de AKT1 en la línea IBH-6 induce una mayor expresión de $\beta 1$ -Integrina, pFAK y MMP9, medido por A) y C) WB y B), D) y E) IF. La marca específica para cada anticuerpo se ve en verde. Los núcleos se tiñeron de rojo con IP. Tanto $\beta 1$ -integrina como pFAK además sufrieron una polarización en la membrana plasmática en la línea IBH-6 shAKT1 que se aprecia mejor en las fotos inferiores con zoom. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Experimentos en curso nos permitirán evaluar si es posible revertir el efecto de shAKT1 en la invasión celular mediante el uso de un anticuerpo bloqueante de β 1-integrina (AIIB2, DSHB) y del silenciamiento específico de β 1-integrina, mediante un plásmido cedido gentilmente por el grupo del Dr. Shattil.

AKT1 y AKT2 tienen roles opuestos en la regulación de la migración e invasión celular.

Es interesante resaltar que al silenciar AKT1 observamos un incremento en el nivel de expresión de AKT2 tanto en la línea IBH-6 (Fig. II.1A) como en la línea T47D (Fig. II.12A). Este efecto, que podría sugerir una regulación de una isoforma sobre la otra (y, consecuentemente, la activación temporalmente diferencial de ambas isoformas) no está reportado en cáncer en la bibliografía y merece ser estudiado en profundidad en los modelos experimentales que disponemos. Además, ese resultado es interesante ya que el análisis de las secuencias de DNA y mRNA de tumores provenientes de 1105 pacientes con cáncer de mama, disponible en la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), mostró una asociación inversa entre *AKT1* y *AKT2*, principalmente a nivel de mRNA (Fig. II.9). Es decir que en los casos en los que se observa una desregulación en uno de los genes, no se observa en el otro, lo que podría acompañar la hipótesis de una expresión mutuamente excluyente de *AKT1* y *AKT2* que deberemos analizar en profundidad en el futuro.

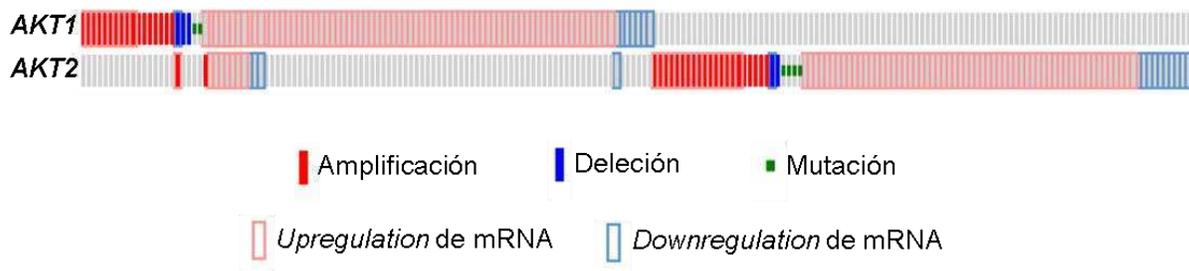


Fig. II.9: Alteraciones génicas en *AKT1* y *AKT2* en muestras de pacientes con cáncer de mama. Análisis de la secuencia de DNA y RNA de tumores provenientes de pacientes con cáncer de mama invasivo, disponibles en la base de datos TCGA. Cada barra gris corresponde a un paciente. La fila superior corresponde a *AKT1* y la fila inferior, a *AKT2*, para cada paciente. Las alteraciones en uno u otro gen son mutuamente excluyentes. Datos tomados de <http://www.cbioportal.org/>.

A partir del aumento en los niveles de AKT2 al silenciar AKT1 observado en nuestros modelos, surge la posibilidad de que el aumento en la invasión celular y en los niveles de β 1-integrina/FAK/MMP9 se deba al aumento en el nivel de AKT2. Para poner a prueba esta posibilidad realizamos el silenciamiento conjunto de AKT1 y AKT2 (shAKT1/shAKT2, Fig. II.10A). Encontramos que las células IBH-6 shAKT1/shAKT2 son altamente migratorias e invasivas (Fig. II.10B y C). Este resultado confirma el hecho de que el aumento en la invasión celular se debe a un efecto del silenciamiento de AKT1 *per se* y no a una regulación negativa de AKT1 sobre AKT2. Este hallazgo es además muy relevante, ya que por el momento, los inhibidores de PI3K o AKT que se encuentran en el mercado no logran discriminar entre las isoformas de la proteína. Nuestros resultados indican que cuando se inhiben ambas isoformas prevalece el efecto del silenciamiento de AKT1 y por lo tanto se favorece un fenotipo más invasivo.

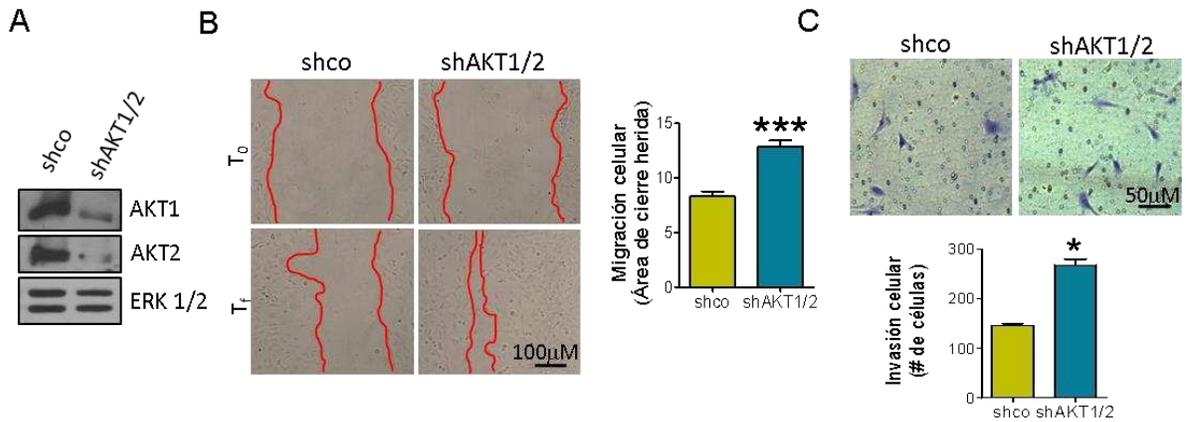


Fig. II.10: El efecto promigratorio de shAKT1 es prevalente al efecto antimigratorio de shAKT2. A) El silenciamiento simultáneo de AKT1 y AKT2 en la línea IBH-6 indujo B) una mayor capacidad de migración, medido por ensayo de cierre de la herida y C) una mayor capacidad de invasión de las células, medido por ensayo de *transwell* en presencia de Matrigel. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

A continuación evaluamos si el tratamiento con un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR tiene el mismo efecto que silenciamiento conjunto de AKT1 y AKT2 sobre la adhesión celular. Para ello realizamos un ensayo de migración por cierre de herida en células IBH-6 *myrAKT1* que habían sido previamente tratadas con Rapamicina por 24 horas. Utilizamos esta línea porque sabemos que responde inhibiendo su crecimiento en presencia del inhibidor. Se utilizó una concentración de 100nM de Rapamicina, que ya sabemos es inhibitoria de crecimiento pero no letal en el corto plazo (ver Fig. I.9). Encontramos que, al igual que el doble silenciamiento shAKT1/shAKT2, la Rapamicina incrementó la migración celular (Fig. II.11A). Actualmente estamos realizando ensayos de migración y de invasión celular en presencia de otros inhibidores de la vía, como Wortmannin para ver si este efecto es específico de la Rapamicina o es general, producto de la inhibición de la vía.

En base a este resultado realizamos un ensayo *in vivo* preliminar utilizando la línea celular T47D *wt* creciendo como xenotransplantes. Elegimos esta línea celular porque presenta una tasa de crecimiento *in vivo* no tan elevada de manera que nos permita realizar tratamientos prolongados. Cuando los tumores se establecieron, los animales fueron

divididos en dos grupos: control y tratados con Wortmannin durante 30 días. Al cabo de este tiempo los animales fueron sacrificados, se extirparon los tumores, pulmones e hígado, y se fijaron para su análisis histológico. El tratamiento con Wortmannin, si bien no disminuyó el tamaño tumoral, los tumores mostraron signos histológicos de regresión: invasión y expansión del estroma que puede verse en la Fig. II.11B, panel superior. Sin embargo, en la Fig. II.11B, panel inferior puede observarse que los tumores tratados con Wortmannin presentaron bordes infiltrantes del tejido adiposo adyacente, mientras que los tumores tratados con vehículo (control) presentaron bordes "redondeados" o pujantes. Sorpresivamente, los animales tratados con Wortmannin presentaron un alto número de focos metastásicos en pulmón al momento del sacrificio, que no se vio en los animales tratados con vehículo (control) (Fig. II.11C). Este resultado acompaña los resultados mostrados anteriormente (Fig. II.7, II.8 y II.10) y sugiere que es la propia inhibición de la vía la que provoca el efecto deseado de inhibir el crecimiento tumoral, pero también un efecto no deseado de generar mayor agresividad de las células tumorales remanentes, probablemente a través de inhibir AKT1 y AKT2 simultáneamente. Para entender mejor este fenómeno debemos estudiarlo con mayor detalle en el futuro.

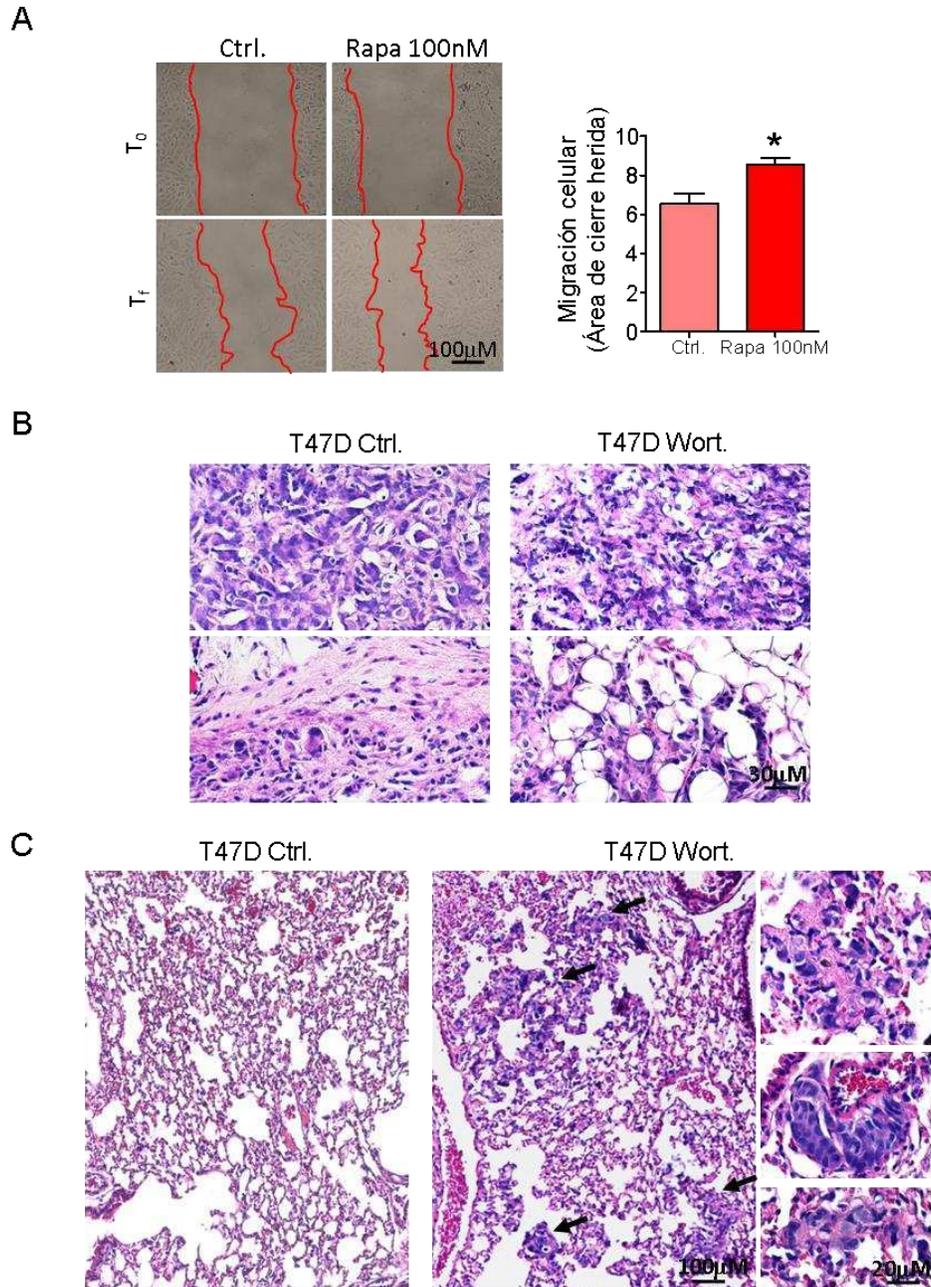


Fig. II.11: El tratamiento con inhibidores de PI3K/AKT/mTOR aumenta la invasión celular en cultivo e *in vivo*. A) El tratamiento con Rapamicina en la línea IBH-6 indujo un aumento en la migración celular en cultivo. B) El tratamiento con Wortmannin durante 30 días en animales portadores de tumores T47D *wt* indujo regresión parcial del tumor a nivel histológico (panel superior) y aumento de la invasión peritumoral (panel inferior). C) El tratamiento con Wortmannin indujo la formación de múltiples focos metastásicos en los pulmones. n=3. * p<0,05.

Hasta aquí, el silenciamiento específico de cada isoforma pone de manifiesto que AKT1 tendría un papel anti-migratorio regulando el eje β 1-integrina/FAK/MMP9, mientras que AKT2 cumpliría una función pro-migratoria a través de la regulación del citoesqueleto de actina y de la expresión de vimentina. Además, podemos concluir que AKT1 promueve por un lado la interacción célula-célula a través de inducir E-cadherina y ello se refleja en un efecto que favorece la diferenciación tumoral, mientras que AKT2 promueve fundamentalmente la interacción célula-matriz y ello se refleja en un efecto que favorece la invasión celular.

Efecto de AKT1 y AKT2 en el fenotipo tumoral de xenotransplantes

Línea celular IBH-6

Al inocular las células derivadas de la línea IBH-6 en ratones NSG encontramos resultados interesantes, que acompañan los resultados *in vitro*. El silenciamiento de AKT1 generó tumores con una tasa de crecimiento muy baja, mientras que los tumores IBH-6 shAKT2 crecieron con una pendiente similar a los tumores control (shco) (Fig. II.12A). La histología de los tumores IBH-6 shco fue similar a la de los tumores generados con las células IBH-6 *wt*, esto es, dos poblaciones celulares bien diferenciadas, una de histología epiteloides y la otra de aspecto fusiforme o ahusada, tal como lo descrito anteriormente (Fig. I.12A). En los tumores IBH-6 shAKT1 sólo pudimos diferenciar la población ahusada, con gran espacio intercelular, indicativo de una baja tasa de proliferación. Esta histología es contraria a la encontrada en los tumores IBH-6 myrAKT1 (Fig. I.12A), en los que describimos un aumento en la proporción de células epiteliales de gran tamaño (lo que aumenta el grado de malignidad tumoral), que además eran positivas para pS6, marcador de activación de la vía PI3K/AKT. Además, la histología de los tumores IBH-6 shAKT1 coincide con la histología de los tumores IBH-6 myrAKT1 tratados con Rapamicina donde observamos prácticamente la desaparición de la población epiteloides y el predominio del componente sarcomatoides (Fig. I.12A,

tercer foto). En cambio, la histología de los tumores IBH-6 shAKT2 muestra pocas células epiteliales aisladas, y una mayor proporción de células ahusadas dispuestas de forma bien empaquetada y con poco espacio intercelular (Fig. II.12B).

En cuanto a la capacidad invasiva de los tumores, el silenciamiento de AKT1, si bien redujo el tamaño tumoral, le confirió una mayor capacidad de invadir el tejido peritumoral (Fig. II.12B, las flechas indican la invasión del tejido adiposo adyacente). Por IHQ confirmamos además que al finalizar el experimento los tumores mantienen silenciadas las isoformas correspondientes (Fig. II.12C). Además la marcación para β 1-integrina mostró, como esperábamos, una mayor expresión en los tumores IBH-6 shAKT1 (Fig. II.12D). En experimentos a más largo plazo (60 días) encontramos que los tumores IBH-6 shAKT1 fueron capaces de generar metástasis pulmonares en el 59% de los animales inoculados (Fig. II.12E, indicadas con flechas), a diferencia de los tumores IBH-6 shco que ya sabíamos que no generan metástasis en ningún órgano (Bruzzone et al. 2009). A pesar de que no todos los animales portadores de tumores IBH-6 shAKT1 desarrollaron metástasis, los pulmones de todos ellos presentaron importantes signos de inflamación, con presencia de células polimorfonucleares. A futuro analizaremos la presencia de macrófagos y el tipo, que podría sugerir que los pulmones de estos animales sean un nicho premetastásico que favorecería la llegada de las células tumorales.

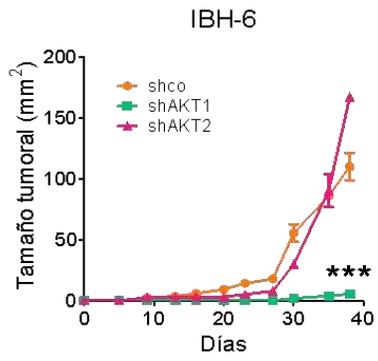
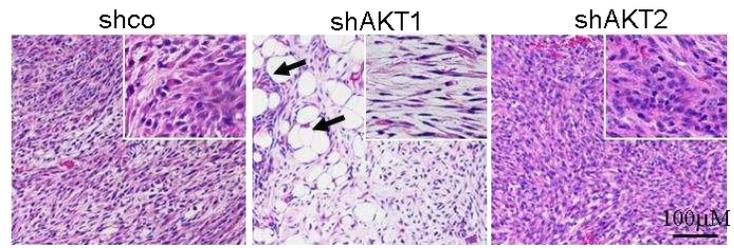
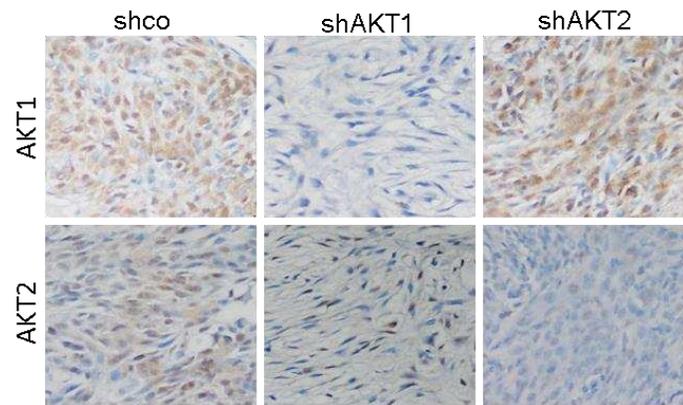
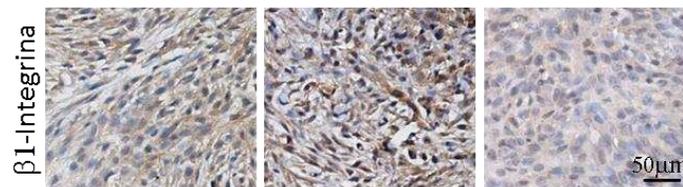
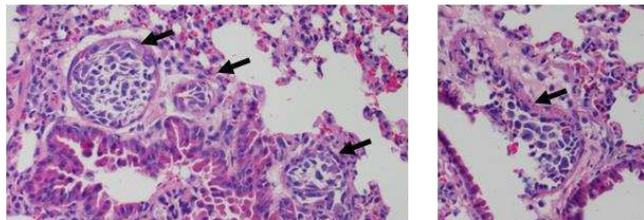
A**B****C****D****E**

Fig. II.12: Silenciamiento de AKT1 o AKT2 en la línea IBH-6 creciendo como xenotransplantes. A) Las células IBH-6 shco, -shAKT1 o -shAKT2 fueron inoculadas en forma sc. en el flanco lateral de ratones NSG a la altura de la cuarta mama. Cuando los tumores se hicieron palpables, comenzó a medirse el área tumoral (largo x ancho) cada dos días para obtener el gráfico Tamaño tumoral vs. Tiempo. Cuando los ratones fueron sacrificados, se extirparon los tumores y se fijaron para su análisis. B) HE de un tumor representativo de cada grupo. Los tumores IBH-6 shAKT1, a pesar de su pequeño tamaño resultaron altamente infiltrantes del tejido adiposo adyacente (indicado con flechas negras). C) Mediante IHQ confirmamos que al final del experimento los tumores mantienen silenciadas específicamente las isoformas de AKT. D) Los tumores IBH-6 shAKT1 presentaron mayor nivel de β 1-Integrina, mientras que los IBH-6 shAKT2 presentaron menor nivel de β 1-integrina. E) Los tumores IBH-6 shAKT1 generaron metástasis pulmonares (indicadas con flechas negras) al cabo de dos meses. n=6. *** p<0,001.

Línea celular T47D

Como mencionamos anteriormente, utilizamos también la línea celular de cáncer de mama humano T47D para validar los resultados obtenidos hasta aquí. Esta línea celular resulta un buen modelo para el estudio del cáncer de mama, ya que expresa receptores hormonales y crece como xenotransplantes en ratones inmunosuprimidos con el agregado de E₂. Las células fueron transfectadas de forma estable para sobreexpresar AKT1 (T47D myrAKT1) o AKT2 (T47D myrAKT2), o infectadas para silenciar una u otra isoforma (T47D shAKT1, T47D shAKT2, Fig. II.13A) similar a lo realizado con la línea IBH-6. En la Figura II.13B puede observarse que, al igual que para la línea IBH-6, la sobreactivación de AKT1 aumentó la proliferación celular, mientras que el silenciamiento de AKT1 disminuyó la proliferación respecto de las células control. Al analizar el rol de AKT2, ni el silenciamiento ni la sobreactivación de dicha isoforma modificaron significativamente la proliferación celular (Fig. II.1B), aportando más evidencias de que es AKT1, y no AKT2, la isoforma mayormente implicada en los procesos de proliferación y supervivencia celular.

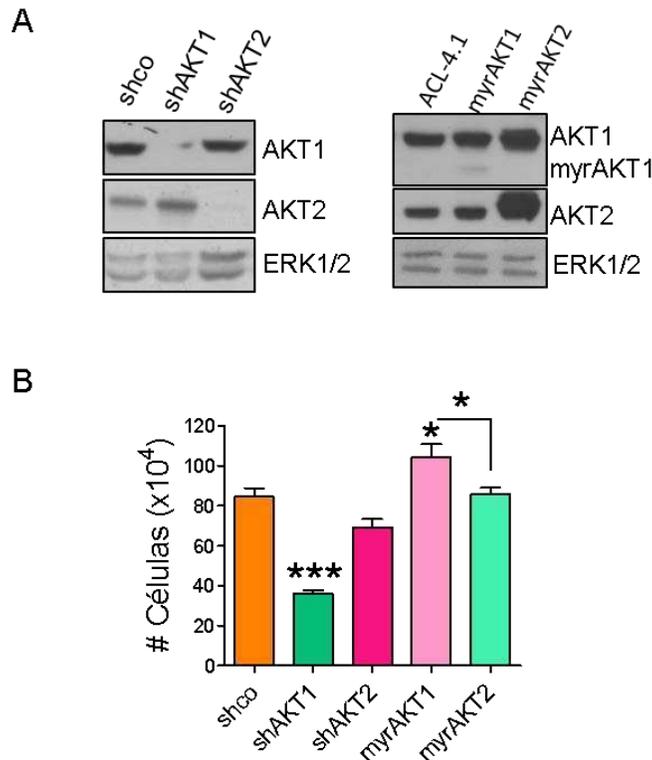


Fig. II.13: Modulación de AKT1 y AKT2 en la línea celular T47D en cultivo. A) WB para corroborar el silenciamiento y/o la sobreactivación de AKT1 o AKT2. B) Ensayos de conteo celular en la línea T47D establemente modificada muestran nuevamente que AKT1, pero no así AKT2, regula la proliferación celular. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

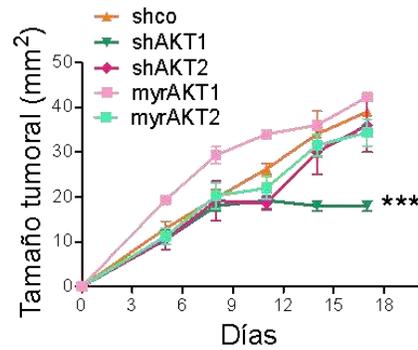
Al inocular las distintas líneas generadas en ratones NSG encontramos resultados interesantes en coincidencia con lo mostrado en cultivo y con lo ya mostrado en la línea IBH-6. Cabe aclarar que en todos los casos las células T47D fueron inoculadas en los ratones en presencia de un pellet de E₂ para permitir su crecimiento (Fig. II.14A). Aclaremos además que los tumores T47D shco crecieron con una tasa similar a los tumores generados con células T47D *wt* (no mostrado). Los tumores T47D myrAKT2 y T47D shAKT2 presentaron una tasa de crecimiento similar a los tumores control (shco). Por el contrario, y tal como lo mostrado para la línea IBH-6, mientras que las células

T47D myrAKT1 generaron tumores con menor latencia y mayor tasa de crecimiento, las células T47D shAKT1 generaron tumores pequeños de alrededor de 10mm², que mantuvieron esta medida a lo largo de todo el experimento.

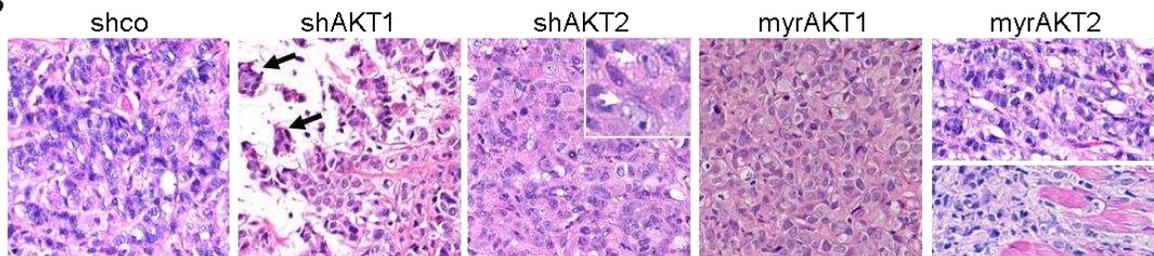
Al analizar la histología de los tumores obtenidos encontramos que las células T47D shco generaron tumores de tipo ductal con alto grado nuclear. Los tumores T47D shAKT1 en cambio, a pesar de su pequeño tamaño y su baja tasa de crecimiento, resultaron ser altamente invasivos (Fig. II.14B, donde las flechas señalan grupos de células invadiendo el tejido adiposo). Realizamos inmunomarcaciones para E-cadherina y vimentina (Fig. II.14C, panel superior e inferior respectivamente), y encontramos que la relación entre ambas proteínas se asoció a su capacidad de invadir el tejido adiposo peritumoral. Mientras que los tumores T47D shco presentaron un nivel de expresión alto tanto de E-cadherina como de vimentina, los tumores T47D shAKT1 presentaron muy bajo nivel de E-cadherina y un alto nivel de vimentina, en particular en las zonas invasivas del tumor. Por el contrario, los tumores T47D shAKT2 si bien presentaron algunas células con núcleos bien activos (señalados con flechas blancas en el *inset*), no presentaron signos de invasión. Coincidente con esto, los tumores T47D shAKT2 presentaron una expresión intensa y bien homogénea de E-cadherina alrededor de las células epiteliales, y una baja expresión de vimentina. Los tumores T47D myrAKT1 mostraron varios grupos de células epiteliales altamente cohesivas, con núcleos muy activos y alto grado nuclear, con niveles bajos de expresión tanto de E-cadherina como de vimentina. Por último, los tumores T47D myrAKT2 presentaron una histología semejante a la de los tumores ducto-lobulillares (patrón de crecimiento acordonado, foto superior), que son tumores altamente invasivos, bordes infiltrantes (no mostrado) e invasión del tejido muscular (foto inferior) (Fig. II.14B). Estos tumores presentaron una marca incompleta para E-cadherina (menor expresión en las zonas donde las células perdieron la unión con sus vecinas), así como también una alta expresión de vimentina (Fig. II.14C). Al igual que la línea IBH-6, no está reportado que la línea T47D genere metástasis. Al tiempo de sacrificio de los animales (90 días desde la inoculación), no encontramos metástasis en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, experimentos a más largo plazo (90

días) utilizando las líneas T47D *wt* y T47D *myrAKT2* mostraron formación de metástasis pulmonares en los animales portadores de tumor T47D *myrAKT2*, pero no en los tumores T47D *wt* (control) (Fig. II.14D).

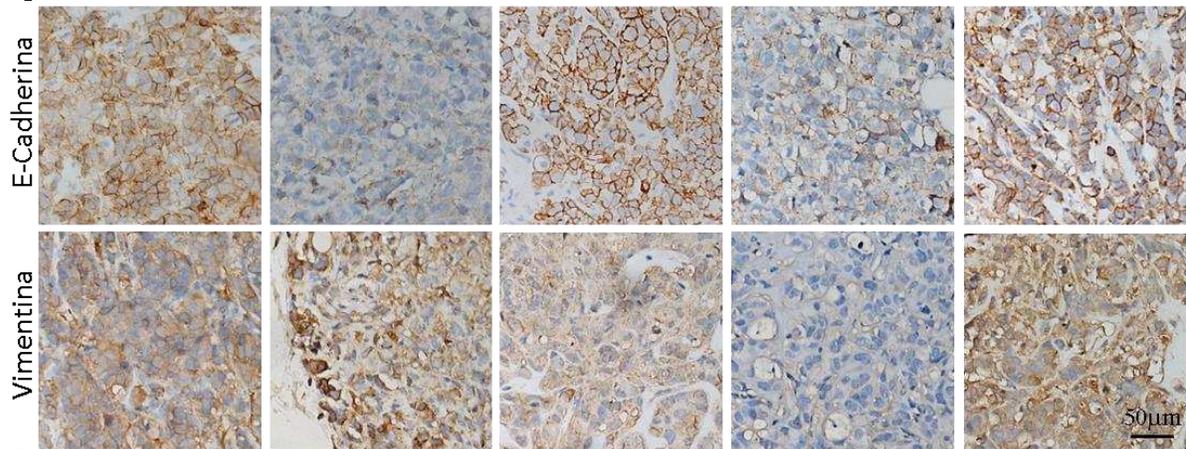
A



B



C



D

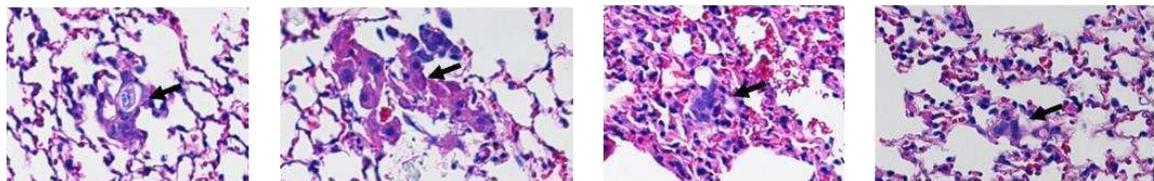


Fig. II.14: Modulación de AKT1 y AKT2 en la línea celular T47D en xenotransplantes. A) Las células derivadas de cada línea fueron inoculadas en forma sc. en el flanco lateral de ratones NSG, previamente implantados con un pellet de 0,25mg de E₂. Cuando los tumores se hicieron palpables, comenzó a medirse el área tumoral (largo x ancho) cada dos días para obtener el gráfico Tamaño tumoral vs. Tiempo. Cuando los ratones fueron sacrificados, se extirparon los tumores y se fijaron para su análisis. B) HE de un tumor representativo de cada grupo. Las flechas negras señalan los grupos de células que invaden el tejido peritumoral. Las flechas blancas en el *inset* de los tumores - shAKT2 señalan los núcleos de células activas. C) IHQ para E-cadherina (panel superior) y vimentina (panel inferior). D) Los tumores T47D myrAKT2 generaron metástasis pulmonares (indicadas con flechas negras) al cabo de dos meses. Se muestran fotos de distintos focos metastásicos. n=8. *** p<0,001.

Implicancia de discriminar las isoformas AKT1 y AKT2

Los datos de la literatura y presentados en la Introducción avalan lo que muestran nuestros resultados, que hablan de un balance entre proteínas pro y anti-migratorias y no de una sola proteína responsable de dichos procesos que pueda considerarse como un marcador único para determinar la malignidad o agresividad tumoral.

En conjunto, y en todos los modelos analizados, demostramos que mientras AKT1 favorece la expresión de proteínas involucradas en el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales, AKT2 favorece la expresión de proteínas involucradas en el comportamiento migratorio e invasivo de las células tumorales.

Las curvas de supervivencia que surgen de los datos de pacientes con cáncer de mama publicados en TCGA, comparando presencia o ausencia de mutaciones en *AKT1* (Fig. II.15A) o en *AKT2* (Fig. II.15B), como aquellas alteraciones descritas en la Fig. II.9, mostraron que la presencia de mutaciones en *AKT1* no modificó la supervivencia de los pacientes. Los pacientes que presentaron alguna alteración hiperactivante en *AKT2*, en cambio, tuvieron menor supervivencia global que los que no presentaron alteraciones en dicha isoforma.

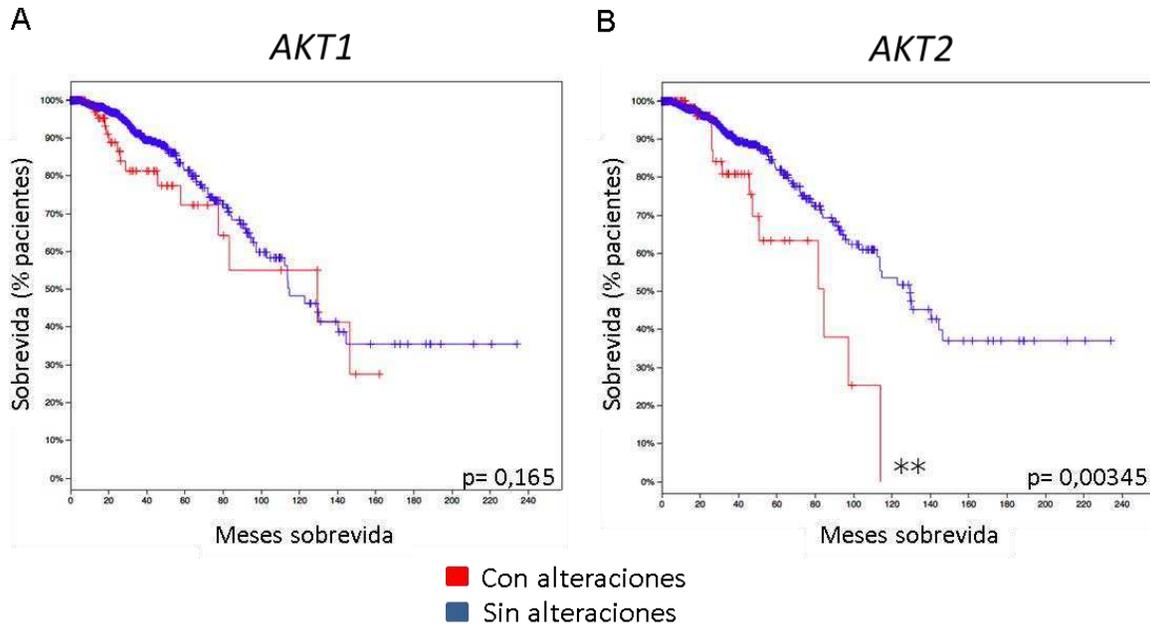


Fig. II.15: Curvas de supervivencia global de pacientes con cáncer de mama según la presencia o ausencia de mutaciones en *AKT1* o *AKT2*. Las curvas se realizaron en base a los datos de 1105 pacientes con tumores de mama luminales invasivos. A) La presencia de alteraciones en *AKT1* no modificó la supervivencia de las pacientes, sin embargo, B) la presencia de alteraciones en *AKT2* disminuyó significativamente la supervivencia. Datos extraídos de <http://www.cbioportal.org/>.

** $p < 0,01$.

Este resultado es consistente con lo que mostramos a lo largo de esta tesis donde la expresión de *AKT2* se relaciona mayormente con la invasión y agresividad tumoral. Estos resultados acompañan además las estadísticas que indican que la gran mayoría de las muertes por cáncer (y especialmente en cáncer de mama) no se deben al tumor primario en sí sino a la aparición de metástasis. Por último, nuestros resultados ponen en evidencia la relevancia de discriminar entre las isoformas *AKT1* y *AKT2* en las muestras de cáncer de mama para poder evaluar el fenotipo tumoral, lo que tendría implicancias en la prognosis de la enfermedad.

Conclusiones

Nuestros resultados muestran que AKT1 y AKT2 ejercen un papel diferencial en el crecimiento y la invasión tumoral. A modo de resumen de los resultados mostrados hasta aquí, planteamos el siguiente mecanismo de acción para AKT1 y AKT2 en los modelos experimentales de cáncer de mama que hemos analizado (Fig. 7). AKT1 sería relevante en los estadios tempranos de la carcinogénesis mamaria promoviendo el crecimiento tumoral, a través de la activación de proteínas involucradas en la supervivencia y proliferación celular como la proteína ribosomal S6 y Ciclina D1. También sería responsable de la activación en forma ligando-independiente de los receptores hormonales, participando en la generación de resistencia a la terapia endócrina. AKT1 estaría implicado además en la adhesión célula-célula induciendo la expresión de proteínas como E-cadherina. En un estadio tumoral más avanzado, tanto la inhibición de AKT1, activando el eje β 1-integrina/FAK/MMP9, como el aumento de AKT2 a través de inducir F-actina y vimentina, llevarían a favorecer la adhesión célula-matriz y un aumento de la agresividad tumoral, con la consecuente invasión del tejido adyacente y el establecimiento de focos tumorales en sitios distantes al tumor primario.

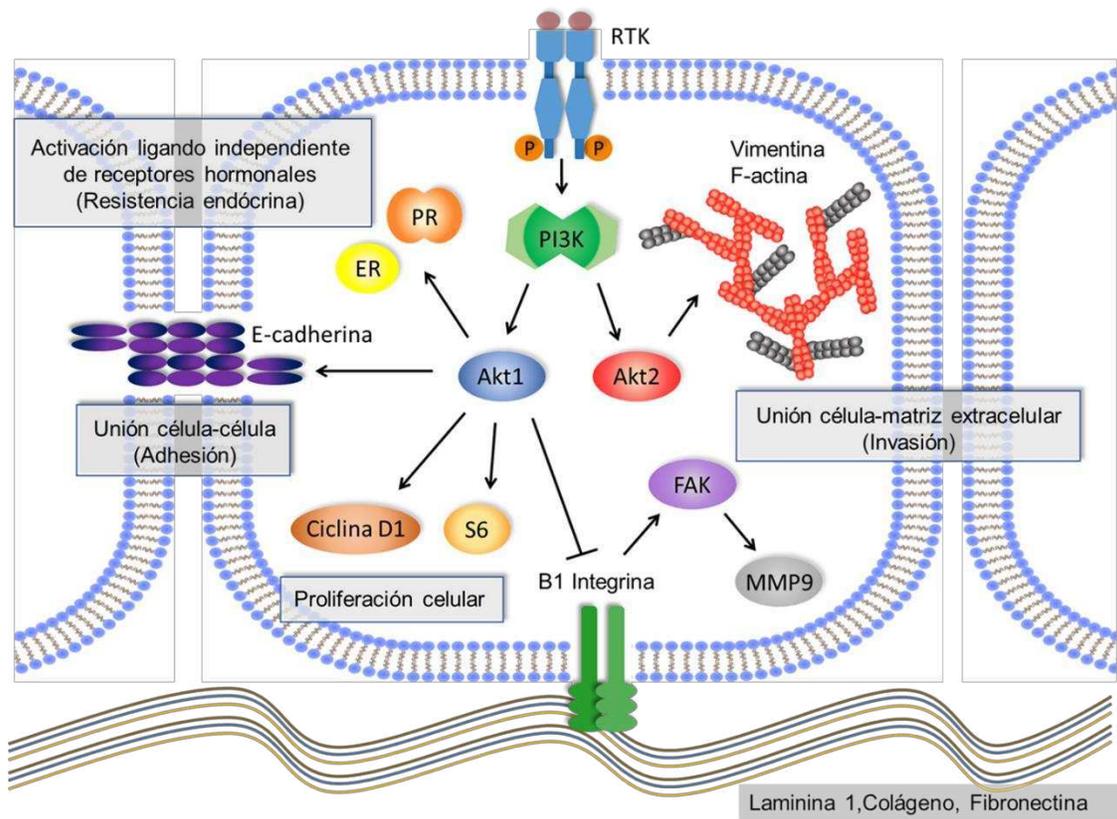


Fig. 7: Modelo propuesto de la participación de AKT1 y AKT2, y de las proteínas diferencialmente reguladas por cada isoforma en la progresión del cáncer de mama.

Discusión

Isoformas de AKT y resistencia endócrina

Como se mencionó en la Introducción, las tres cuartas partes de los tumores de mama expresan receptores hormonales, y dependen, aunque en distinto grado, de los estrógenos y la progesterona para crecer. Por esta razón, la terapia de primera línea para la mayoría de las pacientes es el tratamiento con antagonistas endócrinos, como el Tamoxifeno o los inhibidores de aromataasa. Sin embargo, un alto porcentaje de los tumores deja de responder al tratamiento y la enfermedad progresa. Entre los mecanismos involucrados en la hormono-independencia y la resistencia hormonal se encuentra la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR (Miller et al. 2010). En trabajos anteriores del laboratorio y en este trabajo de tesis confirmamos que la activación constitutiva de la vía de PI3K/AKT promueve un crecimiento tumoral hormono-independiente en dos modelos experimentales de carcinomas mamarios, C4-HD e IBH-7 (Riggio et al. 2012). Encontramos además que es la isoforma AKT1 la que confiere esta capacidad de crecimiento autónomo, a través de la regulación de los receptores hormonales ER y PR, de la proteína ribosomal S6 y de ciclina D1.

AKT2, por otro lado, no tendría un papel muy importante en la proliferación celular, al menos en los modelos analizados.

La sobreactivación de AKT1 induce la activación (y en algunos casos la expresión) de ER y PR en ausencia del agregado exógeno de hormonas. Es importante mencionar que tanto en la línea celular IBH-7 como en la IBH-6, AKT1 incrementó los niveles de la isoforma B del PR (PRB). Trabajos del laboratorio de la Dra. Lanari demuestran que los tumores que tienen una mayor proporción de PRB que PRA presentan resistencia al antiprogestágeno Mifepristona (Wargon et al. 2009) (Wargon et al. 2015).

Además, tanto en cáncer de mama como de próstata se vio que las células que se han vuelto resistentes al tratamiento endócrino necesitan de la vía de PI3K/AKT para crecer. Por lo tanto, la inhibición de esta vía podría evitar la resistencia endócrina (Miller et al. 2010) (Carver et al. 2011). Evaluamos entonces la respuesta al antiestrógeno puro Fulvestrant en la línea celular IBH-6 *wt* y en la línea IBH-6 *myrAKT1*. Encontramos que,

mientras que la línea IBH-6 *wt* (así como también la línea con el vector control IBH-6 ACL-4.1) es sensible al tratamiento con Fulvestrant, tanto *in vitro* como *in vivo*, la línea IBH-6 myrAKT1 no responde a dicho antiestrógeno. Además, el uso de un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR como la Rapamicina restituyó la sensibilidad al antiestrógenos en cultivo, es decir que el tratamiento combinado de Fulvestrant más Rapamicina resultó más efectivo que la Rapamicina sola. Este efecto combinado sin embargo no se vio en los ensayos *in vivo*. La pérdida de sensibilidad a un antagonista endócrino por sobreactivación de AKT1 y la restitución de la respuesta con la adición de un inhibidor de la vía de PI3K/AKT/mTOR también fue observado en la línea T47D (Polo et al. 2015).

Isoformas de AKT y regulación de proteínas *downstream* involucradas en invasión tumoral

La progresión tumoral implica un proceso de transformación celular a través de etapas intermedias hasta que el carcinoma se establece con características invasivas y finalmente como enfermedad metastásica.

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR aparece como una vía común en la regulación de la proliferación, la migración y la invasión celular; pero su contribución en procesos específicos y cascadas *downstream* parece ser dependiente del tipo y del contexto celular (Liu et al. 2004) (Polo et al. 2010) (Riggio et al. 2012). En base a los resultados de este trabajo, agregamos que es a través de la regulación diferencial de sus isoformas AKT1 y AKT2 que la vía de PI3K/AKT/mTOR regula diferencialmente estos procesos.

En cuanto al papel de PI3K/AKT/mTOR en la morfología celular y en la histología tumoral, en trabajos anteriores habíamos comprobado que la activación de AKT1 en tumores murinos hormono-dependientes C4-HD indujo, además de un crecimiento hormono-independiente, una mayor diferenciación tumoral, con formación de esbozos ductales, y aumento en la expresión del marcador luminal citoqueratina 8, y laminina I y menor expresión del marcador mioepitelial citoqueratina 14. En este trabajo

podemos agregar que AKT1 induce cambios morfológicos en la línea celular IBH-7 en cultivo, en la que observamos una mayor adhesión célula-célula y un aumento en la expresión de E-cadherina. A pesar de estos cambios observados en cultivo no obtuvimos cambios histológicos en los tumores IBH-7, que ya eran diferenciados. En la línea celular IBH-6, que tiene una constitución celular heterogénea, el aumento de AKT1 sí causó cambios histológicos importantes; incrementó el porcentaje de células epiteliales en los tumores generados. La población epitelial resultó positiva para S6, lo que confirmó que dichas células tienen activada la vía PI3K/AKT/mTOR. Además, algunas de las células del componente epitelial resultaron multinucleadas, de gran tamaño, lo que aumenta el grado nuclear del tumor y por ende su malignidad.

Así como la sobreactivación de AKT1 incrementó la diferenciación tisular, y la expresión de proteínas de unión célula-célula, el silenciamiento de esta isoforma aumentó la capacidad migratoria e invasiva tanto en cultivo como en xenotransplantes. Nuestros resultados demuestran que una de las proteínas involucradas en dicho proceso es β 1-integrina, a través de FAK y MMP9. En este sentido, y si se postula que las terapias *target* de PI3K/AKT/mTOR se administren como terapia neoadyuvante o adyuvante de primera línea, es importante tener en cuenta que, si bien se inhibirá la proliferación celular, podría favorecerse el fenotipo invasivo del tumor o de las células remanetes/circulantes.

Nuestros resultados y otros trabajos en la literatura, indican que β 1-integrina podría ser un blanco terapéutico promisorio. Está reportado que su inhibición resulta en una represión de las células cancerosas, asociado con una disminución en la proliferación y aumento de la apoptosis, con mínimo efecto sobre las células no tumorales que mantienen estructuras 3D en Matrigel que son resistentes al tratamiento con el anticuerpo. Estos efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos específicos de células cancerosas fueron confirmados *in vivo* ya que no se detecta toxicidad apreciable en los animales con anticuerpos bloqueantes de β 1-integrina (Park et al. 2006).

El bloqueo de $\beta 1$ -integrina con el anticuerpo AIIB2 restaura los efectos inhibitorios del crecimiento celular del Tamoxifeno (Pontiggia et al. 2012), Trastuzumab y Lapatinib (Lesniak et al. 2009) (Huang et al. 2011) lo que corrobora que la activación de $\beta 1$ -integrina (a través de PI3K/AKT, entre otras) podría mediar la resistencia a los agentes antitumorales. Además, los anticuerpos monoclonales anti $\beta 1$ -integrina y el silenciamiento de esta subunidad atenúan la actividad invasiva de las células mamarias transformadas (Nam et al, 2013) y el crecimiento de micrometástasis perivasculares de células de glioblastoma (Carbonell et al. 2013).

La relevancia de las integrinas en la progresión tumoral ha merecido el desarrollo de antagonistas que fueron testados en uso clínico. Para inhibir $\alpha 5\beta 1$, se ha desarrollado el péptido inhibidor ATN-161 (Thundimadathil 2012) y un anticuerpo monoclonal PF-04605412 (Mateo et al. 2014) que fueron empleados en fase II o I de ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos avanzados, respectivamente, el primero en combinación con quimioterapia, pero sin efecto anti-tumoral a las dosis ensayadas.

Como lo demuestra la literatura y por nuestros resultados aquí mostrados, el uso de anticuerpos monoclonales anti $\beta 1$ -integrina merece ser investigado en más ensayos preclínicos y modelos experimentales.

Estudios en curso con el anticuerpo bloqueante de $\beta 1$ -integrina o con un shRNA para $\beta 1$ -integrina (gentilmente cedido por el Dr. Shatil) nos permitirán evaluar si es posible revertir el fenotipo invasivo en las células -shAKT1.

Debemos destacar también que la tirosina quinasa FAK se localiza predominantemente en las adhesiones focales y se activa tras la adhesión mediada por integrinas, por lo que FAK puede considerarse como otro indicador del potencial invasivo de células tumorales (Barkan et al. 2010) (Golubovskaya and Cance 2010) (Nistico et al. 2014). Está demostrado que la expresión y la fosforilación de FAK se incrementan específicamente en los sitios de avance del tumor, en comparación con la región no tumoral circundante, por lo que FAK se correlaciona con la enfermedad metastásica y con mal pronóstico en cáncer de mama (Luo and Guan 2010).

Está reportado que en células de cáncer de colon humano AKT1, pero no AKT2, se une directamente y fosforila a FAK en tres sitios serina en respuesta a factores extracelulares (Wang and Basson 2011). Por lo tanto, FAK y AKT1 se unen directamente y potencian la activación recíproca. Este mecanismo de interacción FAK-AKT sugiere que FAK podría ser otro blanco terapéutico para prevenir la adhesión de células de cáncer de colon y, eventualmente, las metástasis (Wang and Basson 2011). En este trabajo demostramos que la sobreactivación de AKT1 inhibe mientras que su silenciamiento aumenta los niveles de FAK y pFAK. Además, la regulación negativa de la vía PI3K/AKT por sobreexpresión de PTEN aumenta la expresión de FAK. Este ensayo arrojó el mismo resultado que el silenciamiento conjunto de AKT1 y AKT2, dándole más fuerza a nuestra hipótesis de que la administración de un inhibidor genérico de la vía sin una previa evaluación del estado de las isoformas, podría ser contraproducente si favorece el fenotipo agresivo de las células remanentes.

Existen suficientes evidencias de la participación de la vía PI3K/AKT en la reorganización dinámica y en la remodelación del citoesqueleto de actina en el área cortical submembrana, lo cual es relevante para la migración celular. F-actina (visualizada con Faloidina) es también un sustrato de la actividad quinasa de AKT en células de cáncer de mama MCF-7 después de la estimulación con factores de crecimiento (Vandermoere et al. 2007), indicando que la actina es un blanco funcional de la señalización de PI3K/AKT. Sorprendentemente, aquí encontramos que AKT2 interviene en la migración celular del cáncer de mama por regulación de F-actina y de vimentina.

Queda pendiente evaluar además si, en nuestro sistema, hay una regulación diferencial de mTORC2 (rictor) y de mTORC1 (raptor) por las isoformas AKT1 y AKT2, ya que está indicado que el primero está preferentemente relacionado con procesos de migración y progresión tumoral, a través de la regulación del citoesqueleto de actina, mientras que el segundo con procesos de supervivencia celular (Zhou and Huang 2011). Este podría ser un mecanismo responsable del aumento en la migración celular observado en las células IBH-6 myrAKT1 tratadas con Rapamicina (Fig. II.11A), ya que,

como se mencionó en la Introducción, tratamientos a corto plazo con esta droga sólo inhiben el complejo mTORC1.

En cuanto a la posible regulación de una isoforma sobre la otra que observamos en nuestros modelos y que mostramos en las Fig. II.1A y II.12A, sólo hay un trabajo realizado en células de tejido ocular que describe un aumento en la expresión de AKT2 al silenciar AKT1, que conlleva a un menor índice apoptótico inducido por estrés oxidativo (Zhang et al. 2011). Este resultado merece ser estudiado en profundidad en nuestros modelos experimentales, ya que si se corrobora que esto ocurre, una terapia *target* contra AKT1 podría resultar perjudicial al incrementar las metástasis tumorales inducidas por AKT2. Además, la regulación de una isoforma sobre la otra va en línea con nuestra hipótesis de que las isoformas AKT1 y AKT2 podrían estar expresándose en forma excluyente a lo largo de la progresión tumoral, teniendo AKT1 más relevancia en el crecimiento tumoral y AKT2 en la migración e invasión celular.

Finalmente, queremos destacar el resultado más sorprendente que obtuvimos, que fue la obtención de metástasis pulmonares luego de suministrar un tratamiento prolongado de Wortmannin en animales portadores de tumores T47D. La aparición de metástasis en la línea T47D o luego de un tratamiento con un inhibidor de PI3K es un resultado nunca antes descrito ni planteado, pero que acompañaría nuestros y otros resultados que muestran que la inhibición de AKT1 estimula la invasión celular. Una posibilidad es que los resultados de la literatura correspondan a tratamientos más cortos, donde sólo se observan los efectos benéficos sobre el tumor primario o que no se haya evaluado en profundidad las características invasivas del tumor. Otra posibilidad es que un tratamiento prolongado con un inhibidor de la vía PI3K/AKT/mTOR genere resistencia y se activen los mecanismos de compensación mencionados en la Introducción, entre ellos la reactivación de la vía PI3K/AKT o la activación de MEK/ERK. Estudios en curso nos permitirán saber el estado de las isoformas de AKT luego del tratamiento prolongado con Wortmannin, así como también el estado de otras vías de señalización.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis resaltan las acciones específicas, y en algunos casos opuestas, de las isoformas AKT1 y AKT2 en la regulación de la proliferación, la motilidad y la invasión celular.

La relevancia de este trabajo de tesis radica en el análisis exhaustivo de la función de la vía PI3K/AKT/mTOR, diferenciando el rol particular de AKT1 y AKT2 y de las proteínas *target* reguladas diferencialmente.

Nuestros resultados sugieren, por un lado, que es relevante estudiar el perfil de expresión de las isoformas de AKT en cáncer como herramienta pronóstica de la enfermedad. Incorporar la evaluación de dichas isoformas en la práctica clínica permitirá subclassificar a los carcinomas mamarios ductales disponiendo de mayor información sobre el grado de progresión de la enfermedad. Por otro lado, proponemos que la terapia con inhibidores de PI3K/AKT debería ser selectiva para una u otra isoforma, y/o incluir inhibidores de proteínas *downstream* reguladas diferencialmente como el bloqueo con un anticuerpo contra β 1-integrina que interfiera específicamente con el efecto pro-invasivo. Entender el papel de cada isoforma de AKT en la biología de la enfermedad permitirá diseñar terapias selectivas a cada estadio de la enfermedad y personalizadas a cada tipo tumoral para lograr un mayor efecto terapéutico en las pacientes.

Referencias

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

Arboleda, M. J. et al. 2003. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63(1):196-206.

Balzac, F. et al. 2005. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *J Cell Sci* 118(Pt 20):4765-83.

Banin Hirata, Bruna Karina et al. 2014. Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. *Disease Markers* 2014:1-12.

Barkan, D. et al. 2010. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res* 70(14):5706-16.

Baselga, J. et al. 2012. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 366(6):520-9.

Beck, J. T. et al. 2014. Everolimus plus exemestane as first-line therapy in HR(+), HER2(-) advanced breast cancer in BOLERO-2. *Breast Cancer Res Treat* 143(3):459-67.

Boufraquech, M. et al. 2014. miR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3. *Endocr Relat Cancer* 21(4):517-31.

Bozulic, L. et al. 2008. PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* 30(2):203-13.

Brachmann, S. M. et al. 2012. Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations. *Mol Cancer Ther* 11(8):1747-57.

Brown, K. K. et al. 2015. The phosphoinositide 3-kinase pathway and therapy resistance in cancer. *F1000Prime Rep* 7:13.

- Bruzzone, A. et al. 2009. Novel human breast cancer cell lines IBH-4, IBH-6, and IBH-7 growing in nude mice. *J Cell Physiol* 219(2):477-84.
- Campbell, R. A. et al. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276(13):9817-24.
- Canel, M. et al. 2013. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* 126(Pt 2):393-401.
- Carbonell, W. S. et al. 2013. beta1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res* 73(10):3145-54.
- Carracedo, A. et al. 2008. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27(41):5527-41.
- Carver, B. S. et al. 2011. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell* 19(5):575-86.
- Cavallaro, U. et al. 2004. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014:58-66.
- Ciruelos, E. et al. 2013. Role of inhibitors of mammalian target of rapamycin in the treatment of luminal breast cancer. *Anticancer Drugs* 24(8):769-80.
- Clark, A. R. et al. 2014. Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem Soc Trans* 42(5):1349-55.
- Conneely, O. M. et al. 2003. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(2):205-14.
- Chakrabarty, A. et al. 2012. Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8):2718-23.

Chambers, A. F. et al. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2(8):563-72.

Chandarlapaty, S. et al. 2011. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* 19(1):58-71.

Cheng, J. Q. et al. 2005. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 24(50):7482-92.

Chia, S. et al. 2015. Novel agents and associated toxicities of inhibitors of the pi3k/Akt/mTOR pathway for the treatment of breast cancer. *Curr Oncol* 22(1):33-48.

Chiarini, F. et al. 2015. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 36(2):124-35.

Chin, Y. Rebecca et al. 2010. Akt2 regulates expression of the actin-bundling protein palladin. *FEBS Letters* 584(23):4769-4774.

Christiansen, J. J. et al. 2006. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 66(17):8319-26.

Danen, E. H. et al. 2003. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol* 201(4):632-41.

Daniel, A. R. et al. 2011. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 6(3):359-369.

de la Cruz-Merino, L. et al. 2013. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clin Dev Immunol* 2013:785317.

Desgrosellier, J. S. et al. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10(1):9-22.

Dienstmann, R. et al. 2014. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther* 13(5):1021-31.

- Dillon, R. L. et al. 2009. Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res* 69(12):5057-64.
- Dontu, G. et al. 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17(10):1253-70.
- Efeyan, A. et al. 2010. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* 22(2):169-76.
- Epifano, C. et al. 2012. Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell Adh Migr* 6(3):261-73.
- Fidler, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3(6):453-8.
- Folgiro, V. et al. 2008. Induction of ErbB-3 expression by alpha6beta4 integrin contributes to tamoxifen resistance in ERbeta1-negative breast carcinomas. *PLoS One* 3(2):e1592.
- Golubovskaya, V. M. et al. 2010. Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15:901-12.
- Gonzalez, E. et al. 2009. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8(16):2502-8.
- Grabinski, N. et al. 2011. Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells. *Cell Signal* 23(12):1952-60.
- Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84(3):345-57.
- Guo, W. et al. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10):816-26.

- Gupta, G. P. et al. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127(4):679-95.
- Gyorffy, B. et al. 2015. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res* 17:11.
- Hanahan, D. et al. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-74.
- Hers, I. et al. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23(10):1515-27.
- <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-everolimus>. 2013.
- <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/cancer-de-mama>. 2015. Instituto Nacional de Cáncer.
- Huang, C. et al. 2011. beta1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res* 13(4):R84.
- Humphries, J. D. et al. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119(Pt 19):3901-3.
- Hutchinson, J. N. et al. 2004. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* 64(9):3171-8.
- Irie, H. Y. et al. 2005. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 171(6):1023-34.
- Jahangiri, A. et al. 2014. beta1 integrin: Critical path to antiangiogenic therapy resistance and beyond. *Cancer Res* 74(1):3-7.
- Jiang, B. H. et al. 2008. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1784(1):150-8.
- Ju, X. et al. 2007. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18):7438-43.
- Kelsey, J. L. et al. 1993. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15(1):36-47.

Keydar, I. et al. 1979. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15(5):659-70.

Knuefermann, C. et al. 2003. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 22(21):3205-12.

Knutson, T. P. et al. 2012. Phosphorylated and sumoylation-deficient progesterone receptors drive proliferative gene signatures during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 14(3):R95.

Kohn, A. D. et al. 1996. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem* 271(36):21920-6.

Kordon, E. C. et al. 1993. Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between progestin dependence and morphology. *Breast Cancer Res Treat* 28(1):29-39.

Kourea, H. P. et al. 2014. Targeted pathways in breast cancer: molecular and protein markers guiding therapeutic decisions. *Curr Mol Pharmacol* 7(1):4-21.

Kouros-Mehr, H. et al. 2008. GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. *Cancer Cell* 13(2):141-52.

Kreisberg, J. I. et al. 2004. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 64(15):5232-6.

Lamming, D. W. et al. 2013. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest* 123(3):980-9.

Lanari, C. et al. 2009. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 16(2):333-50.

Lanari, C. et al. 2012. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocrine Related Cancer* 19(3):R35-R50.

Lauring, J. et al. 2013. The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 11(6):670-8.

Leary, Alexandra et al. 2013. The PI3K/Akt/mTOR Pathway in Ovarian Cancer: Biological Rationale and Therapeutic Opportunities.

Lesniak, D. et al. 2009. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res* 69(22):8620-8.

Liu, H. et al. 2006. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11):4134-9.

Liu, P. et al. 2011. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. *Nat Med* 17(9):1116-20.

Liu, X. et al. 2004. Rapamycin inhibits Akt-mediated oncogenic transformation and tumor growth. *Anticancer Res* 24(5A):2697-704.

Luo, Ming et al. 2010. Focal adhesion kinase: A prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Letters* 289(2):127-139.

Lydon, J. P. et al. 1999. Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function. *Cancer Res* 59(17):4276-84.

Ma, Y. et al. 2015. MicroRNA144 suppresses tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by targeting AKT3. *Mol Med Rep* 11(2):1378-83.

Maroulakou, I. G. et al. 2007. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* 67(1):167-77.

- Martinez-Rico, C. et al. 2010. Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. *J Cell Sci* 123(Pt 5):712-22.
- Mateo, J. et al. 2014. A first-in-human study of the anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin monoclonal antibody PF-04605412 administered intravenously to patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 74(5):1039-46.
- Meng, Q. et al. 2006. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal* 18(12):2262-71.
- Miller, T. W. et al. 2010. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest* 120(7):2406-13.
- Mitra, S. K. et al. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18(5):516-23.
- Moser, M. et al. 2009. Kindlin-3 is required for $\beta 2$ integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med* 15(3):300-5.
- Nagasawa, H. et al. 1988. Medroxyprogesterone acetate enhances spontaneous mammary tumorigenesis and uterine adenomyosis in mice. *Breast Cancer Res Treat* 12(1):59-66.
- Nam, J. M. et al. 2013. $\beta 1$ -Integrin via NF- κ B signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. *Breast Cancer Res* 15(4):R60.
- Nelson, C. M. et al. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:287-309.

Nistico, P. et al. 2014. beta1 and beta4 integrins: from breast development to clinical practice. *Breast Cancer Res* 16(5):459.

Nitz, U. et al. 2014. Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression. *Ann Oncol* 25(8):1551-7.

Obr, A. E. et al. 2012. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 357(1-2):4-17.

Park, C. C. et al. 2006. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res* 66(3):1526-35.

Perez-Moreno, M. et al. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112(4):535-48.

Perou, C. M. et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-52.

Phung, T. L. et al. 2015. Akt1 and akt3 exert opposing roles in the regulation of vascular tumor growth. *Cancer Res* 75(1):40-50.

Polo, M. L. et al. 2010. Responsiveness to PI3K and MEK inhibitors in breast cancer. Use of a 3D culture system to study pathways related to hormone independence in mice. *PLoS One* 5(5):e10786.

Polo, M. L. et al. 2015. Activation of PI3K/Akt/mTOR signaling in the tumor stroma drives endocrine therapy-dependent breast tumor regression. *Oncotarget* 6(26):22081-97.

Pontiggia, O. et al. 2012. 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):459-71.

- Reis-Filho, Jorge S. et al. 2011. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *The Lancet* 378(9805):1812-1823.
- Riggio, M. et al. 2012. PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Carcinogenesis* 33(3):509-18.
- Sakr, R. A. et al. 2014. PI3K pathway activation in high-grade ductal carcinoma in situ--implications for progression to invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 20(9):2326-37.
- Sarbassov, D. D. et al. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22(2):159-68.
- Siegel, R. L. et al. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66(1):7-30.
- Tai, Y. T. et al. 2003. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Res* 63(18):5850-8.
- Thundimadathil, J. 2012. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids* 2012:967347.
- Toker, A. 2012. Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul* 52(1):78-87.
- Tokunaga, E. et al. 2006. Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer* 13(2):137-44.
- Tsuruta, D. et al. 2011. Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J Dermatol Sci* 62(1):1-7.
- Vandermoere, F. et al. 2007. Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Mol Cell Proteomics* 6(1):114-24.

VanderWeele, D. J. et al. 2004. Akt up-regulation increases resistance to microtubule-directed chemotherapeutic agents through mammalian target of rapamycin. *Mol Cancer Ther* 3(12):1605-13.

Vazquez, S. M. et al. 2004. Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. *J Cell Physiol* 199(3):460-9.

Virtakoivu, R. et al. 2012. Distinct roles of AKT isoforms in regulating beta1-integrin activity, migration, and invasion in prostate cancer. *Mol Biol Cell* 23(17):3357-69.

Wallin, J. J. et al. 2010. Nuclear Phospho-Akt Increase Predicts Synergy of PI3K Inhibition and Doxorubicin in Breast and Ovarian Cancer. *Science Translational Medicine* 2(48):48ra66-48ra66.

Wang, S. et al. 2011. Akt directly regulates focal adhesion kinase through association and serine phosphorylation: implication for pressure-induced colon cancer metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*.

Wargon, V. et al. 2009. Reversal of antiprogesterin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 116(3):449-60.

Wargon, Victoria et al. 2015. Progestin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *International Journal of Cancer* 136(11):2680-2692.

Woodgett, J. R. 2005. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17(2):150-7.

Yano, H. et al. 2004. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 166(2):283-95.

Yardley, D. A. et al. 2013. Everolimus plus exemestane in postmenopausal patients with HR(+) breast cancer: BOLERO-2 final progression-free survival analysis. *Adv Ther* 30(10):870-84.

Yoeli-Lerner, M. et al. 2009. Akt/protein kinase b and glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway regulates cell migration through the NFAT1 transcription factor. *Mol Cancer Res* 7(3):425-32.

Yoeli-Lerner, M. et al. 2005. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 20(4):539-50.

Zawistowski, J. S. et al. 2013. MicroRNA 9-3p targets beta1 integrin to sensitize claudin-low breast cancer cells to MEK inhibition. *Mol Cell Biol* 33(11):2260-74.

Zhang, L. et al. 2011. Knockdown of Akt1 promotes Akt2 upregulation and resistance to oxidative-stress-induced apoptosis through control of multiple signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 15(1):1-17.

Zhou, H. et al. 2011. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci* 12(1):30-42.