

Tesis Doctoral

Estudio de las interacciones celulares y moleculares involucradas en la progresión de los tumores mamarios. Componente luminal, mioepitelial y el nicho stem/progenitor

Berardi, Damián Emilio

2016

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:

Berardi, Damián Emilio. (2016). Estudio de las interacciones celulares y moleculares involucradas en la progresión de los tumores mamarios. Componente luminal, mioepitelial y el nicho stem/progenitor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6021_Berardi

Cita tipo Chicago:

Berardi, Damián Emilio. "Estudio de las interacciones celulares y moleculares involucradas en la progresión de los tumores mamarios. Componente luminal, mioepitelial y el nicho stem/progenitor". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6021_Berardi

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de las interacciones celulares y moleculares
involucradas en la progresión de los tumores mamarios.
Componente luminal, mioepitelial y el nicho stem/progenitor.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Damián Emilio Berardi

Directora de tesis: Dra. Laura Beatriz Todaro.

Director Asistente: Dr. Alejandro Jorge Urtreger

Consejero de estudios: Dr. Norberto D. Iusem

Lugar de trabajo: Área de Investigación, Instituto de Oncología
“Ángel H. Roffo”

Buenos Aires, 2016

ÍNDICE

ÍNDICE	2
AGRADECIMIENTOS	6
RESUMEN	12
RESUMEN EN INGLÉS	15
ABREVIATURAS.....	18
INTRODUCCIÓN	21
El Cáncer	22
Conceptos generales	22
Carcinogénesis	22
Diseminación metastásica	23
Células “stem” tumorales	26
Biología Tumoral.....	27
Ciclo Celular	27
Apoptosis	28
Autofagia.....	29
Relación Apoptosis – Autofagia	31
La glándula mamaria.....	31
El cáncer de mama	32
Clasificación molecular de los tumores mamarios	34
Clasificación clínica de pacientes de cáncer de mama.....	36
Células “stem” tumorales mamarias	37
Modelo tumoral mamario LM38-LP.....	38
El Sistema Retinoide y su relación con el cáncer	39
Vía de señalización de la Proteína Quinasa C(PKC)	45
PKC δ y Cáncer de mama.	46
PKC α y Cáncer de mama.	47
Relación entre el Sistema Retinoide y la vía de señalización PKC	47
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y METODOS	52
RESULTADOS	63
CAPITULO I: Identificación y caracterización del componente stem/progenitor de la línea LM38-LP	64
Aislamiento y caracterización del componente stem/progenitor.	65

CAPITULO II: Estudio del comportamiento de cada componente celular de LM38-LP bajo la modulación del sistema retinoide y de distintas isoformas de PKC.....	67
Perfil de expresión de PKCs y su modulación por ATRA.....	68
Rol de PKC α y PKC δ sobre la proliferación celular de la línea LM38-LP, en presencia del tratamiento con ATRA.	69
Rol de PKC α y PKC δ sobre la proliferación del componente stem progenitor de la línea LM38-LP, en presencia del tratamiento con ATRA.	70
CAPITULO III: Estudio de los mecanismos implicados en la respuesta biológica diferencial de la línea LM38-LP y su componente stem/progenitor por la inhibición de PKC δ	72
Análisis de la monocapa celular de LM38-LP por microscopia.....	73
Análisis de la distribución del ciclo celular	74
Estudio de la inducción de autofagia en las células LM38-LP	75
Implicancia de la inducción de autofagia por la inhibición de PKC δ , sobre la inhibición de la proliferación celular.	76
Implicancia de PKC δ sobre la proliferación y mantenimiento del componente stem.....	77
Rol de PKC δ sobre la diferenciación del componente stem.	80
Análisis del potencial metastásico de las células stem por el bloqueo de la actividad de PKC δ	81
Perfil de genes pluripotenciales del componente stem por la modulación de la actividad de PKC δ	83
Rol del mecanismo de autofagia en los efectos mediados por la inhibición de PKC δ en el componente stem.	84
CAPITULO IV: Evaluación del tratamiento combinado de ATRA y el inhibidor farmacológico de PKC α sobre distintos parámetros involucrados en la progresión tumoral.	86
Análisis de la proliferación celular.....	87
Estudio de Interacción de drogas	88
Análisis del ciclo celular	88
Análisis de la proporción de células luminales y mioepiteliales bajo distintos tratamientos	90
Análisis de la capacidad migratoria.	91
Análisis de la actividad de la metaloproteasa 2 (MMP-2) secretada.....	92
Análisis del perfil de expresión de los RARs bajo los distintos tratamientos..	93

CAPITULO V: Evaluación del efecto del tratamiento con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α sobre la proliferación, el mantenimiento y la diferenciación de las células stem/progenitoras tumorales mamarias.	96
Análisis de la capacidad de diferenciación de la células stem/progenitoras bajo los distintos tratamientos.....	97
Efecto del tratamiento combinado sobre la proliferación y la auto-renovación de la células stem/progenitoras.	100
Efecto del tratamiento combinado sobre la capacidad clonogénica de la células stem/progenitoras.	101
Perfil de genes pluripotenciales del componente stem por la modulación del tratamiento retinoide y el bloqueo de la actividad de PKC α	102
Análisis del perfil de expresión de los RARs bajo los distintos tratamientos	102
Participación de los receptores retinoides sobre la proliferación, diferenciación y auto-renovación del componente stem/progenitor.	103
CAPITULO VI: Evaluación del efecto de la terapia combinada de ATRA y el inhibidor farmacológico de PKC α sobre el crecimiento y la diseminación metastásica <i>in vivo</i>	105
CAPITULO VII: Implicancia de la expresión de PKC α , RAR β y RAR γ 2 en la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con cáncer de mama.....	108
DISCUSIÓN	113
BIBLIOGRAFÍA	128

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral se pudo realizar gracias a todo el soporte, compañía y ayuda que recibí en todos estos años...

En primer lugar le quiero agradecer a Laura, por haberme dirigido todos estos años, aceptándome como soy y darme la posibilidad de trabajar en libertad, sin presiones y siempre valorando cada logro conseguido y apoyándome en cada proyecto que intente realizar. Sin dudas que esta tesis doctoral no se hubiera realizado de manera exitosa si ella no hubiera sido mi directora.

También le quiero agradecer a Alejandro, mi director asistente. La categoría de asistente solo existe en los papeles, ya que fuiste full time en el día a día. Gracias por enseñarme a trabajar en cultivo, por estar siempre presente, ya sea para una consulta, escribir papers o corregir algo, por darme una mano cada vez que lo necesite. Gracias por apoyarme en cada idea que quise realizar.

De ambos aprendí cosas diferentes que me hicieron crecer no solo científicamente, sino como persona.

Le quiero agradecer a Alexis, el marido de Laura, ya que gracias a él encontré mi profesión, si no me hubieras guiado aquel día en el CBC cuando estaba sin saber que hacer de mi vida, cambiando de carrera, seguramente estaría vendiendo electrodomésticos en Frávega. Gracias por todas esas clases en la que fuiste mi profesor, que sin dudas me inspiraron para ingresar al mundo de la ciencia donde soy feliz.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme formado como profesional. Gracias al CONICET por darme el financiamiento necesario para llevar a cabo un Doctorado.

Como mencione más arriba, este logro es gracias a la compañía de toda la gente del lugar donde realice mi doctorado, el área de investigación del Instituto de Oncología "Ángel. H. Roffo".

Le quiero agradecer al personal de lavado, Leo, Sil, Alicia, Antonia y Gaby por ayudarme cada vez que lo necesite, su aporte al área y por ende al trabajo de todos es fundamental. Gracias a todo el personal de bioterio, Miriam, Lily, Ezequiel, Vanina, Paola, Marianela, Romina y Monica por siempre brindarme

ayuda, enseñarme y dejarme trabajar siempre que lo necesité. Gracias Mirta por brindarme tu ayuda, gracias Giselle por los momentos compartidos y por tu ayuda cuando lo necesité. Gracias Estela por ayudarme con el planteo de los experimentos de autofagia y todas las charlas sobre la actualidad y futuro del área de investigación. Gracias Martin por todos tus consejos, opiniones y estar siempre dispuesto a ayudarme en cualquier cosa que necesite, sin dudas tus ideas, algunas locas, me han ayudado a lo largo de estos años. Gracias Lydia por tu ayuda en estos años, tus opiniones y consejos sobre mi trabajo en los seminarios, como también en los temas no académicos.

Gracias Eduardo Farías por ser mi director a la distancia ese primer año, por tratar de ayudarme con cada consulta que te hice, por intentar de guiarme con los experimentos que intentaba plantear. Fuiste de mucha ayuda en ese primer año de mi doctorado.

Gracias Marina por toda tu ayuda, por creer en mí como científico, por siempre intentar ayudarme en lo que podías y aconsejarme lo que creías que mejor para mi, tanto en lo profesional como en la vida. Tu espíritu emprendedor ha sido una motivación, te deseo lo mejor para esta nueva etapa.

Gracias a las chicas de UTG, Marce, Chiara y Lucre por su alegría, su buena onda cada vez que nos cruzamos en el area. Gracias especialmente a vos Marce por toda la ayuda en estos años y por presentarme el mágico mundo de Chou-Talalay!

Gracias a la gente de inmunología, Lucas por ayudarme y enseñarme a extraer ganglios linfáticos, por tus preguntas y opiniones que siempre han despertado mucha curiosidad y ganas de investigar. Gracias Ana por ayudarme con todo lo que necesite estos años, hasta fuiste parte de la comisión de seguimiento de mi tesis doctoral, tus opiniones y consejos me han ayudado a mejorar esta tesis doctoral. Gracias Eduardo por todos los momentos compartidos, por compartir tu visión de las cosas, por las charlas y los chistes cómplices, por ayudarme cada vez que necesite algo. Gracias Denu, Yani y Barby, por todo lo compartido en todos estos años, jamás me voy a olvidar todos los lindos momentos que disfrute con ustedes, sobre todo con vos Denu. Gracias a Gabriel Fiszman por hacer que

cada día en el Roffo fuera divertido, tu partida del área dejó un gran vacío. Gracias Sarita por las charlas, los chistes, las salidas. Sos una genia y me divertí mucho con vos en el labo. Gracias Ada por tu compañía en los años donde compartimos mesada, me divertí mucho con tu acidez, sos una persona brillante y me alegra que hayas podido salir adelante, sos una gran científica. Gracias Ampí por aquellos primeros años, donde por accidente paso lo que paso jajaja, gracias por tus caras, tu personalidad única, espero que la vida científica nos vuelva a cruzar en un mismo laboratorio, te admiro científicamente, sos brillante y todavía no puedo creer como hiciste para clonar en el Roffo. Gracias Diego por con tu compañía todos los días, los mates y los asados y permitirme participar en tus trabajos.

Pero sobre todo, gracias a vos Elisa, por ayudarme, apoyarme y contenerme siempre. Te voy a estar eternamente agradecido por todo lo que hiciste por mí, por tus correcciones, tus consejos, tus enseñanzas para ser un mejor profesional, por ayudarme con el tema de mi mamá, yendo conmigo a cada médico cuando lo necesite, fuiste más que una simple investigadora, sin tu ayuda y soporte, no hubiera podido realizar esta tesis doctoral.

Gracias a todos mis compañeros y amigos de becariato, cada uno de ustedes ocupa un lugar insustituible en mi corazón y sin dudas, mis logros son gran parte a ustedes, gracias por aceptarme como soy, con mis locuras, acosos, chistes, tristezas, alegrías. Gracias por haberme hecho vivir una de las etapas más maravillosas de mi vida...

Gracias Jopi por tu alegría, por las charlas y consejos. Por tus valores que me ayudan a crecer como persona, gracias por las correcciones, juntadas de emergencia para practicar como dar el poster de la AACR en inglés, por brindarme tu cariño, y claramente por enseñarme a hacer diluciones! Gracias Tefo por tu compañerismo a lo largo de estos años, por darme la oportunidad de conocerte de verdad en este último tiempo, sos un gran pibe, extremadamente inteligente y aprendí mucho a tu lado. Gracias por tu ayuda en el día a día y sobre todo gracias por ese carnaval en Brasil, donde la estallamos aquella noche, donde tenías un contenido de alcohol en sangre importante jaja. Gracias Caro por tu amistad, por todas aquellas charlas y consejos, por las salidas y por crecer

juntos en muchos aspectos de la vida, por ayudarme en cada experimento y por darme fuerzas cada vez que lo necesite. Gracias Jorge por tu buena onda, nos conocimos poco tiempo pero fue lo suficiente para saber que sos un pibe genial, todavía me pasa de entrar a becariato y mirar arriba a ver si estas. Gracias Roco por tu alegría, entusiasmo y tu sinceridad sin filtro. Gracias por ese congreso en San Diego, donde la pasamos tan bien! Gracias por todas las discusiones, chistes, cargadas y salidas que compartimos, espero que nos volvamos a cruzar en un mismo laboratorio, nos divertiríamos mucho. Gracias Helen por tus años de locura y amistad, gracias por prenderte en cada chiste para horrorizar a los demás con nuestros comentarios escatológicos, gracias por esa gloriosa frase que dijiste aquel día que pensaste que perdiste todas las muestras del banco, gracias por tu cariño, por ser una compañera única a la cual voy a extrañar horrores, gracias por ayudarme en todo, hasta la misma corrección de esta tesis.

Gracias Solcito por tu amistad todos estos años, por tu ayuda en el día a día, por prenderte a mis bromas, por todas las salidas y buenos momentos que pasamos, Gracias Lily por tu amistad, por confiar en mi desde el día el primer día, por las miradas cómplices, por los chistes ácidos, por esa ironía única, por tu pasión por la ciencia y demostrarme que uno puede ser uno mismo. Gracias Cris por todos estos años, por nuestras charlas, proyectos científicos, por la bendita autofagia, por ese viaje al mundial, inolvidable!!! Por ser una amiga que está en todo. Gracias Mariana por ser mi amiga, por ayudarme siempre en todo, tanto en la vida como en la ciencia. Gracias por ese congreso hermoso en Brasil, donde nunca voy a olvidar lo que me produjo escucharte hablar en portugués jaja. Gracias Ine por ser mi compañera todos estos años, con vos me inicié en el mundo de la ciencia y junto a vos compartí todo lo que me toco vivir hasta ahora en esta profesión, crecí junto a vos científicamente y como persona. Gracias por tu ayuda, por tu amistad, por tu compañerismo, por todas las salidas, bromas, por tu cara de orto cada vez que hablo mal y/o te molestaba, no hay nadie como vos para eso jajaja. Por todos los consejos, por enseñarme cómo manejar en el mundo laboral. Realmente va a ser muy difícil seguir sin tenerte de compañera, ojala la ciencia nos vuelva a juntar. Gracias Rocio, esta tesis gran parte es gracias a vos. Gracias por las traspasadas de trabajo en el Roffo, por tu sabiduría, por tus valores y lealtad, por inspirarme científicamente, te admiro y

esa admiración me llena el alma para seguir adelante y tratar de superarme día a día, sos un ejemplo para mí, gracias por todas las salidas, los consejos, por ayudarme en mis crisis, por estar siempre en mis logros, por bancarme en todas, por haber hecho de becariato lo que fue, ya que sin dudas tu aura es tan brillante que eclipsa todo, te voy a extrañar horrores en el día a día en el laboratorio.

También le quiero agradecer a mi familia que me apoyo siempre que lo necesite, a mi papá y mi mamá por siempre creer en mí y darme todo lo que necesité. Sin ellos nunca hubiera podido lograr nada.

Gracias a vos Eve, por acompañarme en este largo camino que fue la realización de mi tesis doctoral, un año a la distancia y estos 2 últimos a mi lado. Gracias por tu contención, por bancarte mis humores y la escritura de esta tesis durante las noches donde no te deje dormir, por tu amor incondicional, sos lo mejor que me pudo haber dado la vida, te amo con todo mi corazón.

RESUMEN

Estudio de las interacciones celulares y moleculares involucradas en la progresión de los tumores mamarios. Componente luminal, mioepitelial y el nicho stem/progenitor.

El cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor incidencia en la población femenina y con mayor tasa de mortalidad en los países occidentales.

En el presente trabajo hemos explorado el comportamiento de cada uno de los componentes celulares del cáncer de mama, bajo la modulación de dos sistemas moleculares involucrados en la progresión tumoral: el sistema retinoide y la vía de la proteína quinasa C (PKC). Nos hemos propuesto dilucidar los mejores blancos terapéuticos que nos permitan, con una terapia combinada, inhibir la progresión tumoral mamaria a través de la reducción de la expansión del nicho stem/progenitor.

Para llevar a cabo estos estudios hemos utilizado principalmente la línea tumoral mamaria murina LM38-LP compuesta por células lumbinales, mioepiteliales y stem tumorales y de fenotipo triple negativo.

Es conocido que el Ácido retinoico ejerce algunos de sus efectos sobre la diferenciación celular y la reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con isoformas de PKC.

Hemos demostrado que el tratamiento retinoide produce una disminución de la expresión de PKC alfa en todos los componentes celulares tumorales. Además, la inhibición farmacológica de esta isoforma colabora, en forma aditiva y/o sinérgica, con el tratamiento del Ácido Retinoico, principalmente a través del aumento del receptor retinoide RAR β y la disminución del receptor retinoide RAR γ , reduciendo múltiples aspectos de la progresión tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otro lado, el tratamiento con Ácido Retinoico sólo ha podido modular positivamente la expresión de la isoforma delta de PKC en el componente luminal del tumor, en consecuencia la inhibición farmacológica de esta isoforma conlleva a efectos biológicos independientes del sistema retinoide en los otros componentes celulares. Este fenómeno se evidenció fuertemente en las células stem/progenitoras. En este sentido hemos demostrado que PKC delta está involucrada principalmente en el mantenimiento y auto-renovación del componente stem a través del mecanismo de autofagia.

Por último, el estudio del panel de receptores retinoides y de PKCs en cada uno de los componentes celulares del tumor LM38-LP, nos ha llevado a realizar un análisis *in silico* donde hemos evidenciado que bajos niveles del receptor retinoide RAR γ y de PKC α conjuntamente con altos niveles de RAR β , se asociaron con una mayor supervivencia libre de enfermedad en pacientes portadores de cáncer de mama subtipo basal.

Hemos hipotetizado que una terapia combinada de Acido Retinoico con un inhibidor farmacológico de PKC α , basado en la apoptosis y diferenciación y/o bloqueo de la auto-renovación de las células stem/progenitoras podría contribuir al tratamiento de pacientes con cáncer de mama no respondedores a las terapias convencionales.

Palabras Claves: Acido Retinoico; Proteína Quinasa C; Cáncer de Mama; Células Luminales; Células Mioepiteliales; Células Stem Tumorales.

RESUMEN EN INGLÉS

**Cellular and molecular interactions involved in breast tumors progression.
Luminal, myoepithelial and stem/progenitor niche components.**

Breast cancer is the malignant neoplasm with the highest incidence in the female population and the highest mortality rate in western countries.

In this study, we explored the behavior of each breast cancer cellular component, under the modulation of two molecular systems involved in tumor progression: the retinoid system and the protein kinase C (PKC) pathway. We aim to elucidate which are the best therapeutic targets that allow us to inhibit mammary tumor progression by reducing the expansion of the stem/progenitor niche, using a combined therapy.

The studies were performed using mainly the murine mammary tumor-derived cell line LM38-LP which presents luminal, myoepithelial and tumor stem cells and a triple negative phenotype.

It is known that retinoic acid exerts some of its effects on cell differentiation and reversion of the malignant phenotype through interactions with PKC isoforms.

We could demonstrate that the retinoid treatment causes a decrease in PKC alpha expression in all tumor cell components. Furthermore, the pharmacological inhibition of this isoform contributes, in an additively and/or synergistic function, with the retinoic acid treatment, mainly through the increase of RAR β and the decrease RAR γ retinoic receptors, thus impairing multiple aspects of tumor progression both *in vitro* and *in vivo*.

On the other hand, retinoic acid treatment increased PKC delta expression only in the luminal component, consequently the pharmacological inhibition of this isoform leads to biological effects independently of retinoid system in the other cell components. This phenomenon was strongly evidenced in the stem/progenitor cells. In this sense we could determine that PKC delta is mainly involved the maintenance and self-renewal of the stem component through an autophagy mechanism.

Finally, the study of retinoid receptors and PKCs expression panel in each cellular component, led us to perform an *in silico* analysis where we could define that basal-like breast cancer tumor patients, with low PKC alpha and RAR γ levels together with high RAR β levels, present an increased survival rate.

We hypothesized that a combined therapy using Retinoic Acid together with a PKC α pharmacological inhibitor, may contribute to treatment of breast cancer patients unresponsive to conventional therapies, based on apoptosis, differentiation and/or the blockade of stem/progenitor-cells self-renewal.

Keywords: Retinoic Acid; Protein Kinase C; Breast Cancer; Luminal Cells; Myoepithelial Cells; Cancer Stem Cells.

ABREVIATURAS

ME: Matriz extracelular (ME)

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

uPA: Plasminógeno de tipo uroquinasa

MC: Medio condicionado

VEGF-A: Factor de crecimiento del endotelio vascular A

TSP-1: Trombospondina-1

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas

AND: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

LEP: Células epiteliales lumbinales

MEP: Células mioepiteliales

CSC: Células stem tumorales

RE: Receptor de estrógenos

RPB: Receptor de progesterona

HER2: Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

RA: Acido retinoico

RBP4: Proteína sérica de unión a retinol

CRBP: Proteína celular de unión a retino

CRABP: Proteína celular de unión a acido retinoico

ADH: Enzima retinol deshidrogenasa

ALDH: Retinaldehido deshidrogenasa

ATRA: Forma trans del acido retinoico

RARs: Receptores retinoicos

RXRs: Receptores retinoideos

DBD: Dominio de unión al ADN

LBD: Dominio de unión al ligando

RARE: Elemento de respuesta al acido retinoico

HDAC: Desacetilasas de histonas

HATs: Acetiladas de histonas

PKC: Proteína Quinasa C

PML: Leucemia promielocítica aguda

SFB: Suero fetal bovino

3MA: 3-metiladenina

BAF: Bafilomicina A1

PI3K: Fosfatidilinositol quinasas tipo III (PI3K)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

SDS: Dodecil sulfato de sodio

PBS: Buffer fosfato salino

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

3D: Tridimensional

D-MEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

IP: Ioduro de Propidio

T.A: Temperatura ambiente

INTRODUCCIÓN

El Cáncer

Conceptos generales

Las células normales tienen perfectamente regulados todos los procesos fisiológicos. Cuando dichas células pierden la capacidad de regulación de estos procesos, pueden adquirir capacidad de proliferar indefinidamente y resistir señales de muerte. Este crecimiento descontrolado de células anormales que da origen a un tumor se denomina “neoplasia”. Puede distinguirse entre dos tipos de neoplasias de acuerdo a su agresividad, las benignas o malignas. Un tumor benigno es un crecimiento celular que se limita a su sitio de origen y por lo general no representa un riesgo para la vida. Por otro lado, las neoplasias malignas suelen tener una tasa de crecimiento rápida, son más indiferenciados que las células originales y son capaces de invadir nuevos tejidos. El cáncer se refiere a la neoplasia maligna [1].

Carcinogénesis

El proceso de carcinogénesis es un proceso que se desarrolla en múltiples etapas, en donde se acumulan numerosos eventos mutagénicos que conducen finalmente al cáncer [2]. Este proceso es inducido por agentes carcinogénicos o alteraciones heredadas en células que son sensibles a los mismos. Las células transformadas desarrollan una ventaja adaptativa determinada por la ganancia de características que les permiten crecer y expandirse en forma clonal, frente a las células normales dentro de un tejido determinado. Una de las características que permite la adquisición de esta ventaja adaptativa es la inestabilidad genómica que tienen las células que componen al tumor. Esta inestabilidad es capaz de generar mutaciones puntuales o de longitud variable al azar, alteraciones en los patrones de metilación génica e incluso re-arreglos cromosómicos, lo que conduce generalmente a la activación de proto-oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores [2].

En los años 2000 y 2011 Hanahan y Weinberg[3, 4] describieron las alteraciones de la fisiología celular indispensables para la transformación maligna y la progresión tumoral, así como también la importancia de la inflamación y el papel del microambiente en estos procesos: A) Inestabilidad genómica; B) Autosuficiencia respecto a señales de crecimiento; C) Metabolismo celular desregulado; D) Evasión ante señales inhibitorias del crecimiento; E) Potencial replicativo ilimitado; F) Angiogénesis sostenida; G) Invasión tisular y metástasis; H) Evasión del sistema inmune; I) Inflamación promovida por el tumor. (Fig.I.1.)



Figura I.1. Características principales de los tumores malignos. Modificado de Hanahan, D., Weinberg, R.A [4]

Diseminación metastásica

La metástasis es la propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. La diseminación metastásica es la consecuencia de un

complejo proceso selectivo, multifactorial y altamente ineficiente, ya que sólo el 0,01 % de las células que se desprenden de un tumor y entran en la circulación llegarán a dar un crecimiento secundario. En este proceso, denominado cascada metastásica (Fig.1.2.), participan factores inherentes a la célula tumoral y factores del huésped [5, 6].

Para que la metástasis sea exitosa la célula tumoral debe disociarse del tumor primario, invadir los tejidos del huésped, viajar por la circulación sanguínea y/o linfática o a través de las cavidades del cuerpo, escapar de la vigilancia inmunológica, detenerse en un órgano "blanco" al que invade y donde finalmente proliferará para formar un tumor secundario [6, 7]. Aquella célula capaz de desarrollar una metástasis debe atravesar exitosamente cada etapa de esta secuencia de eventos y si fracasa en algún paso será eliminada. Desde ya que el pasaje de una etapa a otra de la cascada es ininterrumpido y muchas de estas etapas pueden ocurrir simultáneamente. Además, se acepta que los tumores metastásicos tienen en sí mismos la potencialidad de reiniciar la cascada y metastatizar a sitios terciarios [6].

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

Formación del tumor primario: El tumor primario deriva de una única célula "fundadora" que adquiere ventajas adaptativas que le permitieron aumentar su capacidad proliferativa sobre las células normales [6].

Invasión: Las células tumorales logran invadir localmente el estroma desarrollando alteraciones típicas en su morfología así como en su capacidad de adhesión a otras células y a la matriz extracelular (ME) [4]. La invasión local al estroma ocurre por una serie de mecanismos similares a los utilizados para penetrar las finas vénulas y así intravasarse al torrente sanguíneo [8]. Las membranas basales son modificadas y atravesadas varias veces a lo largo de la cascada metastásica. Para ello es necesaria la presencia de un conjunto de enzimas extracelulares (proteasas) que catalizan la hidrólisis de proteínas. Entre dichas proteasas se destacan las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) [6, 9].

Angiogénesis: Los tumores son capaces de generar una neovascularización mediante el proceso de angiogénesis ya que requieren, al igual que los tejidos normales, de nutrientes y oxígeno. En los tejidos normales adultos la angiogénesis se encuentra activa sólo de manera transitoria en procesos tales como curaciones de heridas y el ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, durante la progresión tumoral, se produce un cambio por el cual el proceso angiogénico se encuentra activado la mayor parte del tiempo [3], de esta manera las células que componen el macizo tumoral pueden sobrevivir. Este proceso está mediado por diversos factores, reguladores positivos o negativos de la angiogénesis, tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A), regulador positivo, y la trombospodina-1 (TSP-1) como factor negativo[10].

Migración: Para que la célula invada y pueda intravasarse al torrente sanguíneo es necesario que pueda migrar a través de la ME desorganizada por la acción de las proteasas. Las células tumorales pueden migrar en forma direccional en respuesta a gradientes de concentración de factores solubles (quimiotaxis) o bien hacia proteínas insolubles de la ME (haptotaxis). Entre los agentes que estimulan la capacidad migratoria se encuentran los componentes de la ME, los factores de crecimiento y los factores secretados por la propia célula tumoral [6, 9].

Embolismo. La mayoría de las células individuales son rápidamente destruidas en la circulación, por lo que la única manera que las células tumorales pueden sobrevivir uniéndose con otras células tumorales y/o con componentes de la sangre.

Arresto. Las células se unen a los lechos capilares de los órganos distales por adherencia a las células endoteliales o a la membrana basal sub-endotelial[6].

Extravasación. La salida desde los vasos ocurre por mecanismos similares a los operados en la intravasación inicial[6].

Crecimiento secundario. Una vez en el parénquima del órgano blanco, las células empiezan a proliferar e inducen un nuevo proceso angiogénico para formar un tumor secundario[6].

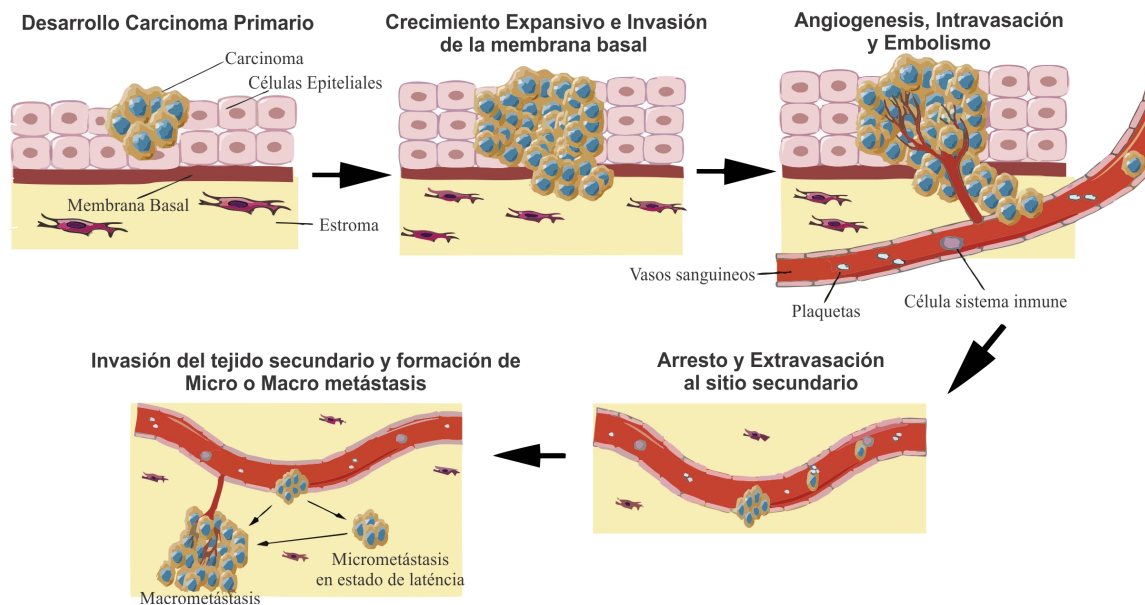


Figura I.2. Principales eventos de la cascada metastásica. Modificado de Jiang W.G. et al[6].

Células “stem” tumorales

La definición de célula stem es funcional. Se denomina así a toda célula que posee las siguientes propiedades[11]: a) *Potencialidad*: capacidad de diferenciarse en células especializadas y b) *Auto-renovación*: capacidad de dividirse manteniendo su estado indiferenciado, caracterizado por genes pluripotenciales, tales como Nanog, Sox2 y Oct4. [12].

En los últimos años se han acumulado evidencias que señalan la existencia de una nueva clase de células neoplásicas en los tumores, conocidas como “células stem tumorales” o “células iniciadoras de tumores”. Estas células que representan una pequeña parte de las células que componen un tumor, tienen alta expresión de genes pluripotenciales [12] y capacidad clonogénica [13]. Además, se ha hipotetizado que los tumores pueden originarse de la transformación de células stem de tejidos adultos normales o de células progenitoras más diferenciadas que adquirieron la capacidad de auto-renovación [14]. Las células stem tumorales (CSC) han sido implicadas tanto en la iniciación como en el mantenimiento del tumor primario, así como en la migración celular y el establecimiento de metástasis en sitios distantes [15]. Algunas teorías actuales postulan que el crecimiento de los tumores, como el de cualquier órgano, estaría sustentado por

las células stem tumorales [16]. Sin embargo las células stem/progenitoras tumorales son una minúscula parte dentro de él. Este hecho presenta un gran desafío tanto para las terapias como para la investigación básica. Esta circunstancia explicaría porque los tratamientos convencionales que reducen sustancialmente la masa tumoral removiendo células proliferantes fallan para curar al paciente en algunos tipos de cáncer, dado que las células stem/progenitoras tienen generalmente una tasa de proliferación muy baja y son insensibles a estos tratamientos [17, 18].

Biología Tumoral

Ciclo Celular

La maquinaria de control del ciclo celular esencialmente está formada por dos tipos de componentes: las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) y las ciclinas[9]. El ensamblaje de estas moléculas constituye el ritmo que lleva a la célula a avanzar por las distintas fases de su ciclo (Fig. I.3). El ciclo celular eucariota se divide en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M, y según la fase en que se encuentre la célula, variará su contenido de ADN [19]. Cuando una célula es recibe estímulos mitogénicos, tiene lugar una inducción de la síntesis de ciclinas del tipo D que formarán complejos con cdk4 y cdk6. En la fase G1 tardía se produce la síntesis y formación de complejos ciclina E-cdk2 cuya activación es clave para la conclusión de esta fase y la entrada en la fase S. En esta fase es cuando se expresa ciclina A, siendo necesaria para que la maquinaria de replicación lleve a cabo la síntesis de ADN. En la fase G2 se producen complejos ciclina B-cdk2, necesarios para iniciar los preparativos para la inminente mitosis [19] (Fig.I.3.).

En mamíferos, la interrupción de la proliferación es mediada por la proteína p27 que evita el ensamblaje y activación del complejo E-cdk [20]. Además se han identificado otras dos proteínas inhibidoras de la actividad de los complejos cdk-ciclina como son p16 y p21. La proteína p16 inhibe la activación de Ciclina D1-cdk4, en cambio la inducción de p21 es dependiente de p53 y ocurre cuando las células presentan daño en su ADN [21].

En la célula tumoral, las moléculas responsables del control del ciclo celular generalmente están desreguladas. Entre las alteraciones más frecuentes se incluyen amplificaciones y/o sobreexpresión de los genes de ciclinas D y E, mutaciones en las Cdk's y pérdida de función en sus inhibidores [22].

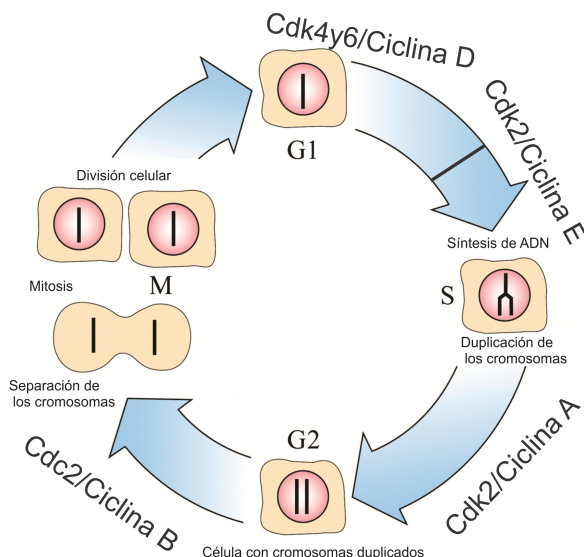


Figura I.3. Fases del ciclo celular. Adaptado de " El ciclo celular y sus consecuencias no programadas"[23]

Apoptosis

La apoptosis o "muerte celular programada" funciona como una barrera natural contra el desarrollo del cáncer. El mecanismo de apoptosis es esencial para el mantenimiento de la homeostasis, ya que es un mecanismo fisiológico de muerte inherente al desarrollo celular. Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores [24]. La apoptosis puede ser iniciada por diferentes vías:

La vía intrínseca está regulada por moléculas pro y anti-apoptóticas de la superfamilia de proteínas Bcl-2. Las principales proteínas anti-apoptóticas son Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, que actúan inhibiendo a las proteínas pro-apoptóticas, Bax y Bid. Cuando las proteínas anti-apoptóticas son inhibidas, las proteínas pro-apoptóticas inducen una permeabilización de la membrana mitocondrial externa y es liberado el citocromo C al citosol, donde se une al factor 1 activador de

proteasas apoptóticas (Apaf 1) para formar el apoptosoma. Este complejo proteico es capaz de activar las caspasas para desencadenar la muerte celular [25].

La vía extrínseca es iniciada por el estímulo de receptores de muerte en la superficie celular, miembros de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral (TNFR). Cuando esto sucede, se forma un complejo proteico de inducción de muerte (DISC) que incluye al receptor de muerte (por ej., FAS), al ligando (FASL) y a proteínas adaptadoras (FADD). La activación de DISC lleva al reclutamiento y activación de la caspasa 8, capaz de iniciar la cascada de caspasas que eventualmente lleva a la apoptosis [25].

Autofagia

La autofagia es un mecanismo conservado evolutivamente, donde macromoléculas ribosomas y orgánulos se degradan. Los elementos citosólicos que deben ser degradados son secuestrados por vesículas aisladas de doble membrana de origen no lisosomal. Los pasos iniciales son: A) Formación de una doble membrana de aislamiento, denominada fagóforo. B) La doble membrana comienza a elongarse mientras que va envolviendo a los elementos citosólicos a degradar. C) La vesícula termina su elongación sellándose con el contenido citosólico en su interior, dando origen al autofagosoma [26]. Luego el autofagosoma se fusiona con un lisosoma, lo que da origen a un autolisosoma donde, gracias a las enzimas aportadas por la fusión con el lisosoma, se produce la degradación de los componentes citosólicos secuestrados [27, 28] (Fig.I.4.). La inducción de autofagia se encuentra regulada por la acción jerárquica de proteínas efectoras, llamadas proteínas ATG (Autophagy related proteins), donde la proteína central es Beclin1(ATG6) y su interacción con la enzima PI3KIII [29]. Otro componente central en el mecanismo de la autofagia es la proteína LC3 (proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena liviana 3). Esta molécula es sintetizada como proLC3 y procesada por la proteína Atg4 a LC3-I, de localización citoplasmática. Cuando se induce la autofagia, LC3-I se conjuga covalentemente con el lípido fosfatidiletanolamina para dar la forma lipidada LC3-II, capaz de insertarse tanto en la membrana interna como externa del autofagosoma, siendo esencial en su proceso de formación (Fig.I.4.) [28, 30].

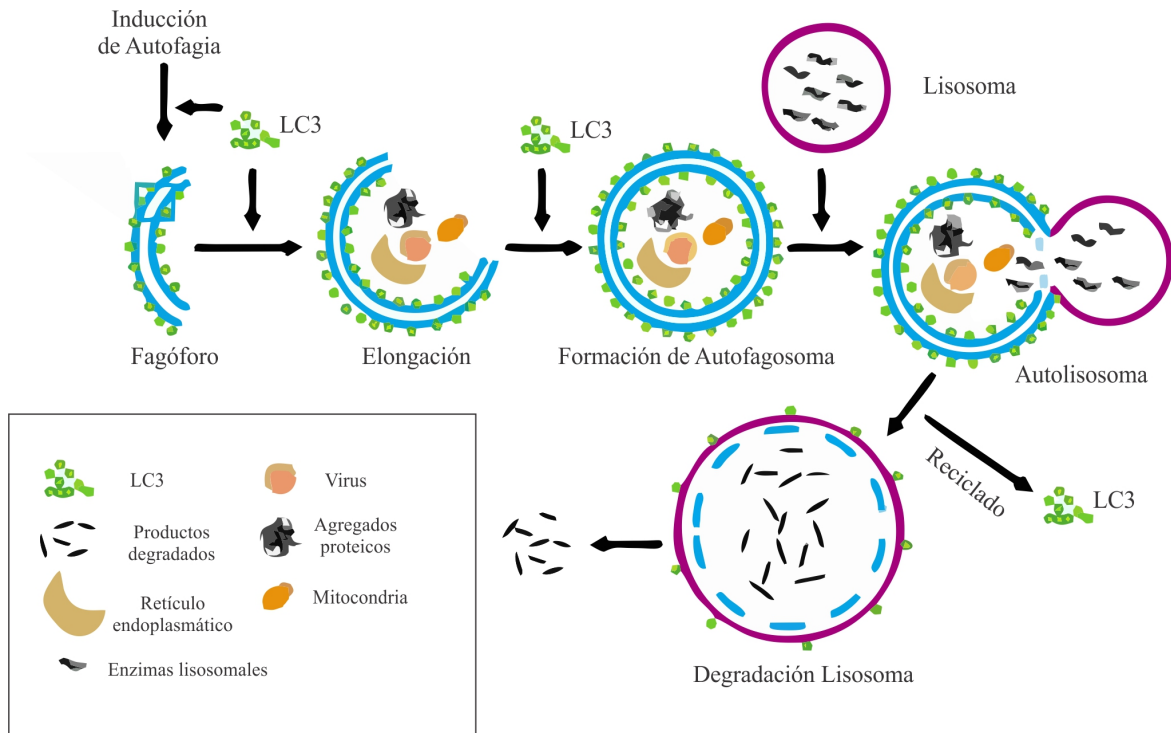


Figura I.4. Esquema de las distintas etapas del mecanismo de autofagia. Adaptado de Jing et al [28].

La autofagia fue descrita inicialmente como un mecanismo de protección que permite la supervivencia celular y la generación de nutrientes y energía, pero estudios recientes han demostrado que el estrés continuo también puede promover una forma no apoptótica de muerte programada llamada “muerte celular autofágica”, que ahora se considera como la muerte celular programada tipo II [31]. Por ejemplo, ratones que tienen inactivado el gen Beclin1 u otros componentes de la maquinaria autofágica, tienen una mayor susceptibilidad a tener cáncer [32]. Por lo tanto la autofagia podría servir como una barrera protectora, que debe ser también eludida durante el desarrollo de la carcinogénesis[32].

Sin embargo, se observó que elevados niveles de autofagia en las células tumorales, inducidos generalmente por la falta de nutrientes, la radioterapia o ciertos fármacos citotóxicos, tendría una función citoprotectora [26, 33]. Además, se ha demostrado que a través de la vía de autofagia, las células tumorales entran en un estado de latencia reversible [34].

Relación Apoptosis – Autofagia

Recientemente se demostró que la autofagia se encuentra muy interconectada con el mecanismo de apoptosis y viceversa, debido a que la proteína Beclin1 tiene la capacidad de unirse a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2/Bcl-xL. Cuando se gatilla la inducción de autofagia, la proteína Beclin1 se disocia de las proteínas anti-apoptóticas, bloqueando la apoptosis. En cambio, al inducirse apoptosis, las proteínas Bcl-2/Bcl-xL se mantienen unidas a la proteína Beclin1, bloqueando la autofagia [35]. Debido a que ambos mecanismos se encuentran tan interconectados, en la actualidad se empezó a evaluar si el bloqueo de la autofagia permite inducir apoptosis en distintos tipos de cáncer como así también a utilizar inhibidores de autofagia como terapia adyuvante a tratamientos convencionales[36].

La glándula mamaria

La glándula mamaria está formada por tejido glandular y grasa. El tejido glandular está formado por entre 15 y 20 lóbulos unidos por una red de tubos delgados llamados ductos [37]. Éstos se ramifican en ductos epiteliales terminales que culminan en una estructura lóbulo-alveolar [38] (Fig. I.5). Los lóbulos están formados a su vez por entre diez y cien acinos o alveolos, cada uno con un conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están constituidos por dos tipos celulares: una capa interna de células secretorias luminales y una capa externa, contráctil de células mioepiteliales. Además existen células stem/progenitoras capaces de dar origen a ambas estirpes celulares [37, 38] (Fig.I.5.). Las células mioepiteliales, ubicadas entre el estroma y el lumen, pueden controlar diversos aspectos fundamentales de la función luminal, principalmente aquellos relacionados con la respuesta a diferentes señales ya sean endocrinas o parácrinas [39-41] (Fig.I.5.).

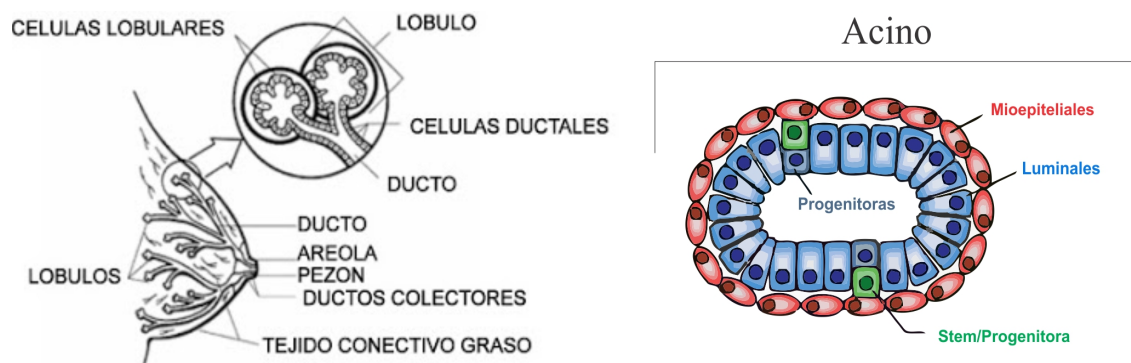


Figura I.5. Estructura de la glándula mamaria. La figura esquematiza la disposición de los principales componentes celulares de la mama humana.

El cáncer de mama

El cáncer de mama corresponde al tipo de cáncer con mayor incidencia en nuestro país, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres (Fig.I.6.) según datos del Ministerio de Salud de la Nación, siendo la principal causa de muerte en mujeres [42] (Fig.I.7.).

A pesar de los avances realizados en los tratamientos y en el diagnóstico temprano, que llevaron a reducir la tasa de mortalidad de esta enfermedad [43], cuestiones como recurrencia tumoral y resistencia a las terapias convencionales continúan siendo puntos clave en la investigación del cáncer de mama.

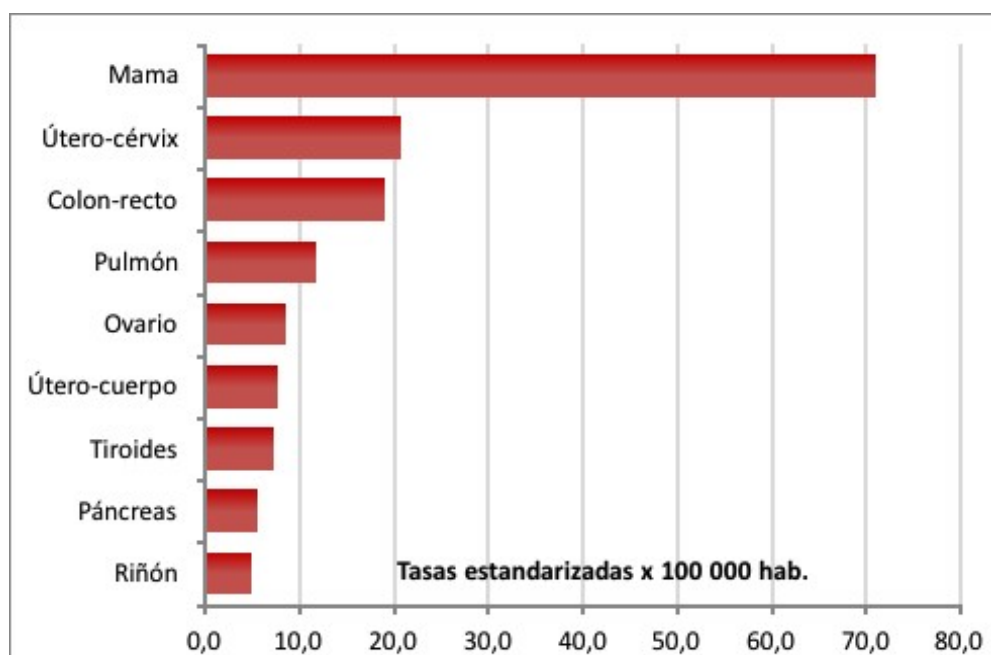


Figura I.6. Tasas estimadas por la IARC de incidencia de cáncer para las principales localizaciones en mujeres ajustadas por edad según población mundial. Argentina, 2012.
Fuente: SIVER/INC– Ministerio de Salud de la Nación, en base a registros de mortalidad de la DEIS. Argentina, 2014

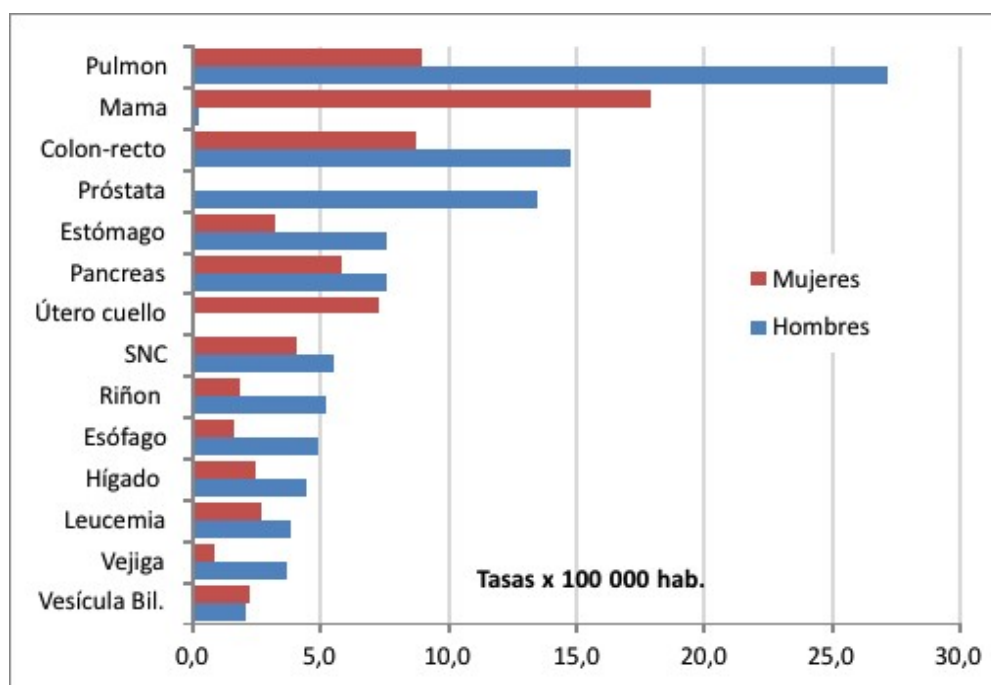


Figura I.7. Tasas estandarizadas por edad según población mundial de mortalidad específica por cáncer para los principales sitios tumorales en hombres y mujeres por cada 100.000 habitantes de Argentina en 2012. Fuente: SIVER/INC– Ministerio de Salud de la Nación, en base a registros de mortalidad de la DEIS. Argentina, 2014

Clasificación molecular de los tumores mamarios

El carcinoma mamario representa un grupo de tumores que muestra un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clínica. Para categorizar a las pacientes con cáncer de mama, determinar su pronóstico y elegir la terapia apropiada, se han utilizado tanto factores clínicos como patológicos. Mediante el uso de las técnicas histológicas se ha podido determinar principalmente el receptor de estrógenos (RE) y progesterona (RPG), amplificación de *HER2* y expresión de ki67.

La clasificación actual de los carcinomas de mama no refleja la heterogeneidad de los tumores en su comportamiento biológico, ni permite identificar los pacientes que presentarán mejores respuestas frente a las diferentes modalidades terapéuticas[44].

Actualmente se desarrolló una clasificación que se basa en el patrón de expresión de cinco genes que, además de cumplir las determinaciones antes mencionadas, su expresión combinada se asocia con el pronóstico[44-46]. Estos genes son los que codifican para los receptores de estrógenos, los receptores de progesterona, *HER2*, *HER1* y *citoqueratina 5/6* [47, 48]. Esto ha permitido clasificar los carcinomas de mama en seis subtipos:

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

Luminal.

Este subtipo de cáncer de mama expresa el RE y su patrón concuerda con el componente epitelial luminal de la glándula mamaria[44]. Además expresan citoqueratinas de bajo peso molecular (Citoqueratinas 8/18), de forma similar al epitelio luminal de los conductos mamarios. Al expresar receptores de estrógenos, estos tumores pueden tratarse con tamoxifeno (modulador negativo

del receptor de estrógenos en mama) o inhibidores de la enzima aromatasa (que bloquea la transformación de Testosterona en estrógenos), sin embargo muestran una baja respuesta a la quimioterapia neoadyuvante[49]. El subtipo Luminal además se divide en Luminal A y Luminal B.

Luminal A.

Alta expresión de genes relacionados con los RE y baja expresión de los relacionados con la proliferación celular comparado con luminal B [46]. A nivel inmunohistoquímico se caracteriza por la presencia de RE, RPG y citoqueratinas 8/18, y por la ausencia de sobreexpresión de *HER2*.

Luminal B.

Grado mayor que el luminal A, aunque puede haber excepciones. Expresan RE y/o RPG, además de *EGFR*, *HER2* y Ki67. Se consideran de peor pronóstico que los luminal A[46].

Sobre-expresión de *HER2*.

Este grupo incluye tumores negativos para RE y RPG y que además sobreexpresan otros genes dentro del amplicón *ERBB2*[44]. Este tipo tumoral generalmente tiene mutaciones en *p53*[45, 48] y alrededor del 50% de estos pacientes responden al tratamiento con trastuzumab (un anticuerpo monoclonal contra el receptor *HER2*, impidiendo la proliferación celular) [49].

Tipo basal.

En general se consideran negativos para receptores de estrógenos y progesterona y para *HER2*, aunque en un 9% de los casos expresan receptores hormonales y en un 10% sobreexpresan *HER2*, a diferencia de los tumores de mama estrictamente triple negativos. El subtipo basal se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas características de la capa basal (Citoqueratinas 5/6 y 17). Estos tumores suelen presentar mutaciones en el gen supresor de tumor *p53*, sobre-expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico

(EGFR) y presentan el comportamiento más agresivo a pesar de su alta sensibilidad a la quimioterapia[49, 50].

Existe un subtipo de cáncer de mama que correlaciona con la clasificación molecular dentro de los basales pero no es usado para definir ninguno de los subtipos moleculares descriptos. Este subtipo es el cáncer de mama triple negativo. Clínicamente, se trata de tumores negativos para RE, RPG y HER2 y además son positivos para citoqueratina 5/6. Este tipo tumoral es muy agresivo y metastásico [51, 52]. Además, como en la actualidad no existe un tratamiento específico para este tipo tumoral, tienen muy mal pronóstico[53].

Claudin-Low.

Este subgrupo se sitúa próximo al tipo basal, ya que ambos comparten algunas características a nivel de expresión génica, como son una baja expresión de *HER2* y del grupo de genes luminales. Se caracteriza por una baja expresión de los genes relacionados con las uniones estrechas y la adhesión intercelular, tales como *claudina -3,-4,-7*, *cingulina*, *occludina* y *caderina-E* y una elevada expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune y la matriz extracelular/mesenquimales[54]. Las células neoplásicas de estos tumores recuerdan al fenotipo de las células madre cancerosas por su mínima expresión de marcadores de diferenciación epitelial y una elevada expresión de *CD44*, *CD49f* y *ALDH1*[54].

Similar a la mama normal

En este grupo se incluyen los tumores que son negativos para los cinco marcadores: receptores de estrógenos, receptores de progesterona, HER2, HER1y citoqueratina 5/6[55]. Son tumores mal caracterizados que expresan genes habitualmente activados en tejido adiposo.

Clasificación clínica de pacientes de cáncer de mama

Esta clasificación permite agrupar a las pacientes según su pronóstico y toma en cuenta el tamaño del tumor (T), el ganglio centinela (Ng.cent), el estado de los ganglios linfáticos (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). Por esto se lo llama TNM[56]. Existen tablas de estadificación de TNM y de esta

forma el cáncer de mama puede clasificarse desde el estadio 0 al IV, donde el grado 0 implica cáncer *in situ*, mientras que los estadios I-IV indican cáncer invasivo. El grado IV también implica metástasis a órganos distantes (Tabla I.1)

Estadio	T	N	M
0	T0	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	Ng.cent	M0
	T1	Ng.cent	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla I.1. Clasificación TNM y grupos de estadificación de los tumores de mama. T, tamaño tumoral; Ng.cent, ganglio centinela; N, ganglios linfáticos; M, metástasis a distancia. Adaptado de Pautas en Oncología 2015 [57]

Células “stem” tumorales mamarias

Las células stem normales y tumorales han sido identificadas en la glándula mamaria en base a la expresión combinada de algunos marcadores de superficie tales como Sca-1, CD24⁻, CD 49f, ALDH, CD44⁺, CD133⁺[58, 59]. Recientemente se ha descrito que la expresión conjunta de Slug y Sox9 es fundamental para mantener el “estado stem” de las células stem mamarias, teniendo así estas la capacidad de diferenciarse a ambas estirpes celulares (Fig.I.8.), por lo que estos 2 genes pasarían a ser nuevos marcadores de células stem mamarias[60]. Aún hoy en día no se puede definir un grupo de marcadores que caractericen completamente una población de células stem, dado que todos los marcadores reportados en la actualidad son compartidos también por células progenitoras parcialmente diferenciadas e incluso por células totalmente diferenciadas y lo que varía entre las distintas sub-poblaciones es el grado de expresión de estos

marcadores. Por ello, se considera que el marcador final que determina la característica de célula stem mamaria es la capacidad de generar todas las estirpes celulares *in vitro* o una glándula mamaria completa *in vivo*, demostrando así tanto su potencial de auto-renovación, como su habilidad para diferenciarse a todos los tipos celulares que conforman la glándula mamaria[60].

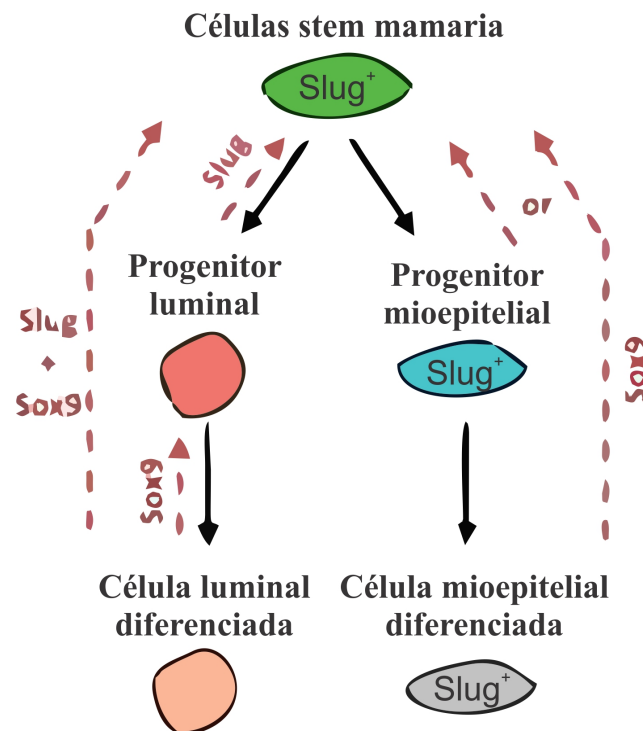


Figura I.8. Modelo que muestra la jerarquía epitelial mamaria, detallando la importancia de la expresión Slug y Sox9 en varios linajes epiteliales mamarios. Adaptado de Guo et al. [60].

Modelo tumoral mamario LM38-LP

Si bien los modelos experimentales que se utilizan para el estudio del cáncer de mama son extremadamente útiles, la mayoría están constituidos por un único tipo celular, generalmente luminal, por lo que no son del todo representativos de la glándula mamaria [61].

En el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” se han desarrollado diferentes modelos experimentales murinos de cáncer mamario para estudiar la progresión tumoral. Así, para llevar adelante este proyecto se cuenta con la línea celular LM38-LP, derivada del tumor mamario murino trasplantable M38 que surgió

espontáneamente en una hembra BALB/c del bioterio del Instituto. Esta línea celular tumoral mamaria murina es capaz de metastatizar en ganglio drenante y pulmón. Esta línea presenta células epiteliales lumbinales (LEP) rodeadas por células mioepiteliales (MEP)[40], componentes celulares críticos del epitelio glandular mamario (Fig.I.9.). Además, en los últimos años hemos identificado una población stem/progenitora, capaz de reconstituir un tumor con las características del M38 *in vivo* [62].

LM38-LP es un interesante modelo para estudiar interacciones celulares y moleculares relacionadas a la progresión tumoral. Esta línea es hormono-independiente y presenta similitud con el subtipo basal de cáncer de mama siendo fenotípicamente similar a los tumores mamarios humanos triple negativos ya que expresa citoqueratina 5 y no expresa receptor de estrógeno y HER2 [40, 62], lo que la convierte en una herramienta celular de gran importancia para la investigación básica.

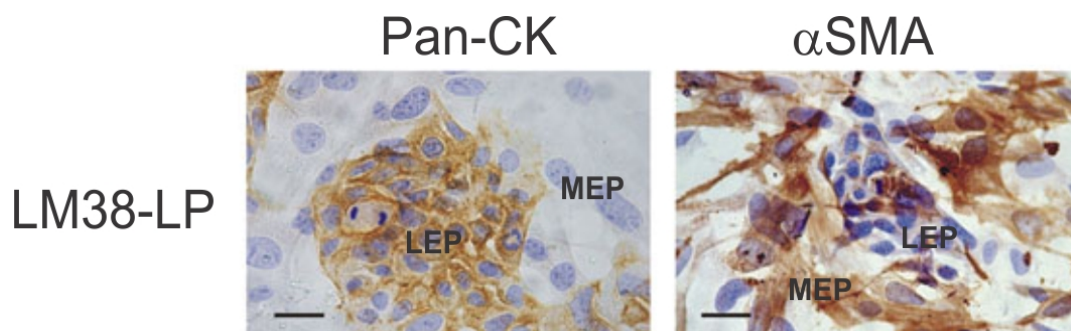


Figura I.9. Caracterización por Inmunohistoquímica de la línea celular tumoral mamaria murina LM38-LP donde se puede observar las poblaciones LEP (positivas para Pan-citoqueratinas (Pan-CK)) y MEP (positivas para actina de musculo liso (α -SMA)) [40] (Barra = 20 μ m).

El Sistema Retinoide y su relación con el cáncer

Los retinoides son una familia de moléculas que derivan de la Vitamina A (Retinol) (Fig.I.10.). El Retinol es secretado desde depósitos de reserva que se encuentran en el hígado y es transportado en sangre por la proteína sérica de unión al Retinol (RBP4) (Fig.I.11.). El complejo RBP4-Retinol interactúa con los receptores de membrana Stra6 provocando la endocitosis de retinol dentro de las

células. Dentro de la célula el Retinol se une a diferentes isoformas de la proteína celular de unión a Retinol (CRBP), quien lo expone a la enzima retinol deshidrogenasa (ADH) que cataliza la oxidación a retinal (Fig.I.11.). Este aldehído puede permanecer en el citoplasma como reserva o ser nuevamente oxidado por la retinaldehido deshidrogenasa (ALDH), a dos productos mayoritarios: la forma trans del ácido retinoico (ATRA) o la forma 9-cis del ácido retinoico (Fig.I.10.). Ambos retinoides se unen en el citoplasma a la proteína celular de unión a ácido retinoico (CRABP). Finalmente, el ácido retinoico (RA) que no se une a sus receptores nucleares, es metabolizado a productos más polares por la familia del citocromo P450 para su eliminación, siendo el 4-oxo RA mayoritario (Fig.I.11.).

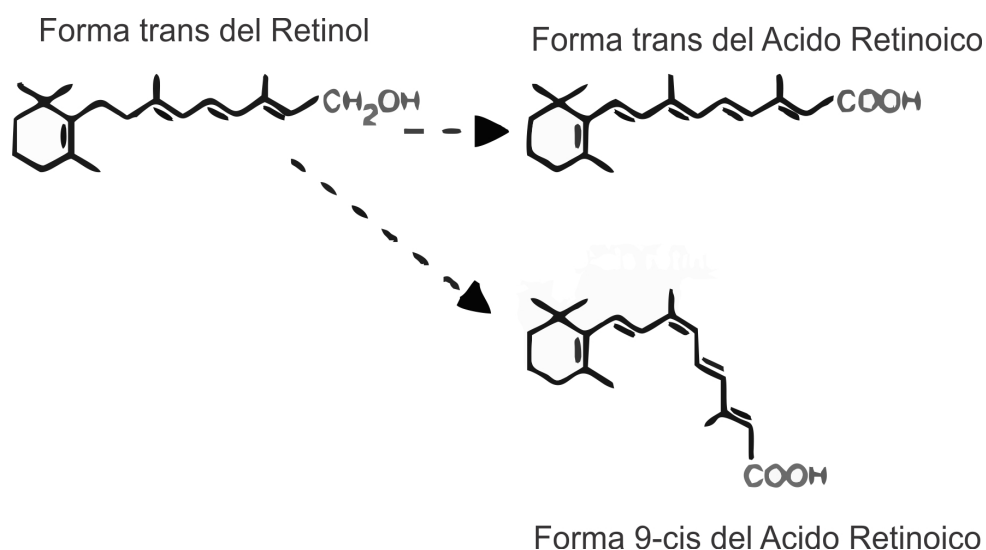


Figura I.10. Retinoides: Estructura química de la vitamina A (retinol) y sus derivados naturales biológicamente activos: forma trans y 9 Cis del RA.

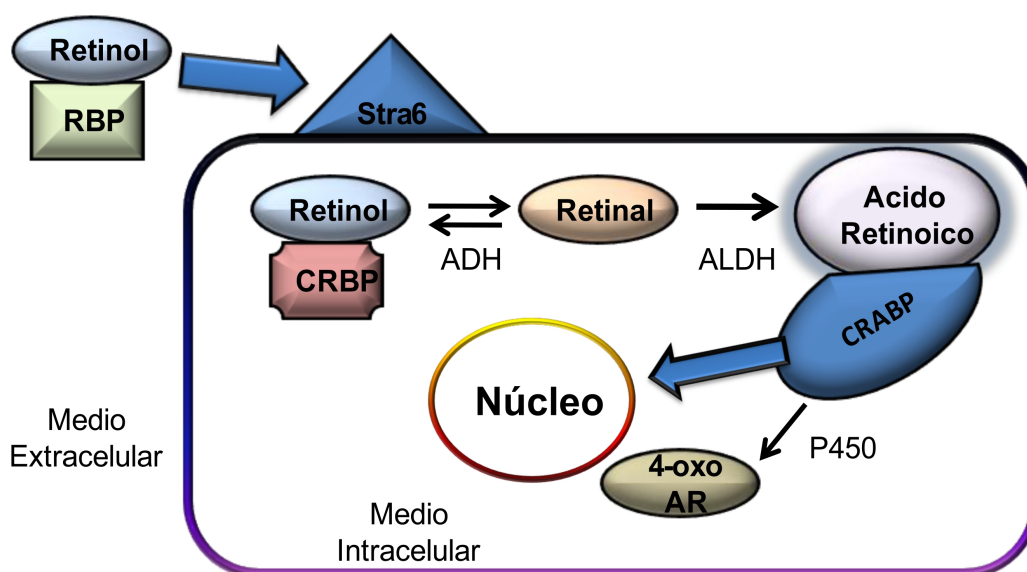


Figura I.11. Esquema del metabolismo del Retinol. El retinol o Vitamina A entra a la célula donde es transformado en metabolitos activos y retinoides de reserva.

Los metabolitos activos del RA entran al núcleo celular y ejercen sus funciones uniéndose a dos tipos de receptores nucleares: los Receptores retinoicos (RARs) y los Receptores retinoicos (RXR), los cuales forman un heterodímero que reconoce al elemento de respuesta al ácido retinoico (RARE) dentro de los promotores de los genes blanco (Fig.I.12.).

Por su parte, el heterodímero RAR/RXR en ausencia de ligando está unido a un complejo co-represor que contiene N-COR junto a desacetilasas de histonas (HDAC) (Fig. I.12.). El ATRA se une a RAR o a RXR, pero la forma 9-cis del RA solo puede unirse al RXR. Una vez que el heterodímero RAR/RXR interactúa con sus ligandos, disminuye la afinidad que tiene por el complejo co-represor y aumenta el reclutamiento de co-activadores como SRC-1,-2,-3, y acetilasas de histonas (HATs) regulando la activación transcripcional de los genes de respuesta al RA[63] (Fig.I.12.).

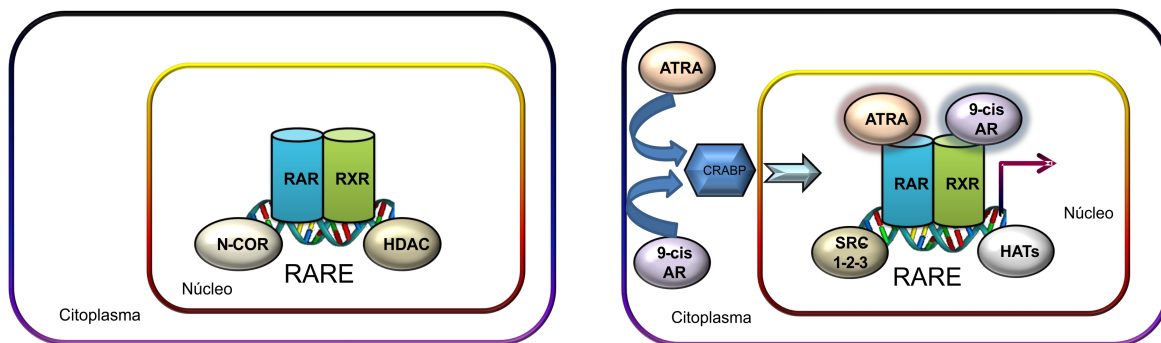


Figura I.12. Vía genómica clásica. Esquema de la activación de genes de respuesta al RA a través de los receptores nucleares.

Los receptores nucleares del RA regulan la expresión de múltiples genes involucrados en el desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis en varios tejidos. Existen 3 isotipos de receptores de Ácido Retinoico (RA): alfa, beta y gama (Fig.I.13.), codificados cada uno por un gen distinto. El receptor de RA alfa ($RAR\alpha$) se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos a diferencia de los $RAR\beta$ y $RAR\gamma$ que muestran una expresión tejido específica y son inducibles. En humanos, además, cada isotipo presenta varias isoformas. La expresión de la segunda isoforma en cada uno de los RARs ($RAR\alpha2$, $RAR\beta2$ y $RAR\gamma2$) es modulada por ATRA a través del elemento RARE presente en regiones promotoras de cada uno de estos genes, sugiriendo un nuevo nivel de señalización interactiva en esta vía de transducción[63] (Fig.I.12.).

Como la mayoría de los receptores nucleares, los RARs presentan una estructura modular compuesta por 6 regiones conservadas (A-F). La región C se encuentra altamente conservada y es la que porta el dominio de unión al ADN (DBD), el cual le confiere la capacidad de reconocer en forma específica secuencias particulares del genoma. La región E es la segunda región más conservada y es donde se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD). Es un dominio altamente complejo que contiene un bolsillo de unión al ligando, el principal dominio de dimerización y la función de trans-activación dependiente de ligando (AF-2). El extremo N-terminal o A/B contiene el sitio con la función de activación transcripcional independiente de ligando (AF-1), susceptible a múltiples

fosforilaciones que pueden regular la actividad transcripcional del receptor así como su capacidad para interactuar con moléculas que integran otras vías de señalización [64] (Fig.I.13.).

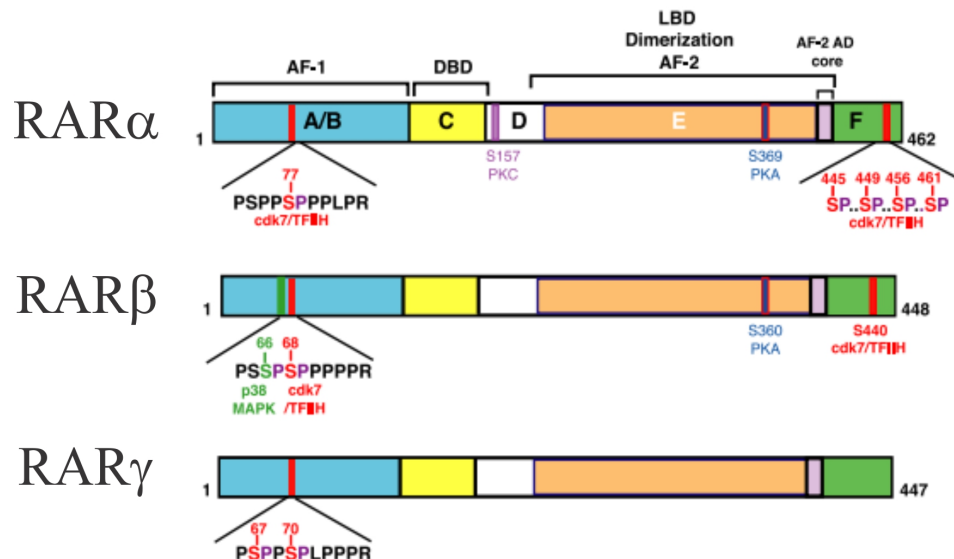


Figura I.13. Representación esquemática de los dominios funcionales y los principales sitios de fosforilación de los receptores nucleares de ácido retinoico. Adaptado de Julie Bastien y Rochette-Egly[64]

En la actualidad hay numerosas evidencias que demuestran que además de la clásica vía genómica los RARs también inducen respuestas no genómicas como la rápida y momentánea activación de numerosas cascadas de proteínas quinasas. En respuesta al RA, los RARs activan p38 MAPK como también la quinasa activada por stress, MSK1. En base a este dato, se descubrió que los RARs son fosforilados en respuesta al RA en dos residuos de serina localizados en el dominio no conservado N-terminal. Se demostró que la fosforilación de estos dos residuos de serina en RARα promueve la unión de este isotipo de receptor retinoide a su promotor, para luego gatillar la transcripción de genes con sitios RARE. En el isotipo gama del receptor retinoide, por ejemplo, la fosforilación en los mismos residuos provoca una modulación negativa de proteínas relacionadas con la unión de actina[63].

Existen evidencias que indican que los retinoides, a través de distintas vías de señalización, inhiben el ciclo celular de una gran variedad de células cancerosas,

modulando ciclinas e inhibidores del ciclo celular ya sea directa o indirectamente. Generalmente, el RA actúa como citostático causando un bloqueo en la fase G1 del ciclo y una disminución en la proporción de células en la fase S. Esto es provocado por un incremento en la expresión de p21 y p27 que se unen al complejo ciclina-Cdk, arrestando el ciclo celular. Luego del arresto, puede conducirse a la diferenciación, llevando a las células hacia un fenotipo menos maligno [65].

Además, los retinoides pueden inducir apoptosis en ciertos tipos celulares, por ejemplo en células de hepatoma humano y una variedad de líneas de células T leucémicas [66].

En la leucemia promielocítica aguda (PML), donde la proteína de fusión PML/RAR α impide la diferenciación de las células mieloides con los niveles endógenos de retinoide en el organismo, el tratamiento con ATRA eleva los niveles retinoides endógenos permitiendo así la activación de los genes de respuesta al RA, induciendo la diferenciación de los blastocitos inmaduros y lográndose la remisión de la enfermedad [66, 67].

Algunos de los retinoides están siendo usados en ensayos clínicos ya sea como quimiopreventivos o en combinación con interferones y antagonistas de estrógenos para el tratamiento o prevención del cáncer de mama. Los retinoides, como monodrogas, son efectivos inhibidores de células tumorales mamarias sólo en los primeros estadios de la progresión tumoral, pero no son efectivos en estadios avanzados o tumores de mayor agresividad. En muchos tejidos y órganos, la pérdida de RAR β está asociada con la tumorigénesis. En tejido mamario la pérdida de expresión de RAR β correlaciona con un mayor índice de tumorigenicidad, consecuentemente a este RAR se lo considera un supresor de tumores [67]. El receptor RAR β cumple la función de inhibir la actividad del complejo AP-1 (heterodímero formado por los productos de los proto-oncogenes c-Fos y c-Jun), disminuyendo la actividad de NF κ B lo que correlaciona con el efecto sobre la inhibición del crecimiento ejercida por los retinoides [66, 67].

Por otro lado, RAR γ tiene una expresión más restringida que otros isotipos RAR y su relación con la carcinogénesis ha sido menos estudiada. Sin embargo el uso

de agonistas selectivos para RAR γ indican que este receptor podría ser relativamente más importante que otros RARs en la regulación del crecimiento en algunos tipos de cáncer [66].

Vía de señalización de la Proteína Quinasa C (PKC)

Las enzimas PKC constituyen una familia de serin-treonin quinasas cuya activación lleva a la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares que participan en importantes eventos celulares, como proliferación, apoptosis, diferenciación y transformación maligna[68]. La familia PKC está compuesta por al menos 10 isoformas diferentes que se pueden clasificar en tres grupos. Las isoformas clásicas (α , β I, β II y γ) son activadas por Ca^{++} y DAG, las noveles (δ , ϵ , η y θ) sólo por DAG y las atípicas (ζ y ι) no son estimuladas por ninguno de estos compuestos. Cada isoforma consiste en una única cadena polipeptídica con dos dominios estructurales bien definidos: el regulatorio amino-terminal, que participa en las interacciones que regulan la actividad y localización de la enzima y el catalítico carboxilo-terminal con actividad quinasa, incluye sitios de unión a ATP y a distintos sustratos. Estos dominios están unidos por una región altamente sensible al clivaje proteolítico por proteasas celulares y en ausencia del sustrato, el dominio regulador inhibe al catalítico por medio de una zona denominada pseudosustrato [68] (Fig. I.14.).

Existe bibliografía que vincula la desregulación de las PKCs con la transformación maligna, ya que pueden funcionar como oncogenes [69]. Luego de su activación por estimulación de receptores, se produce una redistribución de las PKCs del citoplasma a diferentes membranas celulares, proceso conocido como “translocación”. Esta asociación de PKC con la membrana produce cambios conformacionales en la enzima, activando la fosforilación de un sustrato específico (Fig. I.14.). Si la estimulación es prolongada en el tiempo, se produce la pérdida total de la enzima por clivaje proteolítico. Se conoce que las diferentes isoformas translocan a distintos compartimentos intracelulares y esto estaría regulado por diferentes receptores intracelulares [68].

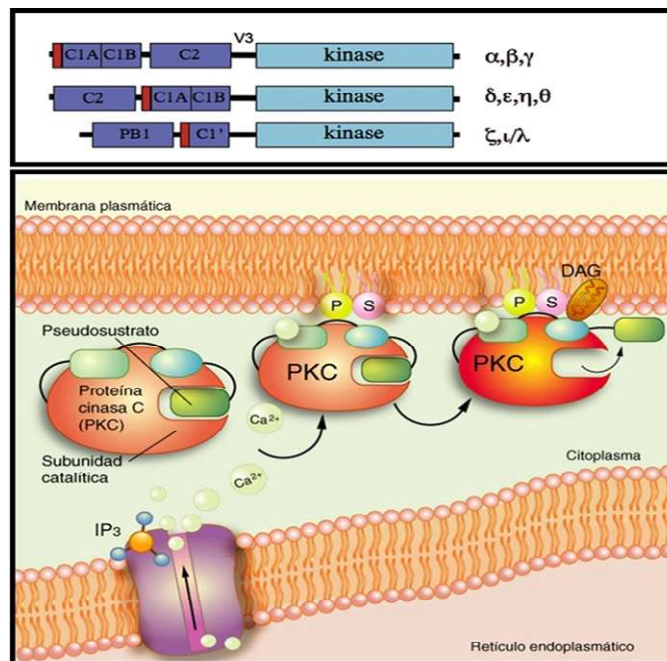


Figura I.14 Esquema general de los dominios de las PKC y su activación: El panel superior muestra la estructura general de los dominios de las isoformas clásicas, noveles y atípicas de PKC. El panel inferior ilustra de forma genérica el ciclo de activación para las PKC.

PKC δ y Cáncer de mama.

La isoforma delta de PKC cumple con roles bien complejos y variados. El grupo de Watanage et al [70] fue el primero que demostró un efecto negativo de PKC δ en la proliferación de células CHO.

Específicamente en cáncer de mama, PKC δ puede tener un rol dual, ya muestra funciones pro-proliferativas o pro-apopticos[68].

Por ejemplo, en células MCF7 y SKBR3, PKC δ inhibe la proliferación celular mediante el bloqueo de la fosforilación de ERK y AKT[71, 72].

Por otro lado, PKC δ es capaz de aumentar la expresión de NF κ B promoviendo la supervivencia en células tumorales murinas[73]. Además, PKC δ es fundamental para la migración celular en células mamarias cancerosas que tienen un elevado nivel de expresión del receptor EGF. Consistente con estos datos, se ha demostrado que existe una correlación entre la expresión de PKC δ y el potencial metastásico del tumor, ya que inhibiendo esta isoforma, se inhibe el desarrollo de metástasis y la migración de las células cancerosas mamarias[73].

PKC α y Cáncer de mama.

La isoforma alfa de PKC cumple un rol pro-proliferativo en cáncer de mama. Por ejemplo, Se observó que la línea T47D, que no expresa PKC α , tiene una menor tasa proliferativa comparada con líneas celulares PKC α positivas: MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468. Más análisis demostraron que PKC α es crucial para que las células tumorales mamarias puedan proliferar en condiciones de cultivo libres de suero bovino, no necesitando tener actividad catalítica para poder mediar dicho efecto. En cuanto a la migración celular, PKC α aumenta la habilidad de las células de poder migrar lo que causa un mayor índice de metástasis en tumores PKC α positivos[74]. Además, estudios en pacientes mostraron que la expresión de PKC α en cáncer de mama está asociada con una peor pronóstico, especialmente en pacientes portadores de cáncer de mama triple negativo[74, 75].

Por otro lado, recientemente se ha descrito que PKC α es un nodo de regulación central, ya que es fundamental para la inducción de la transición epitelio-mesenquimática en las células stem tumorales mamaria[76].

Relación entre el Sistema Retinoide y la vía de señalización PKC

Se ha postulado que los retinoides ejercen algunos de sus efectos sobre la diferenciación celular y la reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con algunas isoformas de la PKC y sus vías de señalización[77, 78]. Algunos estudios han demostrado que PKC δ juega un rol importante en la regulación de genes dependientes de RA y que llevan a la diferenciación de la PML, donde se ha demostrado también que esta isoforma forma complejos con el RAR α para unirse a sitios RAREs [79]. Ha sido postulado que los retinoides alteran la localización celular de la PKC α , consistente con su inactivación en células de adenocarcinoma endometrial, concurrentemente con la diferenciación de estas células, lo que sugiere que las alteraciones en la actividad de la PKC inducida por los retinoides están asociadas con la reversión del fenotipo maligno [77, 80]. No obstante, el mecanismo por el cual los retinoides regulan PKC no está dilucidado. Algunos autores reportaron la inhibición de PKC por ATRA mientras que otros encontraron una activación y translocación a la membrana celular. Comparando

la secuencia de PKC con la de los receptores de RA, se descubrió que el ATRA puede unirse al bolsillo de dominio proteico C2 de las PKC clásicas por lo que existiría una vía de señalización independiente de los receptores nucleares, lo que conduciría a la modulación de PKC α [81]. Además existe evidencia de que PKC δ actuaría como co-activador del complejo RAR/RXR [79]. Más aún, nuestro grupo de trabajo ha dilucidado, en el modelo LM3 (carcinoma de mama murino de tipo luminal HER+), una interacción (crosstalk) mecánica entre el sistema retinoide y la vía de la PKC, donde pudo evidenciarse que PKC δ , ingresa al núcleo celular y participa del complejo transcripcional uniéndose al receptor RAR α [82]. Además, se observó que la actividad de PKC α sería parcialmente necesaria para la transcripción de genes de respuesta al ácido retinoico [82].

Teniendo en cuenta que el RA actúa como modulador de la proliferación y diferenciación en distintos tipos celulares y que se ha postulado que ejerce algunos de sus efectos a través de interacciones con algunas isoformas de la PKC, nos preguntamos si conociendo a fondo esa interacción, podremos proponer mejores tratamientos para el paciente con cáncer de mama. Debemos tener en cuenta que el mecanismo por el cual los retinoides regulan PKC no está dilucidado. Asimismo, nos preguntamos si alguna de las moléculas involucradas en estas interacciones podrían ser un mejor blanco terapéutico para el tratamiento eficaz de este tipo de patologías.

OBJETIVOS

Objetivo general: Dilucidar los mejores blancos terapéuticos del Sistema Retinoide y la vía de la Proteína Quinasa C, que nos permitan con una terapia combinada inhibir la progresión de tumores mamarios con componentes celulares luminales y mioepiteliales.

Hipótesis: El tratamiento con moduladores de la vía PKC conjuntamente con retinoides inhibe la progresión de los tumores mamarios actuando principalmente sobre el nicho stem/progenitor.

Objetivos específicos:

- A. Identificar y caracterizar el componente stem/progenitor de la línea LM38-LP**
- B. Evaluar la participación de las isoformas α y δ de PKC en la respuesta al tratamiento con retinoides de tumores mamarios, haciendo énfasis en cada componente celular.**
- C. Dilucidar la mejor combinación de moduladores de PKC y/o retinoides que conduzcan a lograr la inhibición/diferenciación del nicho stem/progenitor.**
- D. Estudiar *in vivo* el efecto del tratamiento combinado (modulador PKC/retinoide) sobre el crecimiento y progresión tumoral.**

MATERIALES Y METODOS

MODELO TUMORAL LM38-LP

El adenocarcinoma M38 surgió en forma espontánea en una hembra BALB/c del bioterio del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. El tumor es trasplantable en ratones singeneicos generando adenocarcinomas con diferenciación papilífera, capaz de metastatizar en nódulo linfático drenante y en pulmón. A partir del tumor M38 se establecieron varias líneas celulares continuas. La sub-línea de repique bajo LM38-LP contiene dos componentes celulares principales que se mantienen hasta el pasaje 30 en cultivo. Estos dos componentes fueron caracterizados antigénicamente como células luminales y mioepiteliales[40].

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

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

RETINOIDES, INHIBIDORES DE PKC α , PKC δ Y DOSIS

Ácido *All-trans* Retinoico (ATRA): 0.25-1 µM (Calbiochem), Antagonista de RAR β : LE 200nM (TOCRIS), Antagonista de RAR γ : MM 1µM (TOCRIS), Inhibidor farmacológico de PKC α : Gö6976 0.25-1 µM. Inhibidor farmacológico de PKC δ : Rottlerin 1 µM. Todos los compuestos fueron diluidos en dimetil sulfoxido (DMSO, vehículo).

SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES LUMINAL Y MIOEPITELIAL

Monocapas subconfluentes de células LM38-LP, tratadas o no con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α , se despegaron con una solución EDTA

2mM/PBS. Luego de un lavado con PBS, se re suspendieron $2,5 \cdot 10^6$ células en 1 ml de medio completo con el agregado de 12,5 μ l de anticuerpo contra Cadherina-E (2,5 μ g anticuerpo cada $2,5 \cdot 10^6$ células) (Santa Cruz) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 900 rpm, el pellet obtenido fue lavado con Buffer I (0,1% Albúmina Bovina Sérica en 2 mM EDTA/PBS) y se repitió la centrifugación. Se re suspendieron las células en Buffer I con 25 μ l de inmunopartículas magnéticas (Dynabeads M-280 Sheep Anti Rabbit, Invitrogen) y se incubaron por 20 minutos a 4°C. Luego, la suspensión celular fue transferida a un nuevo tubo y se le agregó 1 ml de Buffer I. Se colocó este tubo en un magneto inclinado durante 1 minuto para permitir el pegado de las inmunopartículas magnéticas. Se recogió el sobrenadante (población negativa, células MEP) sin retirar el tubo del magneto y se lavó el tubo repetidas veces con Buffer I. Las células unidas a las inmunopartículas magnéticas fueron re suspendidas en Buffer I (población positiva, células LEP).

FORMACIÓN DE MAMOESEFAS POR CÉLULAS STEM TUMORALES

Una suspensión monocelular de la línea LM38-LP fue sembrada en placas de baja adhesión a una concentración de 2×10^4 células por pocillo con 2 ml de medio para cultivo de células stem/progenitoras mamarias, libre de suero (DMEM F12, 20 ng/ml EGF, B27 sin vitamina A de Invitrogen). Las mamoesferas formadas fueron observadas por contraste de fase en un microscopio invertido y se tomaron fotografías.

Por otro lado estas células fueron disgregadas y cultivadas para evaluar su capacidad de formación de mamoesferas secundarias, como medida de auto-renovación. Estas células disgregadas también fueron cultivadas en condiciones de cultivo en monocapa para inducir la diferenciación de las células seleccionadas y evaluar la capacidad de regenerar la línea LM38-LP.

EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR

La expresión a nivel de ARN mensajero de los receptores RARs, genes pluripotenciales y las PKCs fue analizada por RT-PCR. Para ello, mamoesferas o células LM38-LP separadas o no por inmunopartículas fueron tratadas o no con

Rottlerin o ATRA y/o Gö6976 (1 μ M para cada uno) por 48 hs. El ARN mensajero total fue extraído por incubación con Tri Reagent por 5 min. a TA. Se agregaron 0,2 ml cloroformo por ml de extracto de Tri Reagent inicial. Estas muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 3 min. y centrifugadas a 12000 rpm por 15 min. a 4°C. La fase acuosa fue incubada con isopropanol frío (0,5 ml) por 10 min. a temperatura ambiente en agitación suave y centrifugada nuevamente a 12000 rpm por 10 min. El precipitado de RNA fue lavado con etanol al 75%, centrifugado a 6800 rpm por 5 min., re suspendido en agua DEPC y se midió su concentración con Nanodrop. Se partió de 2 μ g de RNA para la retrotranscripción a cDNA utilizando iScript cDNA Syntesis kit (Bio Rad) según las indicaciones del fabricante. Los productos de PCR fueron obtenidos usando cebadores (*primers*) para los siguientes ARNm: RAR α , RAR β , RAR γ 1y RAR γ 2 de Zelent et al.[83]; Nanog y Sox2 de Zhang et al.[84]; Sox9 y Slug de Guo et al. [60]; PKC α , PKC δ y GAPDH de Qiu et al.[85].

WESTERN BLOT

Con el fin de evaluar mediante Western Blot la expresión y modulación de distintas proteínas, se prepararon lisados de células LM38-LP o mamoesferas. A tal efecto se sembraron 3x10⁵ células LM38-LP en placas de 100 mm con medio completo por triplicado. Luego de 24 horas este medio fue reemplazado por los correspondientes tratamientos. Finalmente las células tratadas con los diferentes tratamientos fueron lisadas en solución de Tritón 0,1% en PBS suplementado con inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Sigma), en agitación por 40 minutos a 4°C. Los lisados celulares fueron sonicados y el contenido proteico fue determinado utilizando el método de Bradford (Bio-Rad). Cincuenta microgramos de lisado total fueron diluidos en buffer de siembra conteniendo 100 mM Tris pH 6,8, 10% glicerol v/v, 50 mg/ml SDS, 0.5 mg/ml de azul de bromofenol y 5% de β -mercaptoetanol. Las muestras fueron calentadas a 100°C por 2 minutos antes de sembrar en geles de poli-acrilamida al 10% o 15% dependiendo del peso molecular de la proteína a analizar (SDS-PAGE-Laemmli). Los geles fueron corridos en buffer 0,25 M Tris, 2 M Glicina y 1% SDS a pH 8,3. Las proteínas corridas en los geles fueron transferidas a membranas de nylon (PVDF, Amersham) utilizando un transferidor líquido (Bio-Rad). Las membranas fueron

incubadas en buffer de bloqueo (5% caseína en 0.1% Tween-20 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (T.A.). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo específico (ver tabla a continuación), a 4°C toda la noche (ON). Finalmente, luego de lavados con PBS/Tween fueron expuestas a los correspondientes anticuerpos secundarios (1:5000) conjugados a peroxidasa. El revelado se realizó por quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se cuantificaron por densitometría empleando el programa Gel Pro Analyzer. Los valores obtenidos se expresaron en Unidades Arbitrarias (UA) y se normalizaron en función a las UA de actina. Los controles de inespecificidad fueron realizados omitiendo el primer anticuerpo.

Anticuerpo	Dilución	Especie	Empresa
PKCα	1:500	Ratón	BD No.610107
PKCδ	1:500	Ratón	BD No.610397
LC3	1:1000	Conejo	Cell Signaling No.2775
Actina	1:5000	Ratón	Sigma No.A5441

CAPACIDAD PROLIFERATIVA

Se evaluó la capacidad proliferativa de las células LM38-LP frente al tratamiento con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α o el inhibidor farmacológico de PKC δ a distintas dosis. Para ello se sembraron 5×10^4 células por triplicado en placas de 35 mm (Nunc) con medio completo en presencia de los diferentes tratamientos. Se evaluó el crecimiento por recuento de las células vivas en cámara de Neubauer en presencia de Azul Tripán a las 96 hs de tratamiento.

ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE DROGAS

A partir de los ensayos de proliferación, que se evaluaron por recuento directo, se realizó el Test de Chou-Talalay para el estudio de interacción de drogas, utilizando el software disponible comercialmente Calcosyn[86]. Este test da como resultado un Coeficiente de Interacción (CI). El CI es una medida cuantitativa del grado de interacción entre dos o más drogas: $CI > 1$ indica antagonismo entre las drogas; $0.9 < CI < 1$ indica aditividad entre las drogas; $0.85 < CI < 0.9$ indica leve sinergia entre las drogas; $0.7 < CI < 0.85$ indica moderada sinergia entre las drogas;

0.3<CI<0.7 indica sinérgica entre las drogas; 0.1< CI<0.3 indica una potente sinergia entre las drogas [86].

ENSAYO DE CLONOGENICIDAD

Mamoesferas de aproximadamente 50µm de diámetro fueron tratadas durante 4 días con ATRA (0,5 µM), Gö6976 (0,5 µM) y sus combinaciones. Transcurrido este tiempo las mamoesferas fueron disgregadas con tripsina y 3000 células derivadas de mamoesferas de cada grupo se sembraron por triplicado en placas de 35 mm se mantuvieron con medio completo. Luego de cuatro días de tratamiento, las colonias fueron fijadas con formol neutro y teñidas con Cristal Violeta. Se contaron las colonias mayores de 20 células bajo lupa y se calculó la capacidad clonogénica como el porcentaje de colonias en función del número de células sembradas.

ESTUDIO DEL CICLO CELULAR

Se estudio el efecto del ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKCα o el inhibidor farmacológico de PKCδ sobre la distribución en el ciclo celular de la línea LM38-LP. Para ello las células fueron tratadas o no con Rottlerin (1µM) o ATRA (0,5 µM) y/o Gö6976 (0,5 µM) por 96 hs, levantadas por tripsinización, lavadas con PBS y fijadas con etanol 70%. Después de la tinción con 100 µg/ml de ioduro de propidio, las muestras fueron examinadas en un citómetro BD FACS CANTO y analizadas con los programas Diva y Flowjo (Becton Dickinson y Ashland).

CULTIVOS 3D EN MEMBRANA BASAL RECONSTITUIDA (MATRIGEL)

Se re suspendieron 4×10^5 células provenientes de mamoesferas pre-tratadas con Rottlerin (1µM) o ATRA (0,5 µM) y/o Gö6976 (0,5 µM) por 96 hs en 400 µl de DMEM F12 con 2% SFB, 5ng/ml de EGF 2% y Matrigel (Matriz extracelular, BD), la suspensión monocelular fue sembrada sobre un portaobjeto multicámaras (*labteks*, BD Biosciences) conteniendo 40µl de Matrigel. Cada 96 hs se realizó el cambio de medio. Luego de 16 días en cultivo se pudo detectar la formación de colonias. Las células fueron fijadas con p-formaldehído 2% durante 20 minutos a

T.A. Los cultivos en 3D se observaron con contraste de fase en un microscopio invertido y se tomaron fotografías para analizar morfología.

ANALISIS DE POLARIDAD CELULAR EN CULTIVOS 3D

Cultivos 3D fueron fijados con formol 4% por 15 minutos y permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% frío durante 15 minutos a 4°C. Luego de lavados con PBS-Glicina se incubaron con buffer de bloqueo (solución de lavado IF (5 g de BSA, 10 ml de Tritón X-100, 2 ml de Tween en 500 ml de PBS) + 10% suero fetal bovino). Luego las células fueron incubadas con Fallaodina-Alexa 488 (1:500) por 2 hs a T.A. Luego, las células fueron incubadas con DAPI (1:2000) durante 10 minutos a T.A., lavadas con PBS y montadas con *Prolong anti-fade* (Molecular Probes, Invitrogen). Las fotografías fueron tomadas con microscopio de fluorescencia confocal (Leica TCS SP5 DM)

IMMUNOFLUORESCENCIA

Se partió de 2×10^4 células sembradas en portaobjetos divididos en 8 pocillos (*labteks*, BD Biosciences), que luego de 24 hs fueron tratadas o no con Rottlerin (1 μ M) por 48hs. Posteriormente las monocapas fueron fijadas con formol 4% por 5 minutos y permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% frío durante 10 minutos a 4°C. Luego de lavados con PBS se incubaron con buffer de bloqueo (solución de lavado IF (5 g de BSA, 10 ml de Tritón X-100, 2 ml de Tween en 500 ml de PBS) + 10% suero fetal bovino). Las células fueron incubadas ON a 4°C con los anticuerpos primarios en buffer de bloqueo. Luego de lavar con solución de lavado IF, las células recibieron el anticuerpo secundario (1:500, Alexa fluor, Molecular Probes) en buffer de bloqueo por 1 hora a T.A. Luego, las células fueron incubadas con DAPI (1:2000) durante 10 minutos a T.A., lavadas con PBS y montadas con *Prolong anti-fade* (Molecular Probes, Invitrogen). Las fotografías fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia Nikon (Eclipse E400; Nikon, Tokio, Japón), usando una cámara digital Coolpix Nikon.

Anticuerpo	Dilución	Especie	Empresa
LC3	1:1000	Ratón	Cell Signaling No.2775
Alexa-488	1:500	Conejo	Invitrogen No.A-11094

EVALUACIÓN DE AUTOFAGIA

Para estudiar la autofagia evaluamos la presencia de LC3 por inmunofluorescencia, la cual fue descripta más arriba, ya que nos permite detectar no sólo un aumento en los niveles de LC3 sino la aparición de un puntillado característico de la formación de autofagosomas.

Por otro lado evaluamos el flujo autofagico analizando la conversión de LC3-I a LC3-II en presencia y/o ausencia del inhibidor de la bomba de protones lisosomal BAF (5nM). El inhibidor de la bomba de protones lisosomal se incubo por 90 minutos antes del frenado del tratamiento que queríamos evaluar como posible inductor de autofagia

Para inhibir la inducción de autofagia en fases tempranas utilizamos el inhibidor 3-Metiladenina (3-MA) (1mM).

EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

Para detectar las células apoptóticas, adheridas y en suspensión luego de los distintos tratamientos, se realizó un ensayo de Anexina-V-Alexa 488 y posterior cuantificación por citometría de flujo. Las células LM38-LP fueron tratadas durante 96 hs con ATRA (0,5µM) y/o Gö6976 (0,5 µM). Luego, las mismas fueron levantadas y centrifugadas por 5 minutos a 300G. El pellet celular fue re suspendido en “Anexina-binding buffer” (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, y 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) a una concentración de 1x10⁶ células/ml, obteniendo 100 µl por ensayo. A cada 100 µl de suspensión celular se le agregó 5 µl de Anexina-V conjugada a Alexa-Fluor 488 y 2 µl yoduro de propidio en concentración 100 µg/ml. Las células fueron incubadas durante 15 minutos a T.A. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 400 µl de “Anexina-binding buffer”, se mantuvieron en hielo. Las muestras fueron analizadas con un citómetro BD FACS CANTO y analizadas con los programas Diva y Flowjo (Becton Dickinson y Ashland).

TRANSFECCIONES CON ARN CORTO DE INTERFERENCIA (siRNA)

El siRNA dirigido contra PKC δ (AACCACGAGTTTATCGCCACC) fue sintetizado por Invitrogen. Como siRNA control, se utilizó uno que no corresponde a ninguna secuencia conocida de genes de mamíferos (Scramble), también adquirido en Invitrogen. Las células fueron transfectadas durante 48 h con el siRNA (50nM), utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

ENSAYO DE MIGRACIÓN

Se evaluó la capacidad migratoria de las células LM38-LP tratadas o no con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α , mediante el ensayo de “Cicatrización de Herida” o “*Wound Healing*”. Para ello las células LM38-LP fueron pre tratadas por 48 hs siguiendo este protocolo: las primeras 24 hs fueron pre-tratadas con ATRA (0.5 μ M) y/o vehículo y las ultimas 24 hs fueron pre tratadas con ATRA, Gö6976 (0.5 μ M), la combinación de ambos o vehículo como control. Luego se practicaron heridas de aproximadamente 400 μ m de ancho a monocapas subconfluentes de células LM38-LP. En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 2% de SFB. A tiempo cero de incubación, se procedió a tomar registros fotográficos de diferentes áreas de las heridas. Se repitió el registro fotográfico de las mismas áreas a las 12 horas. La capacidad migratoria se cuantificó utilizando el programa Image Pro Plus, calculando el porcentaje del área ocupada respecto de la herida original.

PREPARACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

La actividad de metaloproteasas (MMPs) fue evaluada en los medios condicionados (MC) de células pre-tratadas o no con ATRA/inhibidor PKC α siguiendo el mismo protocolo utilizado en el ensayo de migración. Luego las células pre-tratadas se incubaron en medio DMEM-F12 libre de SFB por otras 24 hs. Finalmente los MC se recogieron y guardaron a -20° C. Las monocapas remanentes se lisaron utilizando 1% Tritón x-100 en PBS y el contenido proteico se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

ZIMOGRAFÍAS

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

ANIMALES

Para los estudios *in vivo*, se utilizaron ratones hembras endocriados BALB/c de 2-4 meses de edad, obtenidos del Bioterio del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. Los animales son mantenidos de acuerdo con la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del NIH. La comida y bebida fue administrada ad libitum. Estos protocolos cuentan con la aprobación del CICUAL institucional.

CRECIMIENTO TUMORAL Y CAPACIDAD METASTÁSICA ESPONTÁNEA

Ratones BALB/c fueron inoculados en forma ortotópica con 2×10^5 células de la línea LM38-LP. Se midieron los tamaños tumorales dos veces por semana usando un calibre. Los tratamientos utilizados fueron 10 mg de ATRA en forma de pellet durante 21 días y/o 200µl de Gö6976 (0,015µM) peritumoral, 1 vez por semana hasta concluir el experimento (tres semanas desde el comienzo del tratamiento). Se calculó el volumen tumoral como: $[(\text{diámetro menor})^2 \times \text{diámetro mayor}]/2$, para establecer la tasa de crecimiento. Una vez finalizado el tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Los tumores extraídos fueron utilizados en estudios histopatológicos para evaluar la morfología, diferenciación e invasión local. Para estudiar la presencia de metástasis espontáneas, se removieron los pulmones y se cuantificó el número y tamaño de las metástasis bajo lupa.

CAPACIDAD METASTÁSICA EXPERIMENTAL

Ratones BALB/c recibieron en forma endovenosa, por la vena de la cola, 2×10^5 células derivadas de mamoesferas pre-tratadas durante 96 hs con Rottlerin (1 μ M) o vehículo como control. Luego de 21 días los animales fueron sacrificados y se cuantificó bajo lupa el número y tamaño de las metástasis experimentales en pulmón.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos al menos tres veces. La significancia estadística entre grupos fue calculada utilizando los test t-Student, ANOVA o Chi cuadrado, según se indica. El U-test no paramétrico de Mann Whitney fue utilizado para analizar las diferencias en la capacidad metastásica. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

ESTUDIOS IN SILICO

Se utilizó una base de datos de Kaplan - Meier que contiene información de supervivencia de pacientes con cáncer de mama y datos de expresión génica obtenidos mediante el uso de microarrays de Affymetrix [87]. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) se calculó de acuerdo con el método de Kaplan-Meier, y fue evaluada por la prueba de log -rank. Las sondas utilizadas fueron: 213093_at para PKC α ; 205080_at para RAR β y 204189_at para RAR γ . El valor de corte fue establecido y optimizado automáticamente por el programa, siendo este el mejor valor de corte, en base a un valor arbitrario de expresión, determinados utilizando microarrays. El análisis fue univariado.

SOLUCIONES UTILIZADAS

PBS: NaH₂PO₄ 0,461 g, Na₂HPO₄ 0,946 g y NaCl 8,27 g, pH 7,2. Solución de Tripsina: 0,25% de tripsina y 0,02% de EDTA en PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺.

Solución de siembra: 100 mM Tris pH 6,8, 10% glicerol v/v, 50 mg/ml SDS, 0.5 mg/ml de azul de bromofenol y 5% de β -mercaptoetanol, pH 6,8.

Buffer de corrida: Tris 15 g/l, glicina 72 g/l, SDS 5 g/l.

Buffer de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), pH 8,2.

Solución de bloqueo: 5% leche descremada en 0.1% Tween-20 en PBS.

RESULTADOS

CAPITULO I: Identificación y caracterización del componente stem/progenitor de la línea LM38-LP.

Aislamiento y caracterización del componente stem/progenitor.

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que no es posible separar en forma estable el componente luminal del mioepitelial de la línea LM38-LP. Si bien se han podido obtener algunos clones mioepiteliales, el linaje luminal en apenas un par de pasajes recompone la línea mixta. Esta observación conjuntamente con la presencia de un 4% de células ALDH⁺ con capacidad clonogénica, insensibles a la terapia retinoidea y ubicadas en el límite entre ambas subpoblaciones[62], nos condujeron a aislar y caracterizar en la línea LM38-LP el componente stem/progenitor con la capacidad de dar ambas estirpes celulares.

Para poder aislar las células stem/progenitoras, utilizamos el método de cultivo en mamoesferas, en el cual sólo estas células tienen la capacidad de crecer. El ensayo se basa en la premisa de que solo una célula no diferenciada con características stem puede sobrevivir en cultivo en suspensión y sin suero, ya que las demás células, con un grado mayor de diferenciación, mueren por anoikis[88]. Para llevar adelante esta etapa hemos cultivado células LM38-LP en suspensión de manera monocelular en muy baja densidad en el medio de cultivo especialmente enriquecido para el desarrollo y enriquecimiento en células stem/progenitoras mamarias, como es la presencia del suplemento “B27” y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Luego de 10 días de cultivo, hemos observado numerosas estructuras celulares denominadas mamoesferas (Fig.I.1.A).

Hemos estudiado a través de RT-PCR, el panel de expresión de genes pluripotenciales, como Nanog, Sox2 y la expresión de genes que son determinantes para que las células stem mamarias mantengan su jerarquía, como Slug y Sox9, observándose mayor expresión de cada uno de ellos en las células provenientes de mamoesferas, respecto de la línea en monocapa.(Fig.I.1.B).

Por otro lado, las células provenientes de mamoesferas LM38-LP, fueron capaces de reconstituir la línea mixta en 10 días de cultivo en monocapa (Fig.I.1.C).

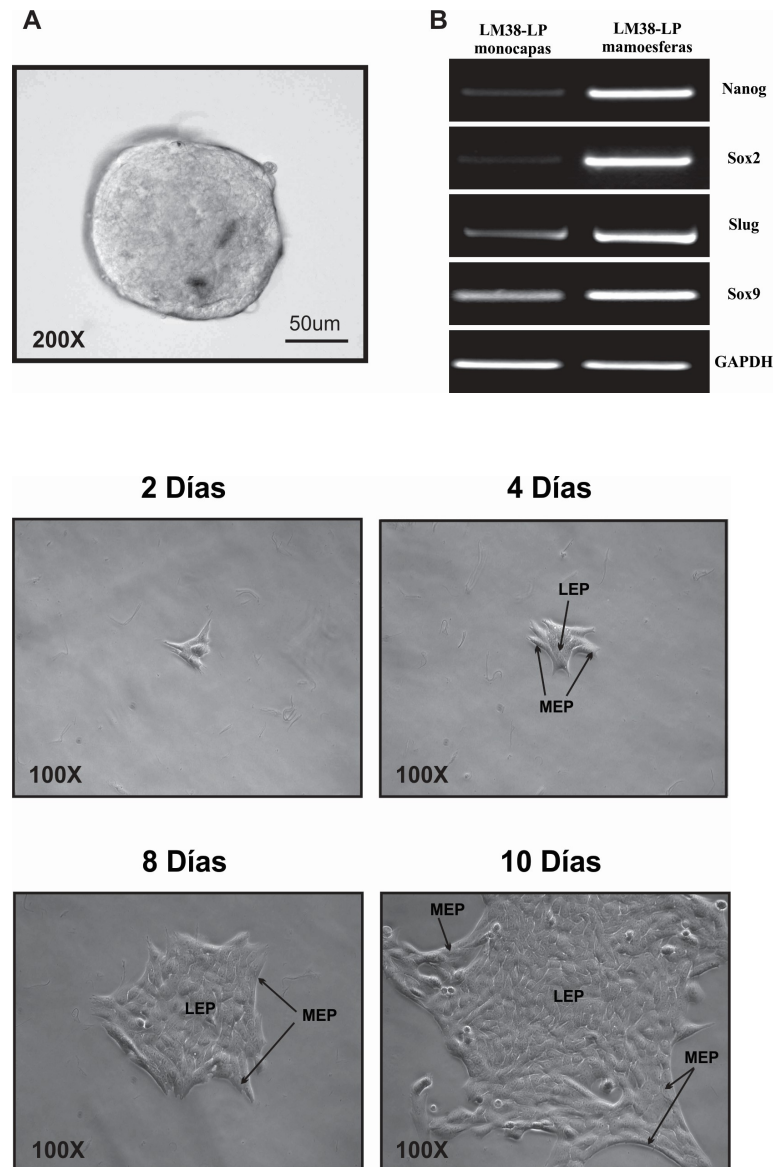


Figura I.1.: Aislamiento y Caracterización in vitro de las células stem/progenitoras de la línea LM38-LP. Panel A: Foto representativa de mamoesferas originadas a partir de la línea LM38-LP. Panel B: RT-PCR para genes pluripotenciales: Nanog, Sox2, Slug y Sox9. Figura representativa de tres experimentos independientes. Panel C: Las imágenes muestran como una única célula proveniente de mamoesferas tiene la capacidad de regenerar la línea mixta *in vitro*. Figura representativa de tres experimentos independientes.

CAPITULO II: Estudio del comportamiento de cada componente celular de LM38-LP bajo la modulación del sistema retinoide y de distintas isoformas de PKC.

Perfil de expresión de PKCs y su modulación por ATRA

Se evaluó la expresión de las isoformas α y δ de PKC tanto en la línea LM38-LP como en los componentes LEP, MEP y stem. Observamos que la línea LM38-LP expresa tanto PKC α como PKC δ . El tratamiento con ATRA produce un aumento de los niveles de la isoforma δ de PKC y una disminución de la isoforma α de PKC luego de 24 hs de tratamiento (Fig. II.1.A).

Para estudiar qué sucedía en los componentes LEP y MEP por separado, procedimos a separar ambos componentes luego del tratamiento con ATRA por 48 hs a través de un ensayo de inmunopartículas aprovechando la expresión diferencial de cadherina-e en las células LEP. En cambio, para estudiar lo que sucedía en el componente stem, realizamos un ensayo de mamoesferas para enriquecer en células stem/progenitoras luego tratarlas con ATRA por 48 hs.

Al analizar los componentes LEP y MEP, hemos observado que el aumento de PKC δ se observa solamente en el componente LEP, mientras que la disminución de PKC α por el tratamiento con ATRA se observó en ambos componentes de la línea. (Fig. II.1.B).

Asimismo, las células stem/progenitoras expresan ambas isoformas de PKCs, pero el tratamiento retinoide solo es capaz de modular negativamente la isoforma α .

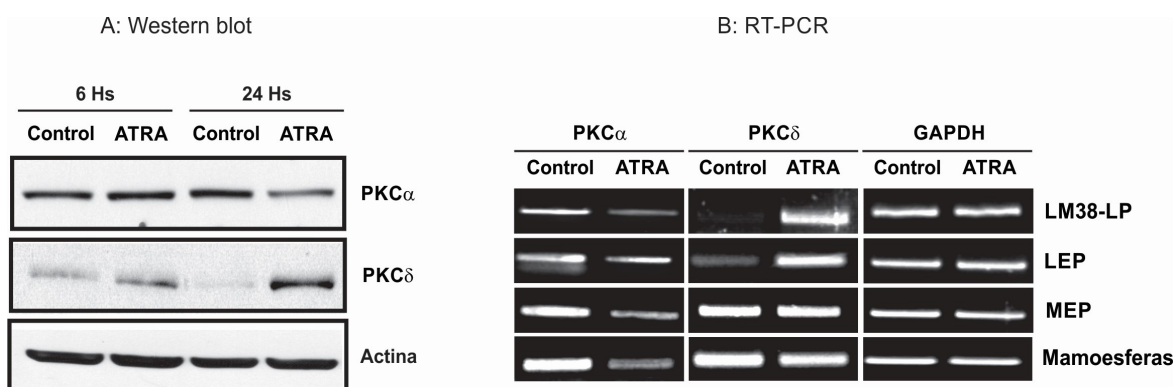


Figura. II.1. Expresión y modulación de PKCs por ATRA. Panel A: Western Blot para la detección de las isoformas α y δ de PKC en presencia y ausencia del tratamiento con ATRA en la línea LM38-LP. Panel B: RT-PCR para la detección de las isoformas α y δ de PKC en presencia y ausencia del tratamiento con ATRA en las subpoblaciones LEP, MEP y stem de la línea LM38-LP. Figura representativa de tres experimentos independientes.

Rol de PKC α y PKC δ sobre la proliferación celular de la línea LM38-LP, en presencia del tratamiento con ATRA.

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que el tratamiento con ATRA inhibe la proliferación de la línea LM38-LP. Por lo tanto este objetivo consistió en evaluar si la modulación de la actividad tanto de PKC α y/o PKC δ podía sensibilizar la respuesta de disminución de la proliferación ejercida por el tratamiento retinoide.

Para ello, las células LM38-LP fueron tratadas por 96 hs con Gö6976 (1 μ M) o Rottlerin (1 μ M) en manera conjunta con el tratamiento retinoide (1 μ M) o vehículo como control.

La inhibición farmacológica tanto de la isoforma δ como α produjo una disminución de la proliferación en LM38-LP, luego de 96 hs de tratamiento. Sin embargo solamente la inhibición de la isoforma α de PKC sensibilizó a las células al tratamiento retinoide, evidenciándose un efecto aditivo (Fig. II.2.).

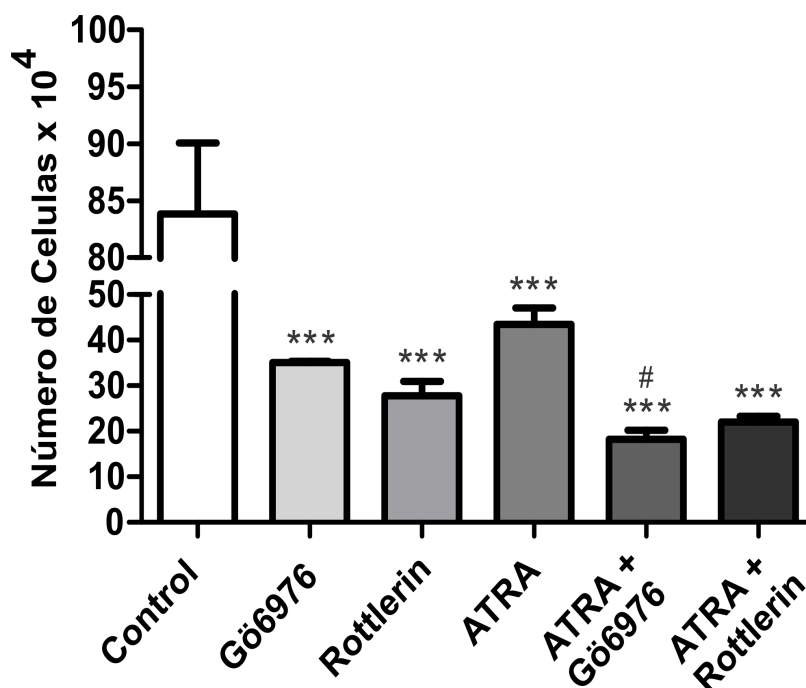


Figura II.2. Proliferación celular de las línea LM38-LP frente al tratamiento con ATRA y/o inhibidores farmacológicos de PKCs. El grafico representa número de células luego de 96 hs de tratamiento. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3, ***p<0,001 vs control, #p<0,05 vs Gö6976, ANOVA.

Rol de PKC α y PKC δ sobre la proliferación del componente stem progenitor de la línea LM38-LP, en presencia del tratamiento con ATRA.

El siguiente paso consistió en evaluar si la inhibición farmacológica tanto de PKC α y/o PKC δ sobre el componente stem de la línea LM38-LP, modificaba los efectos inducidos por el tratamiento retinoide sobre la proliferación de esta subpoblacion.

Para ello mamoesferas generadas a partir de la línea LM38-LP fueron tratadas con Gö6976 (1 μ M) o Rottlerin (1 μ M) en manera conjunta con el tratamiento retinoide (1 μ M) o vehículo como control. Luego de 96 hs de tratamiento se midieron los diámetros de las mamoesferas, como parámetro de proliferación.

Observamos que el tratamiento retinoide disminuye la proliferación del componente stem/progenitor y que este efecto es potenciado solamente cuando se inhibe farmacológicamente PKC α (Fig. II.3.).

Sorpresivamente el bloqueo farmacológico de PKC δ indujo un aumento del diámetro de las mamoesferas y esta respuesta biológica fue capaz de revertir el efecto del tratamiento con ATRA (Fig. II.3.).

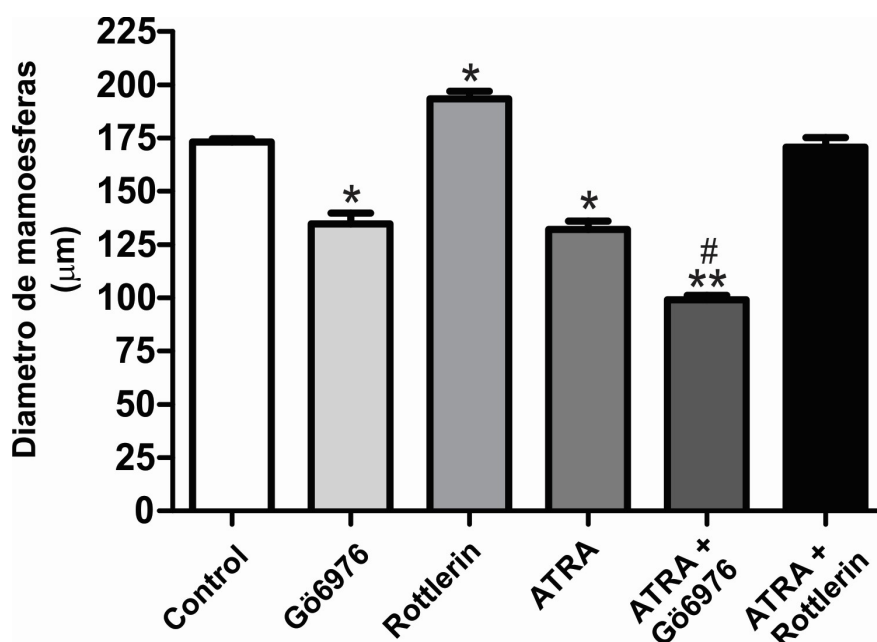


Figura II.3. Efecto del tratamiento de ATRA y/o inhibidor farmacológico de PKCs sobre la proliferación del componente stem. El grafico muestra el diámetro de las mamoesferas luego del tratamiento con ATRA y/o inhibidor farmacológico de PKC α / δ por 96 hs. *p<0,05 vs control, **p<0,01 vs control, #p<0,05 vs Gö6976, ANOVA.

En síntesis, el tratamiento retinoide es capaz de modular negativamente la expresión de PKC α en todos los componentes celulares de la línea LM38-LP y producir sobre todos ellos un efecto aditivo sobre la inhibición de la proliferación, cuando la actividad de esta isoforma de PKC es bloqueada.

Sin embargo el mismo tratamiento retinoide fue capaz de aumentar la expresión de PKC δ sólo en el componente LEP de LM38-LP. En la subpoblación stem PKC δ tiene un efecto per se sobre ese componente y es contrapuesto al ejercido por el ATRA.

Estos resultados en su conjunto nos llevaron a explorar más profundamente cuales eran los mecanismos implicados en la diferente respuesta biológica a la inhibición farmacológica de la PKC δ que mostraron la línea LM38-LP en monocapa por un lado, y el componente stem progenitor por el otro.

CAPITULO III: Estudio de los mecanismos implicados en la respuesta biológica diferencial de la línea LM38-LP y su componente stem/progenitor por la inhibición de PKC δ .

De los resultados detallados en el capítulo anterior, hemos podido vislumbrar que PKC δ tendría un rol dual. Hemos demostrado que cuando se inhibe farmacológicamente su actividad, a pesar de conseguir la inhibición de la proliferación de la línea LM38-LP, se induce un aumento de la proliferación del componente stem/progenitor de esta línea. Por lo tanto, nos preguntamos cuales serán los mecanismos implicados en el comportamiento diferencial de PKC δ .

Análisis de la monocapa celular de LM38-LP por microscopia

Hemos observado las monocapas de LM38-LP al microscopio invertido de contraste de fase para estudiar si las células presentaban signos de muerte celular cuando se inhibió la actividad de PKC δ .

En la Figura III.1 observamos que el tratamiento con Rottlerin inducía la aparición de numerosas vacuolas citoplasmáticas.

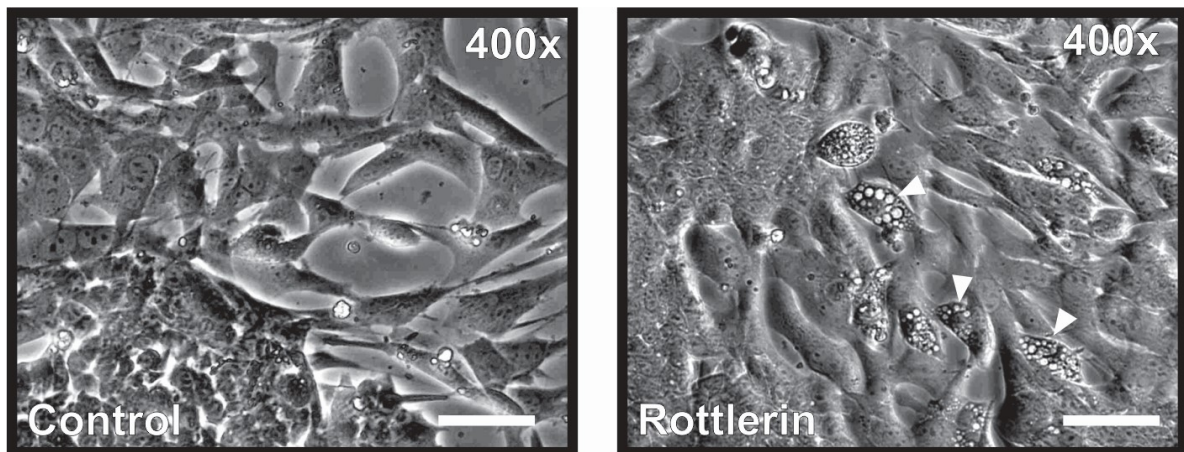


Figura III.1. Imágenes de microscopia representativas de la línea LM38-LP frente al tratamiento con Rottlerin Las imágenes muestran numerosas vesículas señaladas con las flechas luego de 96 hs de tratamiento con Rottlerin. (Barra = 20 μ m) La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3.

Análisis de la distribución del ciclo celular

Con el objetivo de evaluar si la inhibición de PKC δ modulaba alguna de las fases del ciclo celular, células LM38-LP fueron tratadas con Rottlerin por 96 hs y luego teñidas con IP para su posterior análisis en un citómetro de flujo. Observamos que el tratamiento con Rottlerin indujo acumulación de células en la fase G1 (Fig. III.2.), lo que correlaciona con un arresto del ciclo celular en dicha fase.

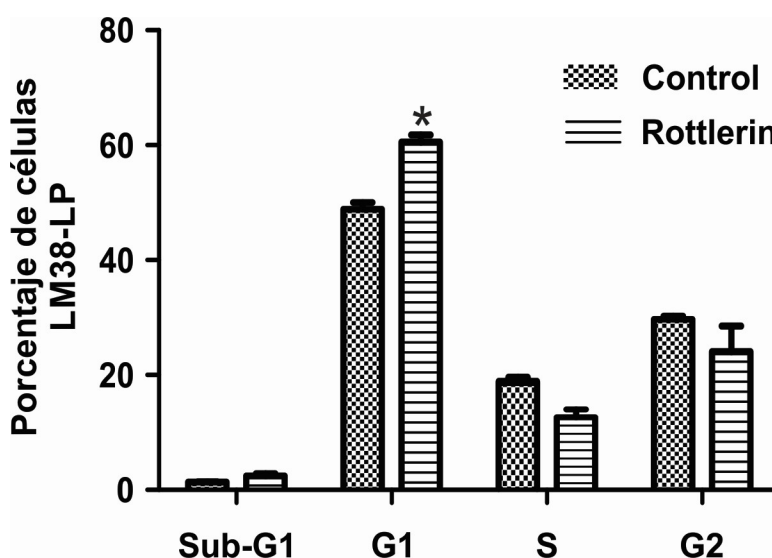


Figura .III.2. Distribución del ciclo celular de la línea LM38-LP luego del tratamiento con Rottlerin. El histograma representa la acumulación de células en las distintas fases del ciclo celular luego de 96 hs de tratamiento. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3, *p<0,05 vs control.

Dado que no observamos una acumulación de células en la fase subG1 del ciclo, sumado a que no evidenciamos signos de muerte celular por microscopia (Fig. III.1.), descartamos que la muerte por apoptosis fuera uno de los mecanismos de la inhibición de la proliferación. Sin embargo y a partir de las numerosas vacuolas observadas por microscopía en la línea LM38-LP tratada con Rottlerin, decidimos estudiar si la inhibición de PKC δ estaría induciendo autofagia.

Estudio de la inducción de autofagia en las células LM38-LP

Para evaluar si la inhibición de PKC δ estaría induciendo autofagia, lo primero que realizamos fue una inmunofluorescencia para detectar la proteína LC3, marcador de autofagosomas.

Observamos bajo microscopía de epifluorescencia, que el tratamiento por 48 hs con Rottlerin fue capaz de aumentar la expresión de LC3 citoplasmática en la línea LM38-LP (Fig. III.3.), lo que confirmaría la presencia de autofagosomas.

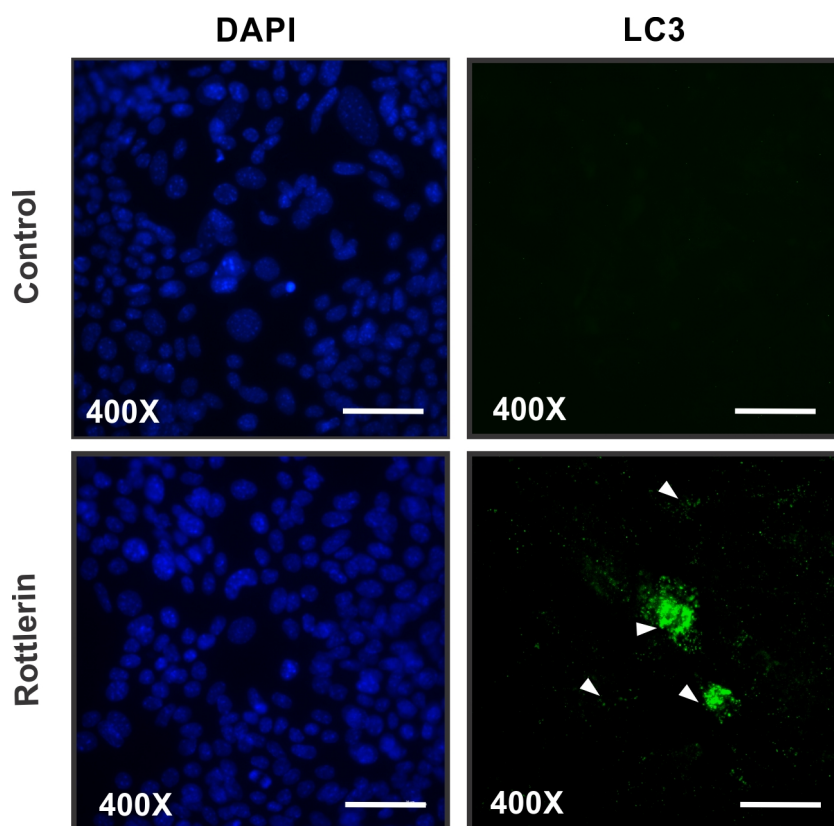


Figura .III.3. Detección de LC3 por inmunofluorescencia en la línea LM38-LP frente al tratamiento con Rottlerin. Las imágenes muestran la acumulación de LC3 en las células que fueron tratadas con Rottlerin por 48 hs (Barra = 50 μ m). Las flechas muestran la marca positiva de LC3. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

Para confirmar que el bloqueo de la actividad de PKC δ induce autofagia, evaluamos si existe la inducción del flujo autofagico. Para el estudio del mismo, utilizamos un inhibidor de la bomba de protones de los lisosomas. El ensayo se basa en la premisa de que al formarse el autolisosoma, dado por la fusión de un autofagosoma con un lisosoma, la proteína LC3-II se degrada por las enzimas

lisosomales que funcionan a pH ácido. Por lo tanto utilizando un inhibidor de la bomba de protones de los lisosomas (BAF-1), podemos evidenciar si primero se acumula el LC3-II y si esta acumulación es mayor en presencia del inductor de autofagia que estamos estudiando, validando en este último caso la existencia de un flujo autofágico.

Por lo tanto, las células LM38-LP fueron tratadas con Rottlerin en presencia o ausencia de BAF-1. Observamos que la inhibición farmacológica de PKC δ indujo una acumulación de LC3-II respecto de las células tratadas solo con Rottlerin o con BAF-1, lo que validaría la inducción del flujo autofágico (Fig.III.4)

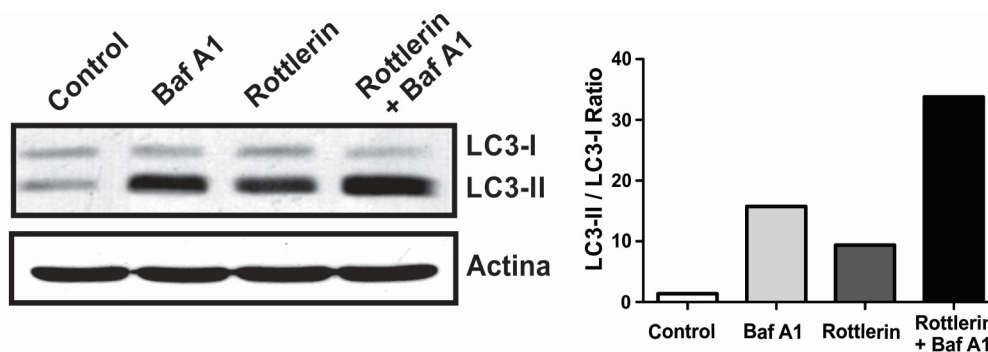


Figura. III.4. Detección de LC3 por Western Blot en la línea LM38-LP frente a los tratamientos con Rottlerin y/o BAF-1. Western Blot para la detección de LC3-II en presencia de BAF-1 y/o Rottlerin por 48 hs. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3.

Implicancia de la inducción de autofagia por la inhibición de PKC δ , sobre la inhibición de la proliferación celular.

A continuación evaluamos si el bloqueo de la autofagia podía alterar el efecto sobre la proliferación celular inducido por la inhibición farmacológica de PKC δ . Para ello utilizamos un compuesto llamado 3-metiladenina (3-MA), que bloquea la formación de autofagosomas a través de la inhibición de la vía fosfatidilinositol quinasas tipo III (PI3K) [89]. Como se observa en la Fig. III.5., el bloqueo de la actividad de PKC δ cuando la formación de autofagosomas se encuentra inhibida, indujo una disminución de la proliferación celular de manera aditiva.

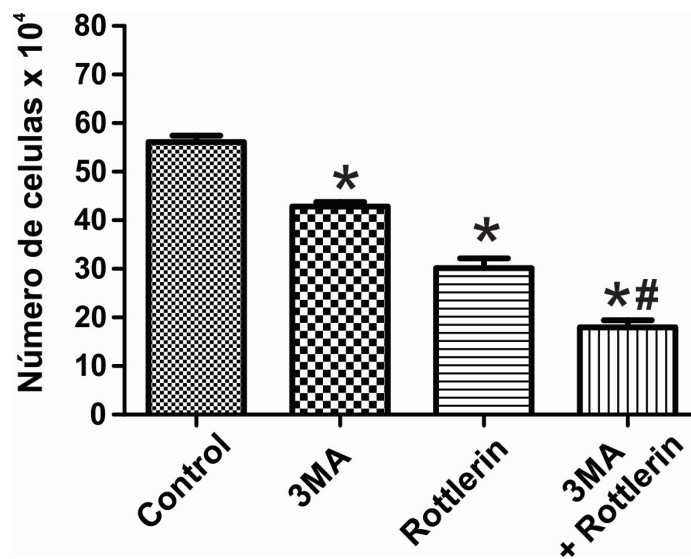


Figura .III.5. Proliferación celular de las líneas LM38-LP frente al tratamiento con 3MA y/o el inhibidor farmacológico de PKC δ . El grafico representa número de células luego de 96 hs de tratamientos. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3, *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs 3MA, ANOVA.

Implicancia de PKC δ sobre la proliferación y mantenimiento del componente stem.

En el capítulo anterior describimos que la inhibición de PKC δ aumentaba la proliferación de las células stem de la línea LM38-LP y que este efecto biológico era atenuado por la activación del sistema retinoide. Sin embargo, dado que el ATRA no es capaz de modular PKC δ en el componente stem/progenitor, nos preguntamos cuál es el rol que tiene esta isoforma en esta subpoblacion celular y que es independiente del sistema retinoide.

En este punto evaluamos como la inhibición de PKC δ modula al componente stem/progenitor.

En el capítulo II observamos que el tratamiento con Rottlerin por 96 hs indujo un aumento del diámetro de las mamoesferas (Fig.II.3.). Para continuar evaluando como el bloqueo de la actividad de PKC δ modula al componente stem/progenitor, las mamoesferas fueron tratadas por 96 hs con Rottlerin. Luego, las células

derivadas de las mamoesferas pre-tratadas fueron cultivadas nuevamente en suspensión para estudiar la capacidad de dar origen a una nueva generación de mamoesferas, como una medida de auto-renovación. Observamos que el tratamiento con Rottlerin indujo un aumento del número de mamoesferas secundarias (Fig.III.6.A). Por otro lado, quisimos verificar si la inhibición de la actividad de PKC δ provoca que se enriquezca el cultivo celular en células stem. Para ello tratamos a la línea LM38-LP con Rottlerin solo por 48 hs, y medimos la capacidad de formar mamoesferas primarias. Observamos que el tratamiento con Rottlerin aumento significativamente la capacidad de formar mamoesferas de la línea LM38-LP (Fig.III.6.B). Para corroborar que este efecto es mediado por PKC δ , utilizamos un siRNA contra esa isoforma (Fig.III.6.C). Pudimos observar los mismos efectos que con el inhibidor farmacológico: tanto en el aumento en el diámetro de las mamoesferas primarias, como en el aumento del número de mamoesferas primarias (Fig.III.6.D y 6.E.).

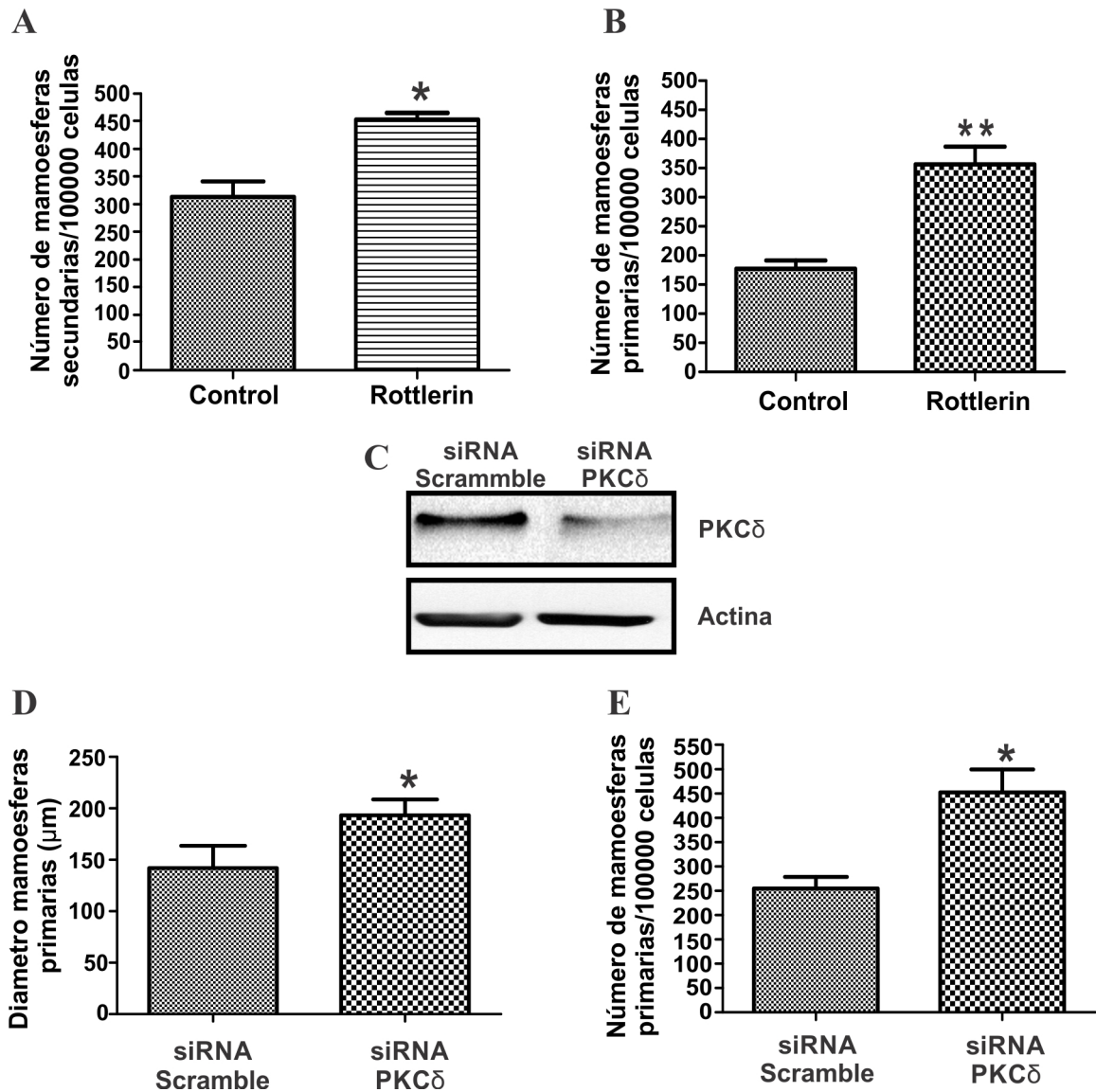


Figura .III.6. Efecto de la inhibición de PKCδ sobre el componente stem. Panel A: El grafico muestra el numero de mamoesferas secundarias luego del tratamiento con Rottlerin por 96 hs. Panel B: El histograma muestra el numero de mamoesferas primarias luego de la inhibición farmacológica de PKCδ. Panel C: Western Blot para la detección de la isoforma δ de PKC en células LM38-LP que fueron transfectadas con un siRNA contra PKCδ o un siRNA Scramble. Panel D: La figura muestra el diámetro de las mamoesferas primarias luego del bloqueo de la expresión de PKCδ. Panel E: El grafico muestra el número de mamoesferas primarias luego de la inhibición de PKCδ. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3. *p<0,05 vs control, **p<0,01 vs control, ANOVA.

Rol de PKC δ sobre la diferenciación del componente stem.

Para determinar si la actividad de PKC δ está involucrada en la diferenciación de células derivadas de las mamoesferas, realizamos cultivos 3D en matriz natural reconstituida (Matrigel) bajo el tratamiento con Rottlerin o vehículo como control. Por microscopía de contraste de fase observamos que las células derivadas de las mamoesferas pretratadas con Rottlerin dieron origen a colonias 3D con una morfología en racimo ("grape-like") (Fig. III.7.), generalmente asociada con un fenotipo maligno, mientras que las colonias 3D controles, presentaron una morfología en "masa", acorde a un fenotipo mas diferenciado. (Fig. III.7.).

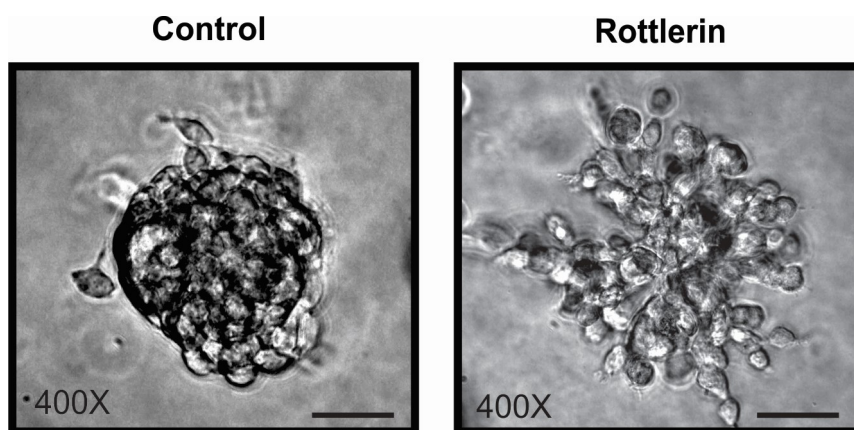


Figura III.7. Efecto de la inhibición de PKC δ sobre la diferenciación del componente stem.

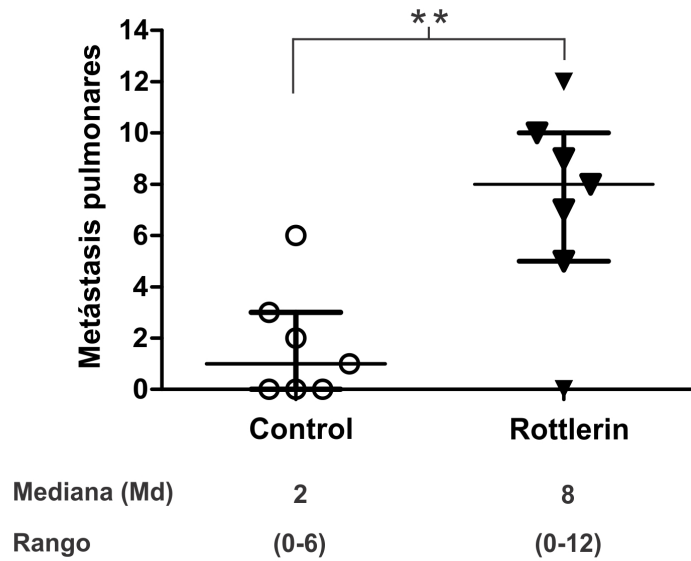
Las imágenes muestran la morfología desarrollada en cultivo en Matrigel de las células derivadas de las mamoesferas pretratadas o no con el inhibidor de PKC δ . (Barra=100 μ m). Figura representativa.

Análisis del potencial metastásico de las células stem por el bloqueo de la actividad de PKC δ .

Para validar que el componente stem adquirió un fenotipo más maligno, decidimos realizar un ensayo de metástasis experimentales, donde evaluamos la capacidad de las células stem/progenitoras de colonizar el órgano blanco, último paso de la cascada metastásica.

Para llevar a cabo dicho experimento, 2×10^5 células derivadas de mamoesferas pre-tratadas por 96 hs con Rottlerin o vehículo como control fueron inoculadas por la vena de la cola de ratones BALB/c. Luego de 21 días, los ratones fueron pesados y sacrificados para obtener los pulmones y contar las metástasis pulmonares. Observamos que los ratones que fueron inoculados con las células derivadas de mamoesferas pre-tratadas con Rottlerin tuvieron un número significativamente mayor de metástasis pulmonares (Fig.III.8.A). Además, estos ratones presentaron un peso significativamente menor que los ratones control (Fig.III.8.B), evidenciándose de esta manera signos de caquexia.

A



B

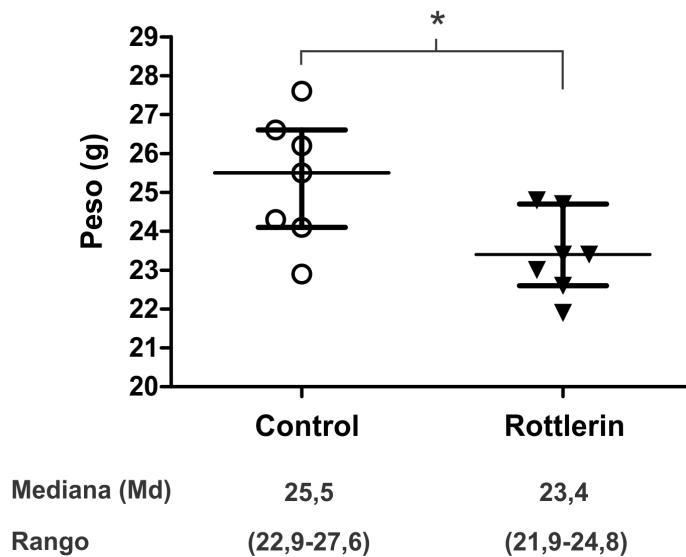


Figura III.8. Efecto del bloqueo de la actividad de PKC δ sobre la capacidad las células stem de originar metástasis experimentales y sus efectos paraneoplásicos.

Panel A: Se grafica el número de metástasis pulmonares por ratón originados por la inoculación de células derivadas de mamoesferas pre-tratadas. El grafico es representativo de tres experimentos independientes de n=7. *p<0,05 vs. Control, Mann Whitney. Panel B: Se grafica el peso por ratón luego de recibir la inoculación de células derivadas de mamoesferas pre-tratadas. El grafico es representativa de tres experimentos independientes de n=7. *p<0,05 vs. Control, Mann Whitney.

Perfil de genes pluripotenciales del componente stem por la modulación de la actividad de PKC δ .

A continuación determinamos si los cambios inducidos por la inhibición de PKC δ en la proliferación, autorrenovación y grado de diferenciación, también eran acompañados por un perfil de expresión diferencial de los genes pluripotenciales. En el capítulo I hemos demostrado que las células stem de la línea LM38-LP expresan altos niveles de varios genes pluripotentes y claves para mantener la jerarquía stem (Fig. I.1).

Para ello las mamoesferas fueron tratadas con Rottlerin por 48 hs y luego evaluamos los niveles de Nanog, Sox2, Slug y Sox9 por RT-PCR. Observamos que la inhibición farmacológica de la PKC δ aumentó claramente los niveles de expresión de Nanog y Slug pero no se observaron cambios en la expresión de Sox2 y Sox9 (Fig. III.9.).

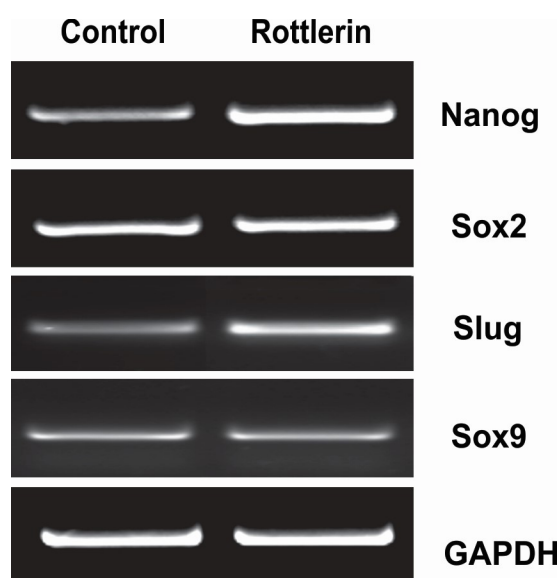


Figura III.9. Modulación de los niveles de genes pluripotenciales por la inhibición de PKC δ en el componente stem. RT-PCR para genes pluripotenciales: Nanog, Sox2, Slug y Sox9. Figura representativa de tres experimentos independientes.

Rol del mecanismo de autofagia en los efectos mediados por la inhibición de PKC δ en el componente stem.

Finalmente nos preguntamos, si tal como sucedía en las células LM38-LP, la autofagia también era un mecanismo presente en el componente stem y si podía ser modulado por la actividad de PKC δ . Por lo tanto con el objetivo de evaluar si la autofagia inducida por la inhibición de PKC δ se encuentra involucrada en el incremento de la subpoblación stem de la línea LM38-LP, realizamos un ensayo de WB para el marcador autofagico LC3. Curiosamente, las mamoesferas presentaron altos niveles basales de LC3-II, sin embargo el tratamiento con Rottlerin indujo un incremento en los niveles de esta molécula. (Fig. III.10.A y 10.B). Con el fin de validar si la autofagia está mediando el efecto del bloqueo de la actividad de PKC δ en la subpoblacion stem, tratamos a las células LM38-LP con Rottlerin y/o 3MA durante 96 h para llevar a cabo un ensayo de mamoesferas. Pudimos observar que el incremento en el diámetro y en el número de mamoesferas inducido por la inhibición farmacológica de PKC δ se revirtió en presencia del inhibidor de la formación de autofagosomas 3MA. Esto sugiere que la autofagia, inducida por bloqueo de la actividad de PKC δ , es clave en el mantenimiento del componente stem, induciendo la proliferación y auto-renovación del mismo. (Fig. III.10.C y 10.D.).

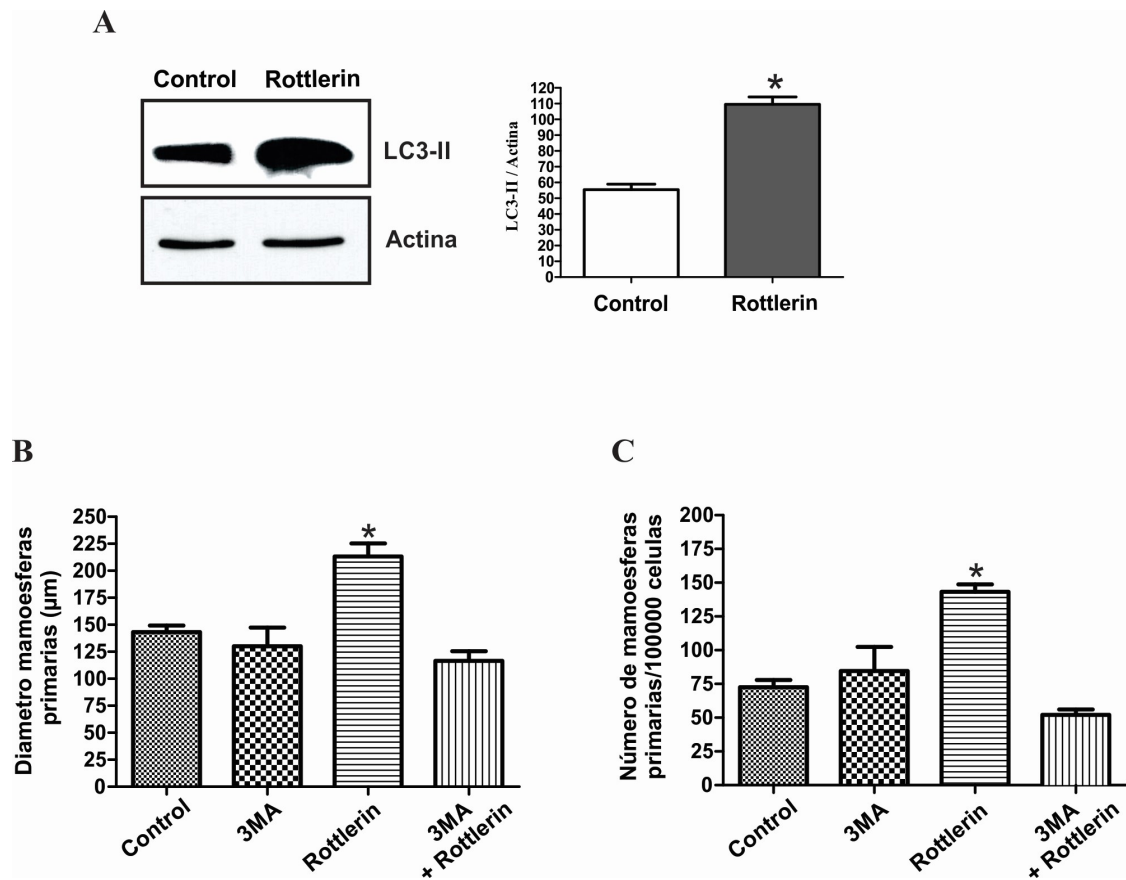


Figura III.10. Implicancia de la autofagia en los efectos mediados por la inhibición de PKC δ en las mamoesferas. Panel A: El WB muestran la acumulación de LC3-II en las mamoesferas tratadas o no Rottlerin por 48 hs. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3. Panel B: El gráfico muestra el diámetro de las mamoesferas luego del tratamiento con Rottlerin y/o 3MA por 96 hs. Panel C: El gráfico muestra el número de mamoesferas primarias luego del tratamiento con Rottlerin y/o 3MA por 96 hs. *p<0,05 vs control, ANOVA.

CAPITULO IV: Evaluación del tratamiento combinado de ATRA y el inhibidor farmacológico de PKC α sobre distintos parámetros involucrados en la progresión tumoral.

En el capítulo II, hemos demostrado que la activación del sistema retinoide por el tratamiento con ATRA, es capaz de disminuir los niveles de PKC α en todos los componentes celulares de la línea LM38-LP: células LEP, MEP y Stem. También observamos que la activación del sistema retinoide conjuntamente con la inhibición farmacológica de PKC α , conduce a la disminución de la proliferación tanto de la línea como de su componente stem/progenitor.

Nos preguntamos ahora, no sólo cuales son los mecanismos implicados en este interesante efecto biológico, sino además si se ven modificados otros parámetros implicados en la progresión tumoral o diseminación metastásica.

Análisis de la proliferación celular

La línea LM38-LP fue tratada con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α con un rango de dosis entre 0.25 μ M a 1 μ M de cada uno. Luego de 96 hs de tratamiento, se analizaron los efectos de cada droga por separado o sus combinaciones, sobre el número de células. Observamos que el tratamiento combinado produjo una mayor disminución de la proliferación respecto de cada tratamiento por separado (Fig.IV.1.).

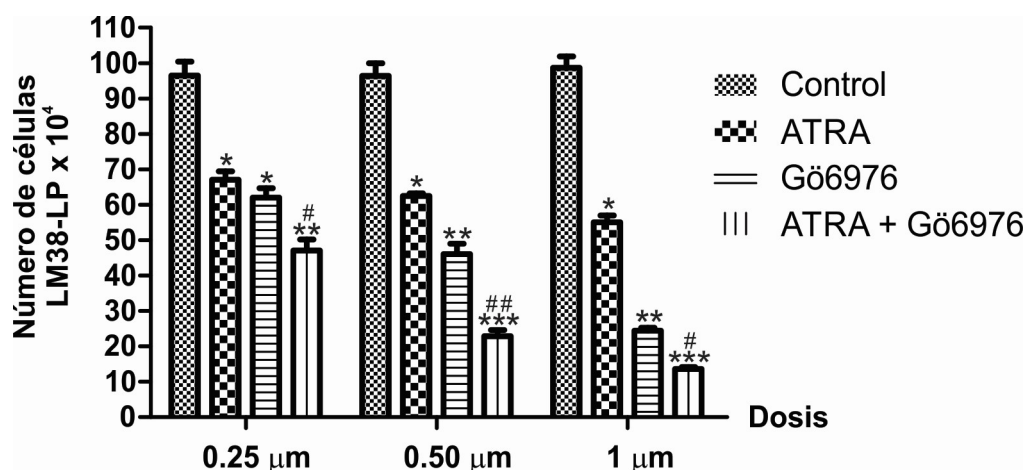


Figura IV.1. Proliferación celular de la línea LM38-LP. El histograma representa número de células luego de 96 hs de tratamientos. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3, *p<0,05 vs control, **p<0,01 vs control, ***p<0,001 vs control #p<0,05 vs Gö6976, ##p<0,01 vs Gö6976 ANOVA.

Estudio de Interacción de drogas

Dado que el tratamiento combinado tuvo un efecto inhibitorio mayor sobre la proliferación de la línea LM38-LP que cada tratamiento por separado, decidimos analizar a través del método de Chou-Talalay[86], si la interacción entre el inhibidor farmacológico de PKC α y el ATRA era aditiva o sinérgica. A partir de los datos obtenidos del ensayo de proliferación descrito más arriba se evidenció que cada agente mostró una inhibición dependiente de la dosis sobre la proliferación celular (Tabla 1). Además, todas las combinaciones de ATRA y el inhibidor farmacológico de PKC α examinados fueron sinérgicos con un índice de combinación de: **IC <7** (Tabla IV.1.).

LM38-LP	Fracción afectada a 96 hs			
Dosis	ATRA	Gö6976	ATRA + Gö6976	Indice de Combinación (IC)
0,25 μ M	0,34	0,32	0,52	0,62 $\pm$ 0,02
0,5 μ M	0,35	0,52	0,76	0,52 $\pm$ 0,08
1 μ M	0,44	0,78	0,86	0,66 $\pm$ 0,03

Tabla. IV.1. Análisis de interacción entre drogas por Chou-Talalay. La tabla muestra el efecto de cada droga por separado o su combinación sobre la proliferación en función del control. Se muestra el índice de combinación resultante del test de Chou-Talalay en función de los efectos obtenidos, n=3.

Análisis del ciclo celular

Hemos analizado la distribución del ciclo celular de las células LM38-LP luego del tratamiento por 96 h con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α . Observamos que en la línea LM38-LP, el tratamiento con ATRA indujo principalmente la acumulación de las células en la fase G₁ del ciclo, acompañado de un pequeño incremento de células en sub G₁ (Fig.IV.2). Por otra parte, el tratamiento con el inhibidor farmacológico de PKC α provocó la acumulación de las células principalmente en la fase Sub G₁. Nuevamente, el tratamiento combinado mostró un efecto sinérgico en la acumulación de las células en la fase sub G₁ (Fig. IV.2.).

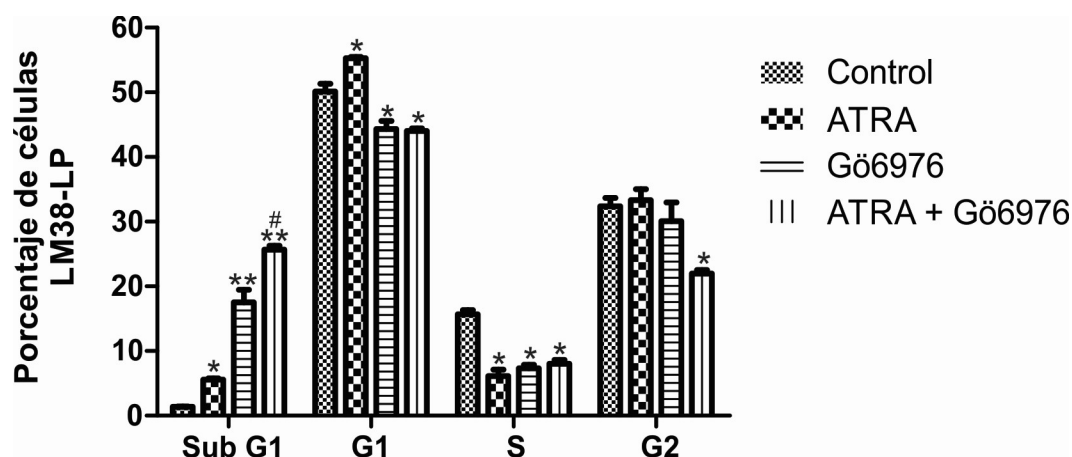


Figura IV.2. Evaluación del Ciclo celular. El histograma representa la acumulación de células en las distintas fases del ciclo celular luego de 96 hs de tratamiento con ATRA y/o Gö6976 por 96 hs. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3 *p<0,05 vs. Control, **p<0,01 vs Control, #p<0,01 vs Gö6976, ANOVA.

Análisis de la apoptosis

Dado que la acumulación de células en el estadio sub G1 del ciclo celular podría correlacionarse con la inducción de apoptosis, decidimos realizar un ensayo de Anexina V para corroborarlo. Observamos que cada tratamiento indujo una acumulación de células Anexina V positivas, lo que confirma la inducción de apoptosis. Nuevamente, pudimos corroborar el sinergismo del tratamiento combinado entre el ATRA y el inhibidor farmacológico de PKC α (Fig.IV.3.)

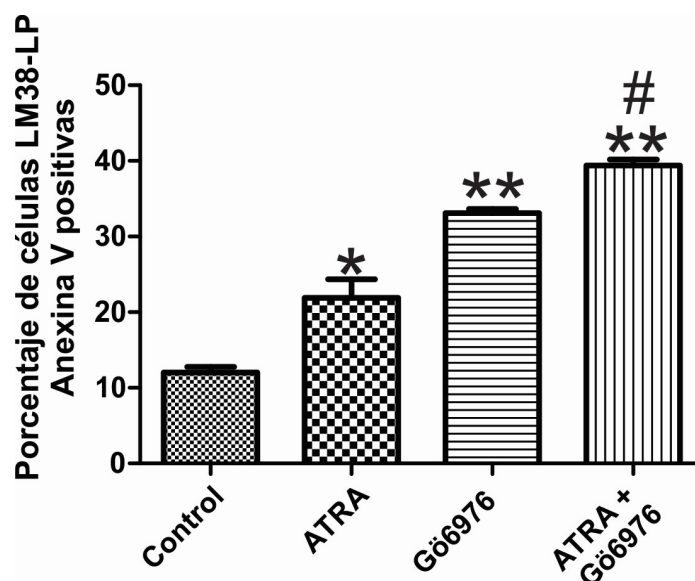


Figura IV.3. Evaluación de apoptosis. El grafico representa el porcentaje de células Annexina V positivas luego de 96 hs de los distintos tratamientos, evaluado por citometría de flujo. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3, *p<0,05 vs. Control, **p<0,01 vs Control, #p<0,05 vs Gö6976, ANOVA.

Análisis de la proporción de células luminales y mioepiteliales bajo distintos tratamientos

Para poder evaluar la sensibilidad de las células luminales y mioepiteliales a los distintos tratamientos, se realizó una marcación con el anticuerpo CD24, el cual discrimina entre estas dos estirpes celulares. La inhibición farmacológica de PKC α genera una disminución significativa de la proporción de células luminales respecto de las células mioepiteliales (Fig.IV.4.).

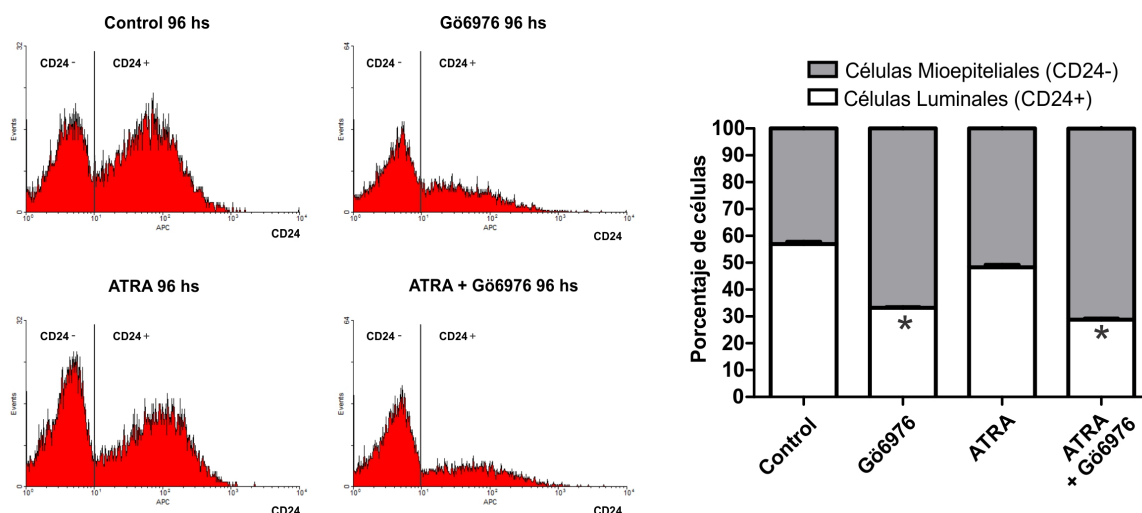


Figura IV.4. Evaluación de la sensibilidad de las células luminales y mioepiteliales a los distintos tratamientos. Panel A: Figura representativa de la marcación con el anticuerpo CD24 a través de citometría de flujo luego de 96 hs de tratamiento. Panel B: El gráfico representa el porcentaje de células luminales y mioepiteliales luego de 96 hs de los distintos tratamientos. Figura representativa de tres experimentos independientes. *p<0,05 vs. Control, ANOVA.

Análisis de la capacidad migratoria.

El efecto del tratamiento con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α sobre la migración fue estudiado a través de un “ensayo de cicatrización de herida” sobre células pre-tratadas. Observamos que tanto el tratamiento con ATRA como la inhibición de PKC α redujeron la migración de las células LM38-LP, evidenciándose nuevamente el efecto sinérgico de la combinación sobre el potencial migratorio de esta línea (Fig.IV.5.A.).

También pudimos observar, que la subpoblación MEP es la responsable de la capacidad migratoria de la línea LM38-LP, tal como puede evidenciarse en el frente de avance (Fig.IV.5.A.). Es importante destacar que la viabilidad celular no fue afectada con las dosis de ATRA o Gö6976 usadas para este experimento.

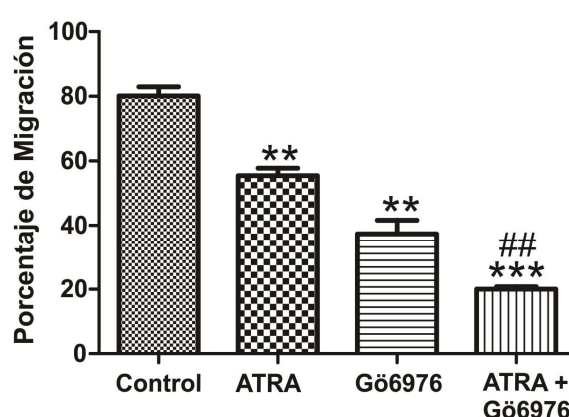
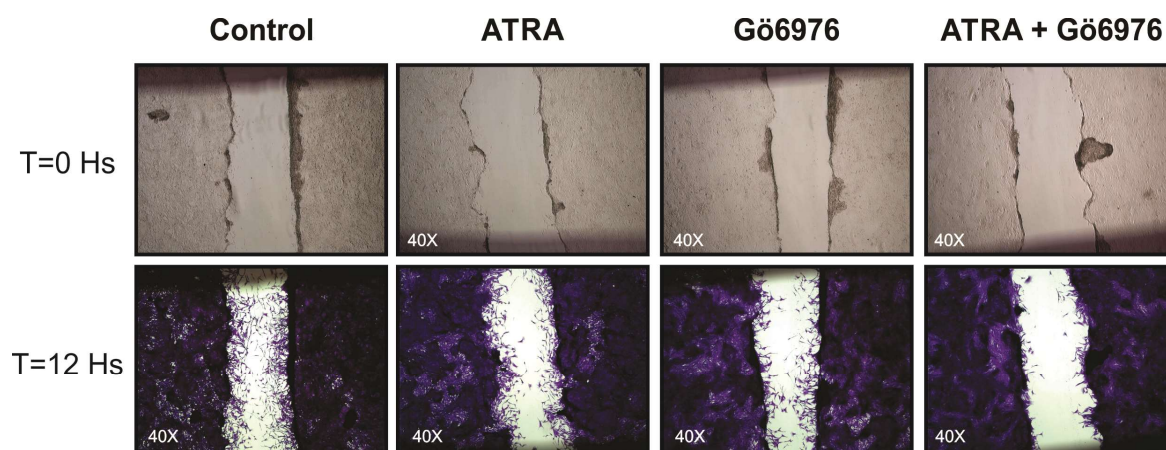


Figura IV.5. Potencial migratorio. El grafico representa el porcentaje de migración de las células LM38-LP luego de los distintos tratamientos. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3 **p<0,01 vs. Control, ***p<0,001 vs Control, ###p<0,01 vs Gö6976, ANOVA.

Análisis de la actividad de la metaloproteasa 2 (MMP-2) secretada.

Mediante zimografías directas de geles co-polimerizados con gelatina estudiamos la actividad de las metaloproteasas secretadas al MC. Tanto la inhibición farmacológica de PKC α como el tratamiento con ATRA disminuyeron la actividad de MMP-2, siendo indetectable bajo el tratamiento combinado (Fig. IV.6). Es importante destacar que la viabilidad celular no fue afectada con las dosis de ATRA o Gö6976 usadas para este experimento.

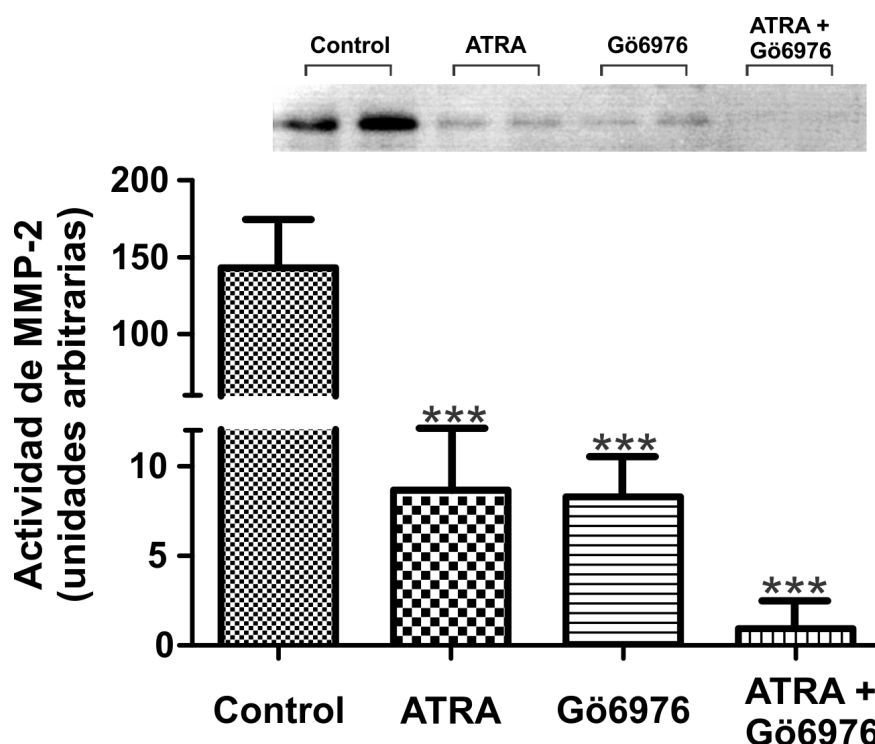


Figura IV.6. Actividad de MMPs activas. El histograma representa la actividad de MMP-2 secretada por las células LM38-LP luego de los distintos tratamientos. La figura es representativa de tres experimentos independientes de $n=2$ *** $p<0,001$ vs. Control, ANOVA.

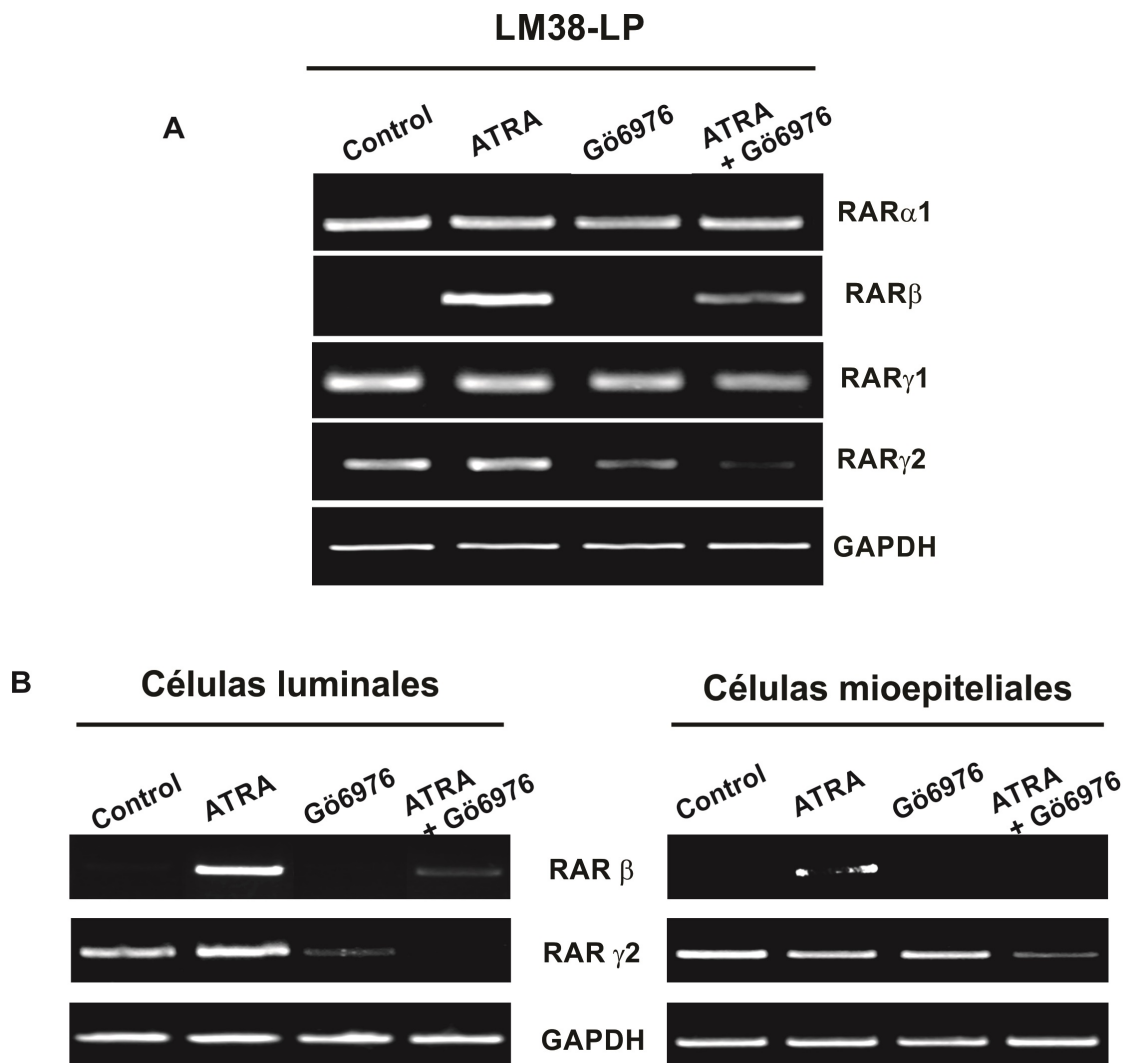
Análisis del perfil de expresión de los RARs bajo los distintos tratamientos

Hemos demostrado en el capítulo II que al activar el sistema retinoide por el tratamiento con ATRA, se produce una disminución en los niveles de PKC α y que este efecto es concomitante en todos los componentes celulares del modelo LM38-LP. Al igual que otros autores, nuestro grupo ha demostrado en trabajos anteriores la interacción entre el sistema retinoide y la vía de las PKC, en relación a la progresión tumoral mamaria[82]. Por lo tanto nos preguntamos ahora si se produce una modulación de los niveles de los receptores retinoicos bajo el tratamiento con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α , tanto sobre LM38-LP, como sobre sus componentes LEP y MEP.

Nuevamente para poder estudiar qué sucedía en los componentes LEP y MEP por separado, procedimos a separarlos por inmunopartículas luego de los tratamientos.

Observamos que el tratamiento con ATRA induce un marcado aumento de los niveles de RAR β tanto en la línea como en su componente LEP (Fig.IV.7.A. y 7.B.). Sin embargo, la combinación de Gö6976 con ATRA impide parcialmente la modulación positiva de este receptor (Fig.IV.7.A. y 7.B.). En cambio, las células MEP presentan muy pocos niveles de RAR β que posiblemente se deben a un artefacto de la técnica de separación, ya reportada en trabajos previos[90](Fig.IV.7.B.).

Por otro lado, el tratamiento con Gö6976, provocó una marcada disminución de los niveles de RAR γ 2 en la línea LM38-LP, pero solo en las células LEP (Fig.IV.7.A. y 7.B.). El tratamiento combinado de ATRA con Gö6976 potencia la disminución de los niveles del receptor RAR γ 2, en todos los componentes de la línea (Fig.IV.7.A. y 7.B.).



Figuras IV.7. Perfil de expresión y modulación de los receptores retinoides por los distintos tratamientos. Panel A: RT-PCR para receptores retinoides: RAR α 1, RAR β , RAR γ 1, RAR γ 2 en la línea LM38-LP. Panel B: RT-PCR para receptores retinoides: RAR α 1, RAR β , RAR γ 1, RAR γ 2 en las células luminales y mioepiteliales de la línea LM38-LP. Figura representativa de tres experimentos independientes.

CAPITULO V: Evaluación del efecto del tratamiento con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α sobre la proliferación, el mantenimiento y la diferenciación de las células stem/progenitoras tumorales mamarias.

En el capítulo II, hemos demostrado que tanto el tratamiento con ATRA como el bloqueo de la actividad de PKC α conducen a la disminución de la proliferación del componente stem/progenitor (Fig.II.3.). Además la combinación de ambos tratamientos potencia el efecto antiproliferativo sobre las células stem.

En este capítulo, nos focalizaremos en evaluar más en profundidad como ambos tratamientos y su combinación afectan la diferenciación, proliferación y auto-renovación del componente stem/progenitor y cuales serian los mecanismos implicados en dichos efectos biológicos.

Análisis de la capacidad de diferenciación de la células stem/progenitoras bajo los distintos tratamientos

Para analizar la capacidad de las células stem/progenitoras de diferenciarse, las células derivadas de las mamoesferas LM38-LP pre-tratadas fueron crecidas en cultivos 3D en Matrigel. Luego de 12 días de cultivo, observamos por microscopia de contraste de fase, que las colonias derivadas de las mamoesferas pre-tratadas con ATRA desarrollaron una morfología de “redonda”, con evidente presencia de lumen, mientras que las colonias derivadas de las mamoesferas control presentaron una morfología de “masa” (Fig.V.1.). Curiosamente, al inhibir PKC α la morfología desarrollada por las células stem fue “redonda” pero sin presencia de lumen y con un crecimiento significativamente menor que las control (Fig.V.1.). Las colonias obtenidas bajo el tratamiento combinado mostraron una morfología que combina el efecto de cada tratamiento por separado: pequeñas “redonda” y con lumen aparente (Fig.V.1.).

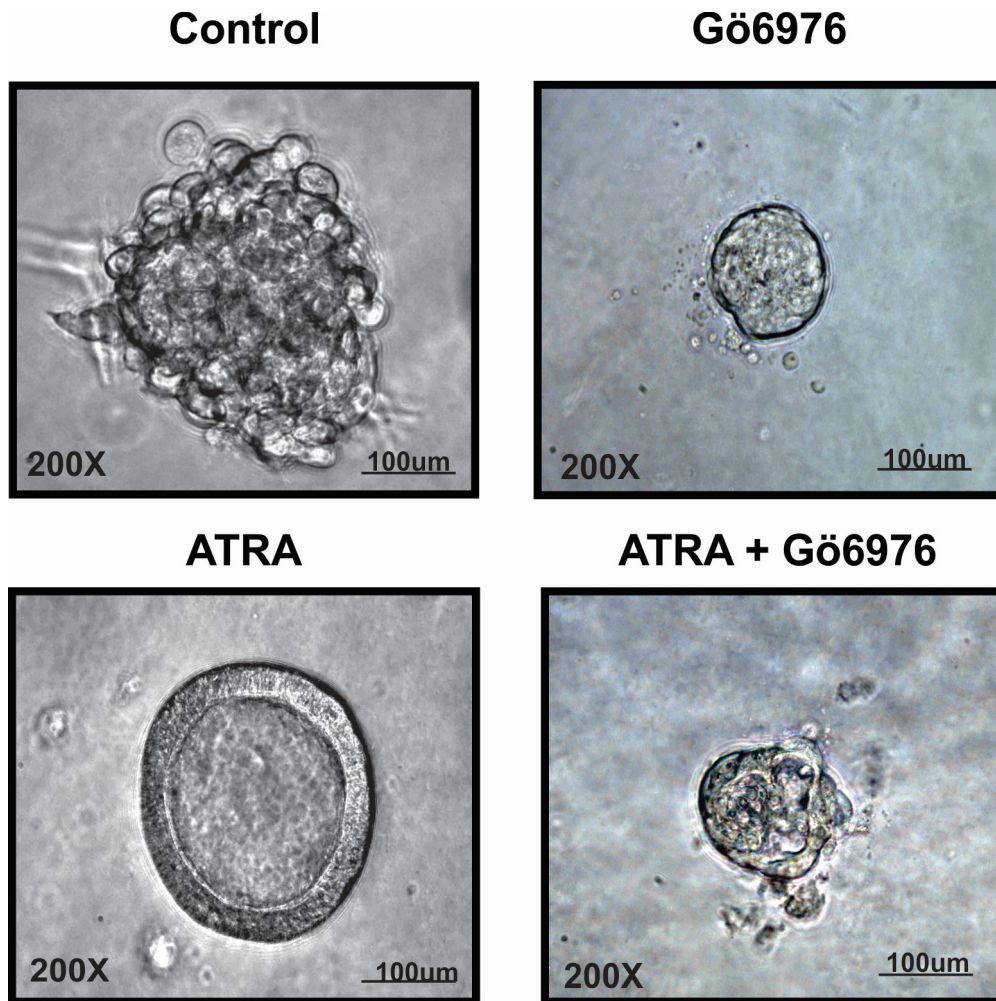


Figura.V.1. Diferenciación de las células stem/progenitoras en cultivos 3D en matrigel por los distintos tratamientos. La figura representa el crecimiento en cultivos 3D en matrigel por 12 días de células provenientes de mamoesferas primarias pre-tratadas.

Para seguir profundizando, decidimos confirmar si las colonias tratadas con ATRA estaban polarizadas. Para ello realizamos una inmunofluorescencia marcando los filamentos de actina y los núcleos de las colonias 3D originadas por las células derivadas de las mamoesferas pre-tratadas con los distintos tratamientos. Es conocido que cuando las células están polarizadas, los filamentos de actina se concentran en la cara apical de las células y los núcleos se focalizan sobre la cara basolateral.

Observamos que las colonias originadas de las células derivadas de las mamoesferas tratadas con ATRA tienen una clara polarización celular (Fig.V.6.).

En cambio en las células control no se observó ninguno de estos fenómenos. Por otro lado, cuando se bloquea la actividad de PKC α , el efecto del tratamiento del ATRA se revierte totalmente, inhibiendo la polarización y diferenciación celular inducida por el tratamiento retinoide sobre el componente stem (Fig.V.2.).

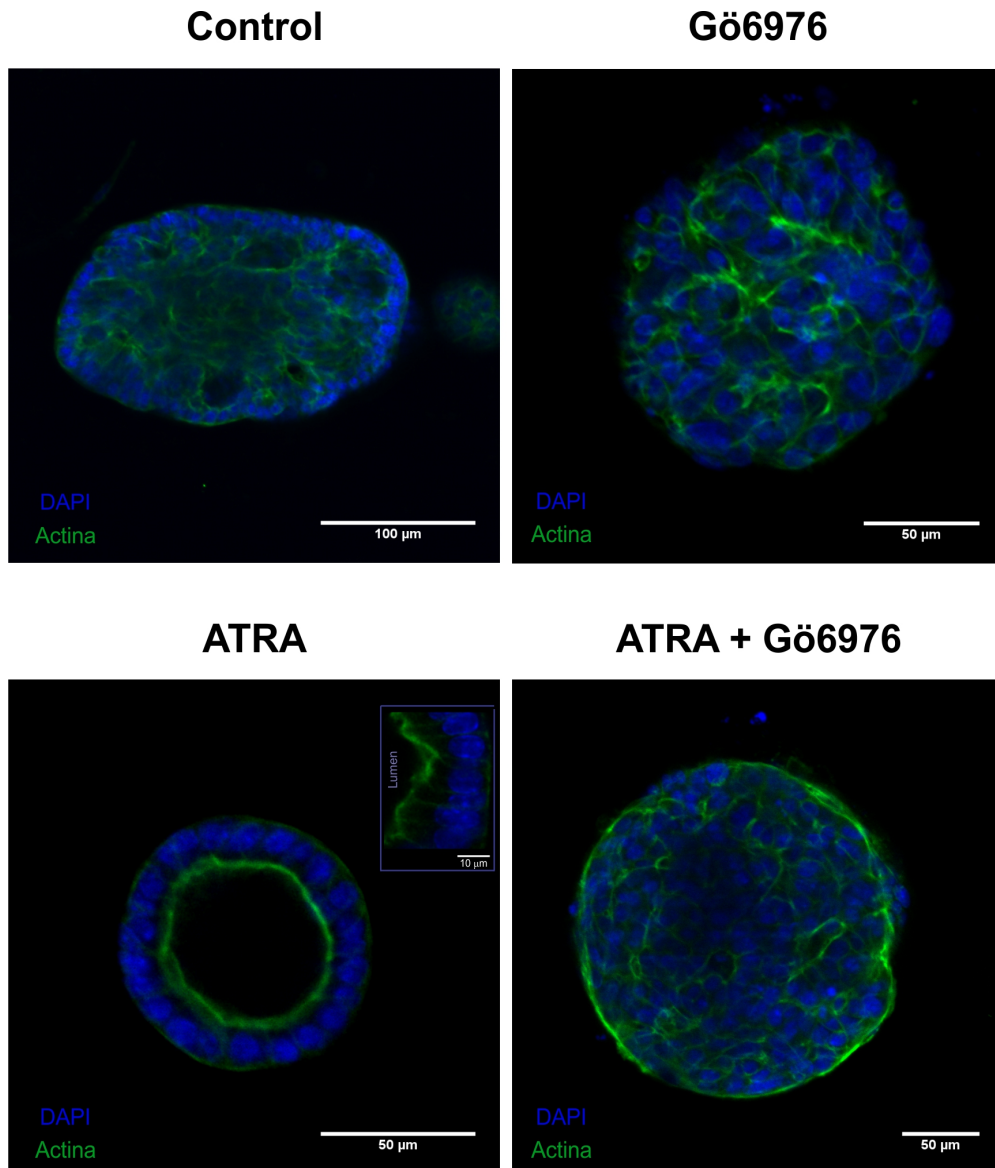


Figura V.6. polarización de las células stem/progenitoras en cultivo 3D en matrigel por los distintos tratamientos. Panel A: La figura representa el crecimiento en cultivos 3D en matrigel por 12 días de células provenientes de mamoesferas primarias pre-tratadas.

Efecto del tratamiento combinado sobre la proliferación y la auto-renovación de la células stem/progenitoras.

Con el objeto de estudiar más en detalle el efecto de cada tratamiento sobre el componente stem/progenitor de la línea LM38-LP, las mamoesferas fueron incubadas con los distintos tratamientos durante 96 hs. Luego, las células stem derivadas de las mamoesferas pre-tratadas fueron cultivadas para obtener una segunda generación de mamoesferas, como una forma de medir la capacidad de auto-renovación del componente stem. Curiosamente, el pre-tratamiento con ATRA de las mamoesferas primarias aumentó la capacidad de auto-renovación, es decir la capacidad de formar nuevas mamoesferas (Fig.V.3.A.). Sin embargo, éstas resultaron significativamente más pequeñas que las del control (Fig.V.3.B.). Por otro lado, la inhibición farmacológica de PKC α , no solamente redujo la capacidad de auto-renovación de las células stem/progenitoras, sino que además bloqueó el efecto del ATRA sobre este parámetro (Fig.V.3.A.).

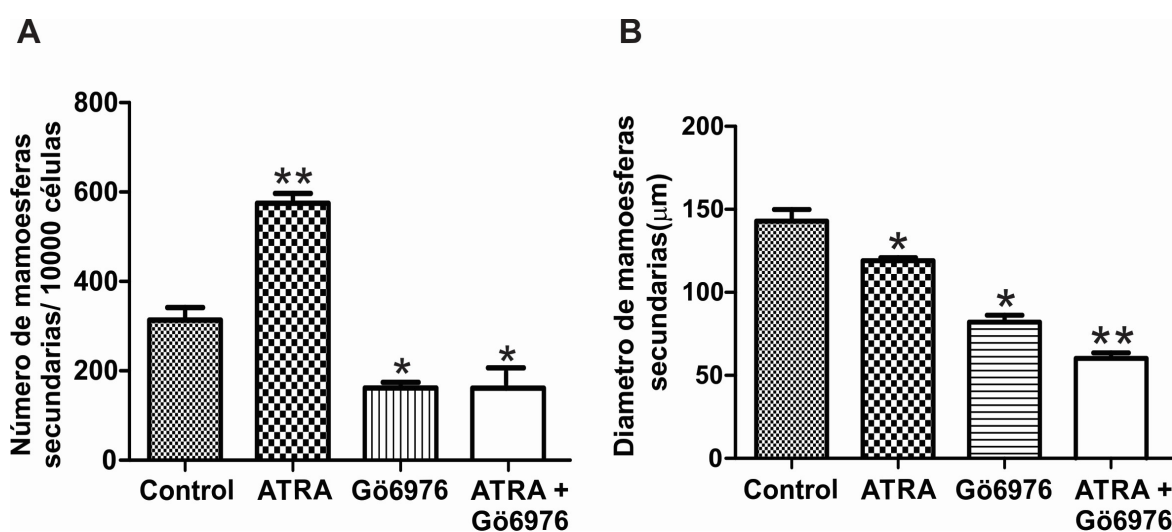


Figura V.3. Evaluación del efecto de los distintos tratamientos sobre el crecimiento y auto-renovación del componente stem de la línea LM38-LP. Panel A: El histograma representa el diámetro de las mamoesferas luego recibir los distintos tratamientos por 96 hs. Panel B: El grafico representa el número de mamoesferas secundarias sobre 10000 células sembradas provenientes de mamoesferas primarias pre-tratadas por 96 hs. Figura representativa de tres experimentos independientes de n=3, *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs Gö6976, ANOVA.

Efecto del tratamiento combinado sobre la capacidad clonogénica de la células stem/progenitoras.

Decidimos analizar el efecto de los distintos tratamientos sobre la capacidad clonogénica de las células stem/progenitoras, la cual es imprescindible para dar origen a un tumor o nuevo tumor en un órgano distante. Para ello, células derivadas de mamoesferas pre-tratadas por 96 hs, fueron sembradas en baja densidad sobre condiciones de cultivo en monocapa. Nuevamente, el pre-tratamiento con ATRA indujo un aumento en la capacidad clonogénica de las células stem/progenitoras (Fig.V.4.) mientras que la presencia del Gö6976 inhibe este efecto, a la vez que disminuye la formación de colonias *per se* (Fig.V.4.).

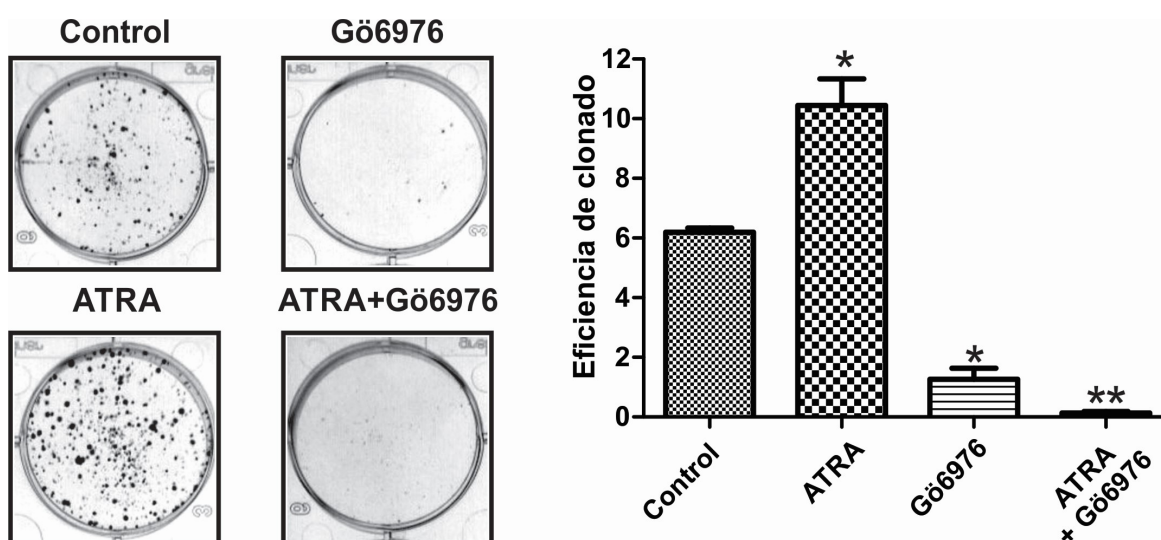


Figura V.4. Capacidad clonogénica de las células stem/progenitoras luego de los distintos tratamientos. Panel A: El grafico representa la eficiencia de clonado sobre 3000 células sembradas a partir de células derivados de mamoesferas primarias pre-tratadas. Panel B: Figura representativa del número de colonias formadas por las células derivadas de las mamoesferas pre-tratadas. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=3, *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs Gö6976, ANOVA.

Perfil de genes pluripotenciales del componente stem por la modulación del tratamiento retinoide y el bloqueo de la actividad de PKC α .

Luego, estudiamos si el tratamiento con ATRA y/o la inhibición de la actividad de PKC α modula alguno de los genes pluripotenciales y/o fundamentales para que las células stem mamarias mantengan su jerarquía. Estos genes fueron analizados en el capítulo I, cuando se caracterizó el componente stem de la línea LM38-LP (Fig.I.1). Observamos que el tratamiento con ATRA aumentó los niveles de Slug pero este aumento es revertido cuando se bloquea la actividad de PKC α (Fig.V.5.). Por otro lado la inhibición de PKC α disminuye los niveles de Nanog y este efecto se potencia en el tratamiento combinado (Fig.V.5.).

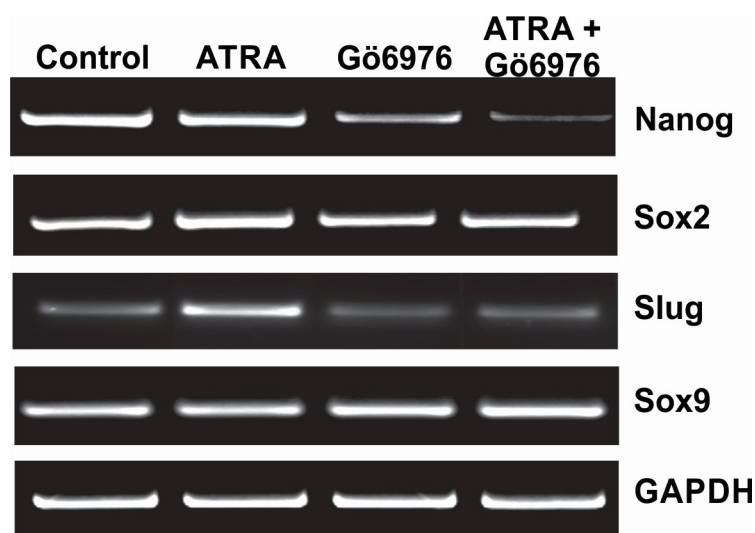


Figura V.5. Modulación de genes pluripotenciales de las células stem/progenitoras por los distintos tratamientos: RT-PCR para genes pluripotenciales: Nanog, Sox2, Slug y Sox9 luego de 48hs de tratamientos: Figura representativa de tres experimentos independientes.

Análisis del perfil de expresión de los RARs bajo los distintos tratamientos

Hemos demostrado en el capítulo II que las células provenientes de mamóferas expresan PKC α y que el tratamiento por 48 hs con ATRA disminuye sus niveles (Fig.II.1). También hemos descrito en el capítulo IV que la disminución del receptor RAR γ 2 (principalmente en las células LEP), por la inhibición

farmacológica de PKC α , era potenciada por el tratamiento retinoideo, inclusive en el componente MEP (Fig.IV.7B.).

Nos preguntamos ahora si estos tratamientos también modifican el perfil de expresión de los receptores retinoides en las células stem/progenitoras.

Mientras que el ATRA induce un marcado aumento de RAR β , tal como lo habíamos evidenciado en la línea LM38-LP crecida en monocapa, también fue capaz de aumentar los niveles de receptor RAR γ 2. Este notable aumento, es parcialmente bloqueado ante la presencia del inhibidor de PKC α , Gö6976 (Fig.V.6.).

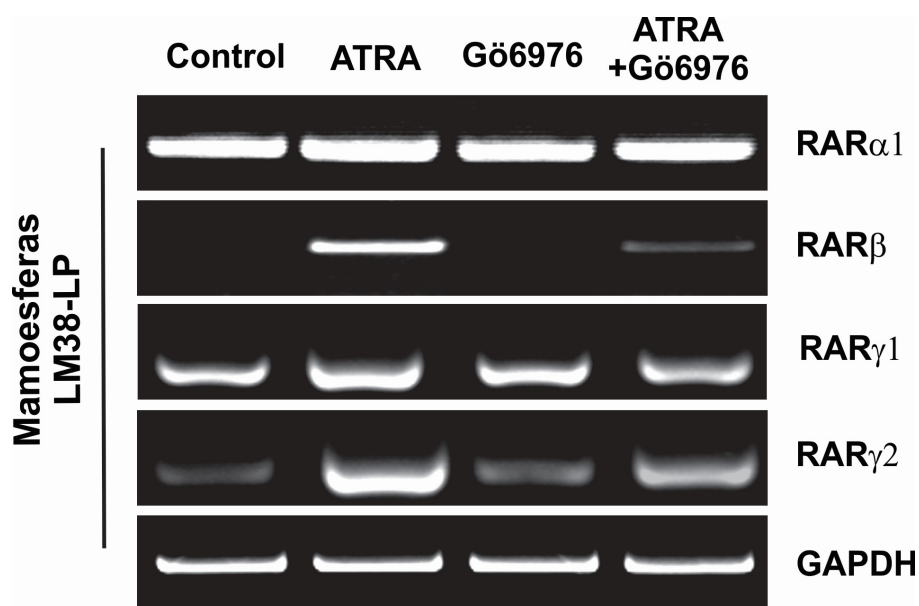


Figura V.6. Panel de expresión y modulación de los receptores retinoides por los distintos tratamientos en las células stem/progenitoras. RT-PCR para evaluar la expresión y modulación de los receptores retinoides: RAR α 1, RAR β , RAR γ 1, RAR γ 2. Figura representativa de tres experimentos independientes.

Participación de los receptores retinoides sobre la proliferación, diferenciación y auto-renovación del componente stem/progenitor.

Finalmente, a partir de la observación de que el tratamiento con ATRA provocaba el aumento del número de mamoeferas secundarias y de la capacidad clonogénica de las células stem/progenitoras, coincidentemente con el aumento en los niveles de los receptores RAR β y RAR γ 2, quisimos determinar cuál de

estos receptores estaba implicado en estos efectos biológicos. Para ello utilizamos antagonistas específicos de cada uno.

Observamos que el tratamiento con el antagonista de RAR γ (MM 11253) en combinación con ATRA por 96 hs revirtió totalmente el efecto ejercido por el retinoide sobre el aumento en la capacidad clonogénica y la auto-renovación de las células stem/progenitoras (Fig.V.7.A. y 7.B.). Por su parte, el tratamiento con ATRA y el antagonista de RAR β (LE 135), indujo un aumento del número de mamoesferas secundarias no afectando su capacidad clonogénica respecto del tratamiento retinoide por separado (Fig.V.7.A. y 7.B.).

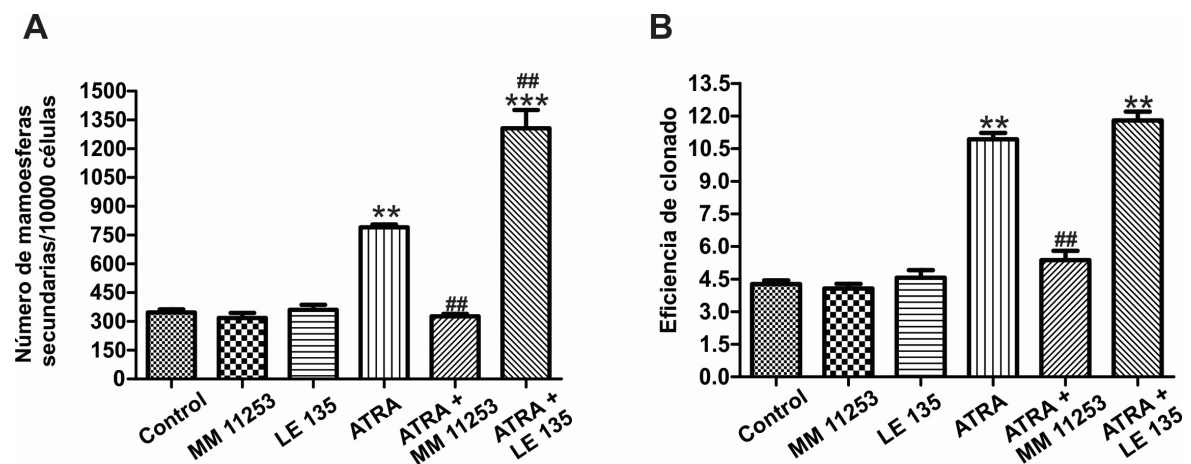


Figura V.7. Participación de los receptores retinoides sobre la proliferación y auto-renovación de las mamoesferas LM38-LP. Panel A: El histograma representa el número de mamoesferas secundarias sobre 10000 células sembradas provenientes de mamoesferas primarias pre-tratadas por 96 hs con los diferentes tratamientos. Panel B: El gráfico representa la eficiencia de clonado sobre 3000 células sembradas a partir de células derivadas de mamoesferas primarias pre-tratadas por 96 hs con los diferentes tratamientos. Figura representativa de tres experimentos independientes de n=3, *p<0,01 vs control, ***p<0,001 vs control, ##p<0,01 vs ATRA, ANOVA.

CAPITULO VI: Evaluación del efecto de la terapia combinada de ATRA y el inhibidor farmacológico de PKC α sobre el crecimiento y la diseminación metastásica *in vivo*.

Con el fin de validar los resultados obtenidos *in vitro* con la terapia combinada, de ATRA con Gö6976, hemos realizado una experimentación en ratones BALB/c portadores del tumor LM38-LP creciendo ortotópicamente.

En todos los casos, cuando los tumores fueron palpables los animales recibieron el tratamiento con ATRA a través de un pellet subcutáneo de liberación lenta (10 mg/ratón) y/o una dosis semanal de 200µl del inhibidor farmacológico de PKCα (0,015µM) en forma peri-tumoral, durante tres semanas.

Pudimos observar que tanto el tratamiento con ATRA como el inhibidor de PKCα empleados como monoterapia, fueron capaces de disminuir significativamente el volumen tumoral en los ratones portadores de tumor LM38-LP (Fig.VI.1.). El tratamiento combinado mostró un efecto sinérgico respecto a la inhibición del crecimiento tumoral (Fig.VI.1.).

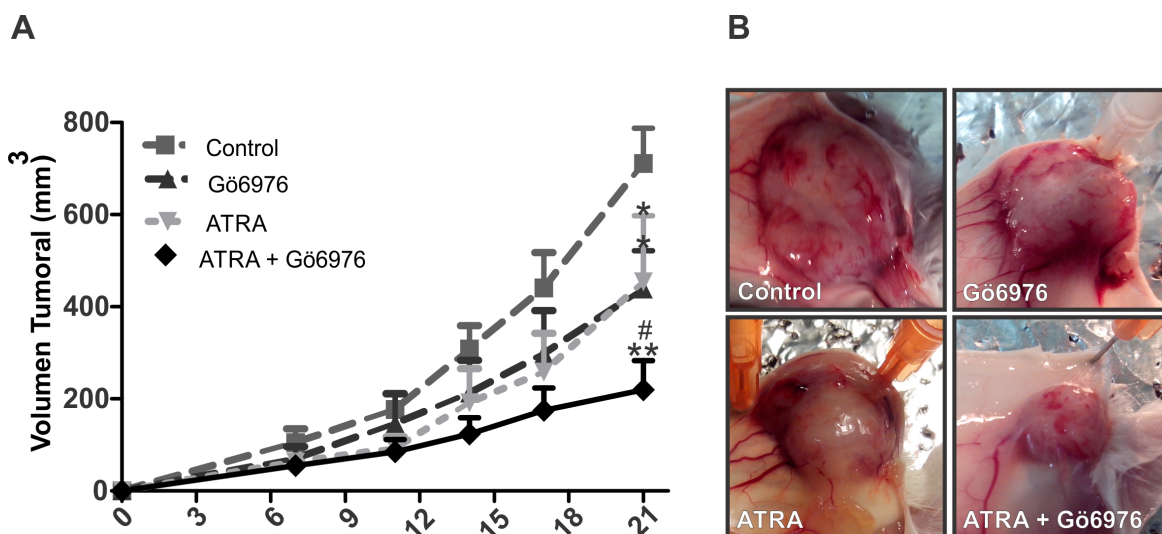


Figura VI.1. Efecto de los distintos tratamientos sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. El grafico representa el volumen tumoral de cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo. Panel B: Figura representativa de los tumores de cada grupo tratado. La figura es representativa de tres experimentos independientes de n=5, *p<0,05 vs control, **p<0,01 vs control, #p<0,05 vs Gö6976, ANOVA

Por otro lado, hemos analizado el efecto de estas terapias sobre la capacidad metastásica espontánea. Solo el tratamiento con Gö6976 evidenció un número de metástasis significativamente menor respecto del control. En cambio el

tratamiento con ATRA no logro disminuir el número de metástasis de manera significativa. En la terapia combinada observamos una marcada reducción del número de metástasis pulmonares, aunque esa diferencia no llegó a ser significativa respecto del tratamiento con Gö6976. (Fig.VI.2.).

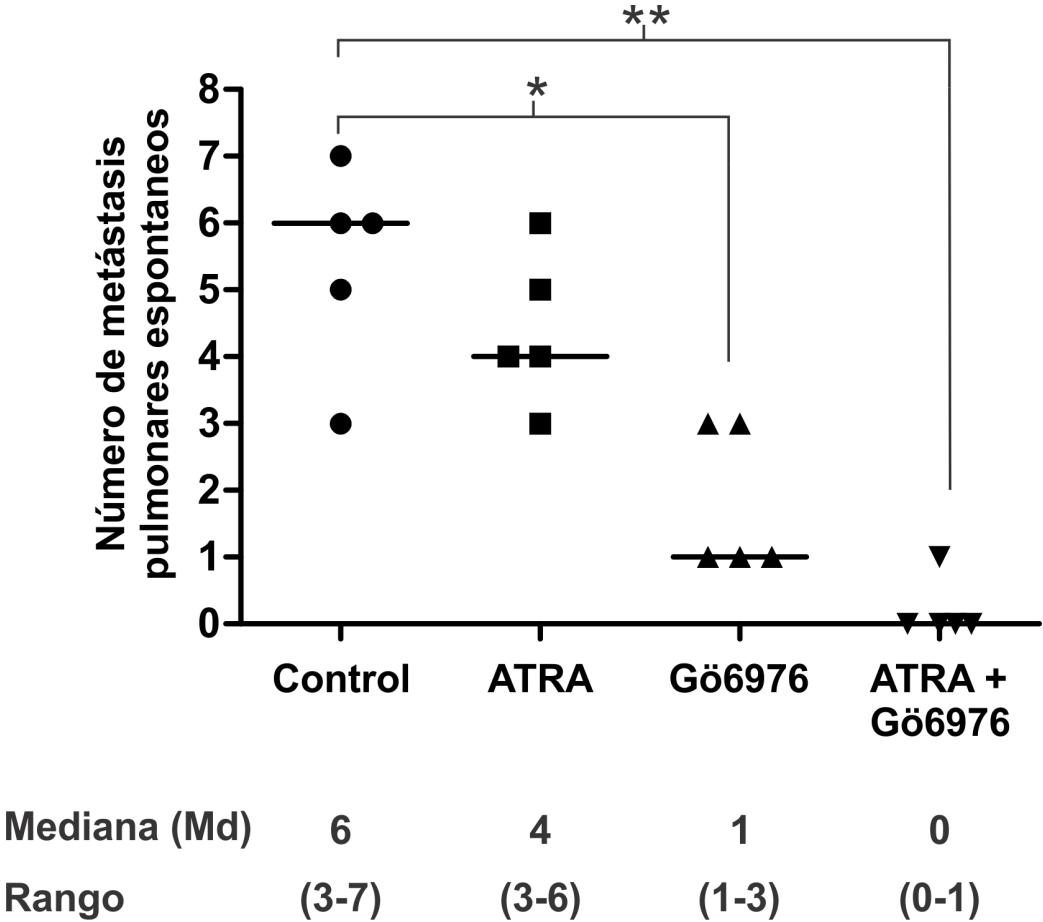


Figura VI.2: Efecto de los distintos tratamientos sobre el número de metástasis espontaneas. Se grafica el número de metástasis pulmonares por ratón bajo cada tratamiento. El grafico corresponde a un experimento n=5. *p<0,05 vs. Control, Mann Whitney.

CAPITULO VII: Implicancia de la expresión de PKC α , RAR β y RAR γ 2 en la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con cáncer de mama.

En el capítulo VI, hemos demostrado que tanto el tratamiento con ATRA como el bloqueo de la actividad de PKC α disminuyen la progresión tumoral, siendo este efecto sinérgico al combinarse ambos tratamientos. Además, en los capítulos anteriores, observamos que el tratamiento combinado induce varios de sus efectos anti tumorales a través de la modulación positiva de RAR β y la modulación negativa de RAR γ .

En este capítulo, nos focalizamos en estudiar la implicancia de la expresión conjunta de RAR β y RAR γ , como así también de PKC α , en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de pacientes de cáncer de mama de subtipo basal, ya que éste subtipo es el que más se asemeja al modelo tumoral LM38-LP.

Para ello, utilizamos una base de datos publica on-line con gráficos de Kaplan-Meier que contiene información de pacientes con cáncer de mama y sus perfiles de expresión génica [87].

En primer lugar, analizamos la SLE de un grupo de pacientes portadoras de cáncer de mama subtipo basal, receptor de estrógeno negativo y linfonodo negativo. En este grupo de pacientes analizamos si la expresión de RAR β , RAR γ y PKC α por separado o la combinación de las 3 se asocian significativamente con una menor o mayor SLE. No evaluamos la supervivencia global debido al bajo número de pacientes para este parámetro.

Las combinaciones de los 3 genes a analizar, se decidieron en base a los resultados de los capítulos anteriores. Las mismas son: Altos niveles de expresión de RAR β con bajos de RAR γ y PKC α y bajos niveles de expresión de RAR β con altos de RAR γ y PKC α .

En el grupo de pacientes analizado, no observamos asociación significativa entre la expresión de RAR γ o de PKC α por separado, con la SLE (Fig.VII.1). Sorpresivamente, encontramos que RAR β si se asocian significativamente con la SLE de manera que, las pacientes que exhiben niveles de expresión elevados de RAR β , presentan peor pronóstico en términos de SLE, que aquellas que expresan menores niveles de esta molécula (HR=1,73; P=0,036) (Fig.VII.1). Al estudiar el efecto de la combinación de estos 3 genes (como fue descripto más arriba), observamos que altos niveles de RAR β y al mismo tiempo bajos niveles

de RAR γ y PKC α no se asocian significativamente con la SLE de éste grupo de pacientes (Fig.VII.1)

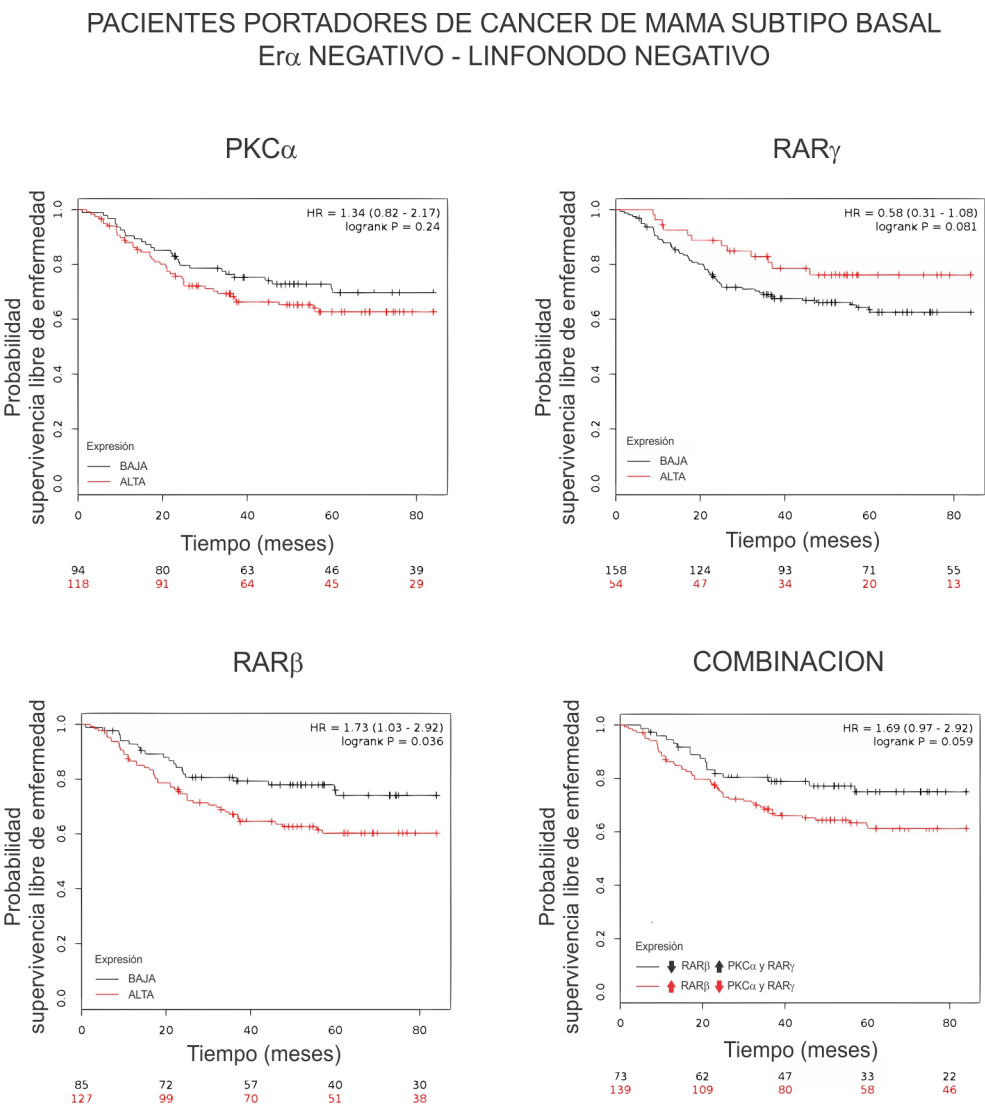


Figura. VII.1: Implicancia de la expresión de RAR β , RAR γ y PKC α en la SLE del grupo de pacientes de cáncer de mama analizado. Los gráficos corresponden a las curvas de supervivencia obtenidas con el metodo de Kaplan-Meier surgidas del análisis de expresión de RAR β , RAR γ y PKC α juntas o cada una por separado en 212 pacientes portadores de cáncer de mama subtipo basal, receptor de estrógeno negativo y linfonodo negativo.

Luego analizamos si la expresión de RAR β , RAR γ y PKC α por separado o la combinación de las 3 se asocian significativamente con una menor o mayor SLE en un grupo de pacientes portadores de cáncer de mama subtipo basal, receptor de estrógeno negativo y linfonodo positivo.

Observamos que la expresión de RAR γ no se asocia significativamente con la SLE (Fig.VII.2). Siguiendo con el estudio, encontramos que una baja expresión de PKC α se asocia significativamente con una mayor SLE (HR=2,39; P=0,019) (Fig.VII.2). Finalmente al analizar qué sucedía con la expresión de RAR β , hallamos que altos niveles de RAR β ahora se asocian significativamente con una mayor SLE (HR=0,51; P=0,039) (Fig.VII.2). Al estudiar el efecto de la combinación de estos 3 genes, observamos que altos niveles de expresión de RAR β en combinación con bajos niveles de expresión de RAR γ y PKC α se asocian significativamente con una mayor SLE, teniendo ésta una significancia mayor en comparación a la obtenida con RAR β y PKC α por separado [(Combinación HR=0,44; P = 0,0098); (RAR β HR=0,51; P = 0,039); (PKC α HR=2,39; P=0,019)] (Fig.VII.2).

Podemos concluir que, para las pacientes que presentan linfonodo positivo, una elevada expresión de RAR β en combinación con una baja expresión de RAR γ y PKC α , se asocia con mejor pronóstico en términos de SLE, presentando menor riesgo de recaída, en un período de 7 años, que las pacientes que presentan la combinación opuesta de las moléculas.

PACIENTES PORTADORES DE CANCER DE MAMA SUBTIPO BASAL
Er α NEGATIVO - LINFONODO POSITIVO

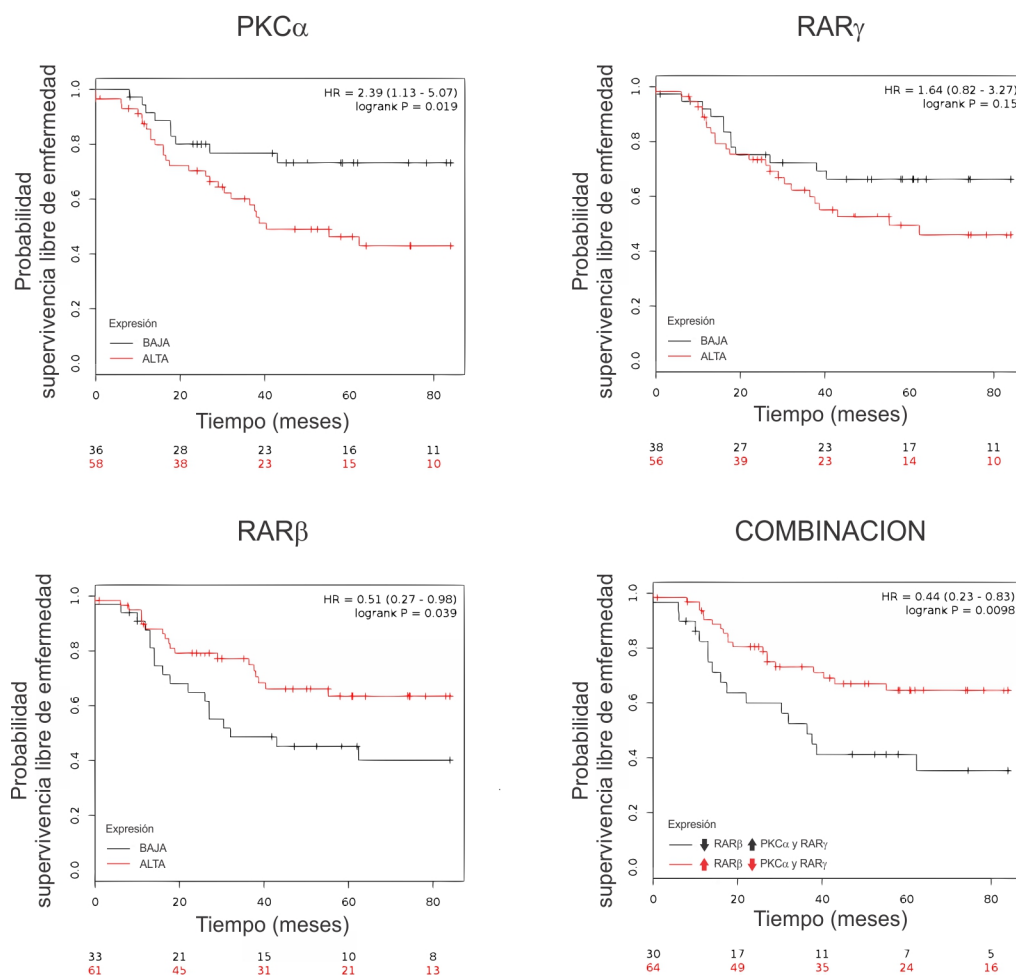


Figura. VII.2: Implicancia de la expresión de RAR β , RAR γ y PKC α en la SLE de pacientes de cáncer de mama. Los gráficos corresponden a las curvas de supervivencia obtenidas por el método de Kaplan-Meier surgidas a partir del análisis de la expresión de RAR β , RAR γ y PKC α juntas o de cada una por separado en 94 pacientes portadores de cáncer de mama subtipo basal, receptor de estrógeno negativo y linfonodo positivo.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es un importante problema de salud pública. En la Argentina, cada año mueren aproximadamente 5.400 mujeres y se estima que se diagnostican alrededor de 17.000 casos nuevos (datos del MSAL 2010) [91].

La implementación de terapias adyuvantes o neoadyuvantes, mejora considerablemente el pronóstico, ya que este tipo de tratamientos habitualmente disminuye las posibilidades del desarrollo de tumores secundarios. Por esta razón, el estudio y la mejor comprensión de los pasos que llevan a la progresión tumoral son muy importantes en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

Respecto del cáncer de mama, debemos tener en cuenta que el epitelio mamario está compuesto mayoritariamente por dos tipos celulares, las células epiteliales que forman el ducto y el sistema lobular, y las células mioepiteliales [40, 41]. Por otro lado, las células stem adultas son un pequeño porcentaje de las células que conforman los sistemas de órganos donde dan lugar a tipos celulares específicos [92]. Así, considerando que los tumores podrían contener células stem malignas que conduzcan a la formación y crecimiento del tumor, se explicaría porque los tratamientos convencionales que sustancialmente reducen la masa tumoral removiendo células proliferantes, fallan para curar al paciente en algunos tipos de cáncer, dado que las células stem/progenitoras tienen generalmente una tasa de proliferación muy baja, siendo insensibles a estos tratamientos[17].

Por lo tanto, el estudio de la biología de las células stem podría proveer de nuevas herramientas terapéuticas contra el cáncer[16]. Sin embargo las vías de señalización que definen al nicho stem son aún poco claras y el mantenimiento y propagación está íntimamente interconectada con la señalización del entorno[93].

Entre las numerosas vías de señalización o sistemas genómicos implicados en la progresión tumoral, hemos hecho especial hincapié en el sistema retinoide y la vía de las PKC, dada la experiencia previa de nuestro equipo de trabajo.

Así, el Ácido Retinoico , un metabolito activo de la vitamina A involucrado principalmente en la diferenciación celular y la vía de la Proteína Quinasa C , una familia de enzimas que se encuentran vinculadas a numerosas funciones celulares incluyendo la transformación maligna, han sido propuestas por varios autores como importantes puntos de intervención terapéutica.

Los retinoides pueden alterar la actividad de algunas isoformas de PKC revirtiendo el fenotipo maligno [78, 94, 95]. Más aún, nuestro grupo de trabajo ha

descripto una interacción mecanística entre el sistema del Ácido Retinoico y la vía de señalización de la Proteína Quinasa C en el modelo de mama murino LM3 donde observamos principalmente que la actividad de las isoformas α y δ de PKC es necesaria para la inducción de la vía genómica del sistema retinoide[82].

En la actualidad, el tratamiento de tumores mamarios con retinoides como única droga, no ha tenido éxito. Es por esta razón que nos preguntamos si alguna de las moléculas involucradas en las interacciones entre el sistema retinoideo y las PKCs podría constituir un mejor blanco terapéutico para el tratamiento eficaz de este tipo de patologías.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral utilizamos la línea LM38-LP, una línea única que presenta todos los componentes celulares de los tumores mamarios: células luminales, mioepiteliales y stem/progenitoras. Además, por estudios previos de nuestro laboratorio, sabemos que presenta similitud con el subtipo basal de cáncer de mama siendo fenotípicamente similar a los tumores mamarios humanos triple negativos ya que expresa citoqueratina 5 y no expresa receptor de estrógeno y HER2 [40, 62]. Además, este modelo tumoral expresa los principales receptores retinoideos como lo son $RAR\alpha$, $RAR\beta$ y $RAR\gamma$. Es conocido que el receptor $RAR\beta$ estaría involucrado en la diferenciación [51, 74], lo que contribuye al efecto sobre la inhibición del crecimiento ejercida por los retinoides. En cambio el receptor $RAR\gamma$, estaría implicado en la proliferación y mantenimiento de células stem [75, 76].

Gracias al uso de esta línea celular pudimos evaluar el rol del sistema retinoide y la vía de PKC en cada componente celular, permitiéndonos tener una visión más completa de la biología tumoral mamaria.

Nuestro primer objetivo fue aislar, caracterizar y validar que la línea LM38-LP tenía un componente stem/progenitor, dado que siempre que se quiso separar ambas sub-poblaciones para su cultivo independiente, nunca se logró obtener un clon luminal.

Para ello, hemos realizado diversos ensayos de mamoesferas, siendo éste un método de cultivo selectivo donde únicamente las células stem/progenitoras pueden proliferar. Como era de esperarse, las mamoesferas expresaron altos niveles de genes pluripotenciales como Nanog, Sox2, Sox9 y Slug respecto de la

línea creciendo en monocapa. En un trabajo reciente, se ha demostrado que la sola re-expresión de Sox9 y Slug en una célula epitelial, la transforma en indiferenciada con propiedades stem, capaz de regenerar un árbol mamario completo[60]. Por lo que se concluye que estos genes son necesarios para mantener la jerarquía stem de las células mamarias.

Siguiendo con la caracterización del componente stem, hemos demostrado que las mamoesferas de LM38-LP, tienen la capacidad de regenerar la línea *in vitro*: Comprobamos que una única célula derivada de una mamoesferas fue capaz de dar una colonia, con ambas estirpes celulares. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Guo et al[60], donde describe que células con expresión de Sox9 y Slug son células bi-potenciales.

Una vez validada la presencia de una subpoblación bi-potencial de células stem en la línea LM38-LP, nos planteamos el objetivo de evaluar cual era la implicancia de las isoformas α o δ de PKC en relación a la respuesta de cada componente celular a la terapia con retinoides. Para ellos, primero evaluamos cual era el perfil de expresión de PKC α y δ en cada componente celular de la línea LM38-LP y como son afectados sus niveles por el tratamiento con ATRA.

Observamos que si bien ambas isoformas se expresan en mayor o menor medida en todos los componentes celulares, el tratamiento retinoico las modula de manera diferencial dependiendo del componente donde se localizan. La isoforma α de PKC disminuye sus niveles frente al tratamiento con ATRA tanto en las células luminales y mioepiteliales como en las stem/progenitoras. En cambio la isoforma δ de PKC aumenta sus niveles solamente en el componente luminal, luego del tratamiento con ATRA. Esta última observación es coincidente con resultados anteriores en la línea mamaria murina (Her2+) LM3 de origen luminal [82]. Por otro lado, observamos que existe una gran diferencia en los niveles de PKC δ entre el componente stem y la línea LM38-LP.

Al analizar cuáles son los efectos biológicos asociados a la inhibición de cada una de las PKCs en presencia del tratamiento con ATRA, nos encontramos que solo la inhibición de PKC α sensibiliza las células al tratamiento retinoide, potenciando la inhibición de la mayoría de los parámetros *in vitro* asociados a la progresión tumoral.

Mientras que la inhibición de PKC δ ejerce funciones diferentes sobre cada componente.

Puesto que el ATRA aumenta PKC δ solo en el componente LEP, la inhibición de la actividad de esta isoforma, apagaría parcialmente el efecto de la terapia retinoidea, resultado que correlaciona con un trabajo previo realizado en LM3 (Línea celular tumoral de tipo luminal) [82]. En LM38-LP, PKC δ parece colaborar con el sistema retinoide, quizá sobre la actividad de la vía genómica y sería por eso que observamos el bloqueo del efecto del ATRA sobre la disminución de la proliferación cuando PKC δ está inhibida.

En el resto de los componentes celulares, el sistema retinoide no modula PKC δ . Curiosamente, el componente stem tiene altos niveles de PKC δ en comparación con los demás. Justamente, en este componente, la inhibición de PKC δ genera un efecto biológico contrapuesto al que sucede en la línea LM38-LP, ya que el bloqueo de PKC δ induce la proliferación y la auto-renovación del componente stem pero inhibe la proliferación de la línea LM38-LP.

Hipotetizamos que PKC δ estaría manteniendo la proporción de cada componente celular. Así, cuando su actividad es inhibida, se frenaría el crecimiento y/o proliferación de las células LEP y MEP mientras que las células stem son comprometidas a “restaurar” el tumor y por esa razón se induciría su proliferación y autorrenovación.

¿Pero cuál o cuáles son los mecanismos a través de los cuales PKC δ ejerce este rol dual?

Con la idea de evaluar la participación de PKC δ en el crecimiento de la línea LM38-LP, analizamos la proliferación bajo el tratamiento con el inhibidor farmacológico Rottlerin. Observamos una disminución de la proliferación celular bajo estas condiciones. Esta inhibición se asoció con el aumento de las células en la fase G1 del ciclo celular. Estos resultados son consistentes con trabajos reportados previamente donde la inhibición de PKC δ induce el arresto del ciclo celular en la fase G1 en células NCI-H28 [96]. Al estudiar la morfología de las células bajo el microscopio invertido, observamos que el tratamiento con Rottlerin induce la aparición de numerosas vacuolas. Este resultado sumado a la ausencia de células en la fase sub G1 del ciclo celular (que indicaría muerte celular por

apoptosis o necrosis) nos hizo sospechar que se podría estar induciendo un mecanismo de autofagia. De hecho, recientemente se ha descrito que la inducción de autofagia lleva al bloqueo de la apoptosis y viceversa [35].

A través de la medición de la proteína LC3 y el estudio del flujo autofágico confirmamos la inducción de autofagia. Curiosamente, un trabajo reciente mostró que la ciclina D1, un regulador clave del ciclo celular cuya actividad es requerida para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, actúa como un supresor de la autofagia en el epitelio mamario [97]. Por lo que sería posible pensar que la autofagia sea promovida por el arresto en la fase G1 del ciclo celular, donde la ciclina D1 es degradada [98]. Además, previamente ha sido descrito que numerosos miembros de la familia de las PKCs tienen un rol en la inducción del proceso de autofagia [99, 100].

Luego nos preguntamos si la inducción de autofagia promovida por la inhibición de PKC δ favorecería la sobrevida o por el contrario inducía un tipo de muerte celular en las células LM38-LP diferente de la apoptosis, denominada “muerte programada tipo II” [31]. Nuestros resultados revelaron que el bloqueo de la autofagia potencia el efecto inhibitorio de la proliferación celular inducido por la inhibición de PKC δ . Recientemente se ha reportado que la inducción de autofagia, en fases tempranas, actuaría como un mecanismo de sobrevida frente a la inducción de apoptosis tardía [101]. Por lo tanto, en nuestro modelo, el mecanismo autofágico tendría un efecto protector.

En nuestro modelo, las células stem/progenitoras tienen altos niveles de PKC δ comparado con las células cultivadas en monocapa y la inhibición de la actividad de esta isoforma de PKC aumentó de manera significativa el diámetro de las mamoesferas. Además, la inhibición de PKC δ , ya sea a través del inhibidor farmacológico o un siRNA específico, incrementó el número de mamoesferas secundarias y la expresión de Nanog y Slug, parámetro asociado al aumento del potencial de auto-renovación de las células stem. Estos resultados correlacionan con un trabajo reciente que muestra que la expresión de Nanog es bloqueada por PKC [102].

En conjunto estos resultados sugieren que PKC δ mantiene baja la tasa de proliferación de las células stem/progenitoras.

Por otro lado, las células stem/progenitoras tratadas con Rottlerin mostraron un marcado cambio en su patrón de diferenciación (cultivos 3D en matrigel). Como fue descrito por Kenny y colaboradores [103], las estructuras 3D formadas en estas condiciones de cultivo correlacionan con el grado de diferenciación celular y malignidad. Las células derivadas de las mamoesferas formaron estructuras con forma “mass” (masa), pero por el pre-tratamiento con Rottlerin, las colonias cambiaron a estructuras “grape-like” (tipo uva), usualmente asociada con células que tienen un fenotipo de malignidad mayor. Para confirmar el incremento del potencial maligno, decidimos hacer un ensayo de metástasis experimentales. En dicho experimento inyectamos por la vena de la cola de ratones BALB/c, células provenientes de mamoesferas pre-tratadas o no con Rottlerin. La inhibición de PKC δ incremento el número de metástasis pulmonares, confirmando de esta manera el aumento de la malignidad en este componente. Además se ha evidenciado de manera significativa caquexia, uno de los síndromes paraneoplásicos que correlacionan con los estadios avanzados del cáncer [104]. Por lo tanto, la disposición de colonias “grape-like” (tipo uva) nos permite hipotetizar que el bloqueo de PKC δ conduce a algunas de las células del tumor primario a escapar y adquirir un fenotipo metastásico.

Ahora nos preguntamos tal como sucede en las monocapas de la línea LM38-LP, si la autofagia también era inducida en las células stem/progenitoras cuando se inhibe la actividad de PKC δ . Observamos, tal cual describió Gong et al [105], que las mamoesferas tienen un elevado flujo autofágico basal, pero que bajo la inhibición de PKC δ este flujo se incrementa. Finalmente evaluamos si la autofagia es uno de los mecanismos que media los efectos inducidos por el bloqueo de PKC δ . Observamos que el bloqueo de la autofagia logró revertir el aumento de la capacidad de auto-renovación de las células stem inducido por esta isoforma de PKC. Este resultado concuerda con un trabajo que describe que el regulador de autofagia ATG4A es esencial para el mantenimiento de células stem tumorales [106]. Además, existe numerosa evidencia que demuestra el rol esencial de la autofagia en el mantenimiento y autorrenovación de las células stem tumorales en numerosos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, glioblastoma y neoplasias pancreáticas [107]. Curiosamente, Kumar y colaboradores [101], describieron que el tratamiento con Rottlerin en fases tempranas induce autofagia

en células stem tumorales mamarias humanas, lo que concuerda con nuestros resultados, pero en fases tardías induce apoptosis en dichas células. Esta diferencia podría explicarse en parte, no solo por que la línea que utilizamos es murina y en el trabajo de Kumar son células humanas, sino también en la metodología empleada para la selección, cultivo y el estudio del efecto del tratamiento con Rottlerin sobre las células stem tumorales. En el trabajo de Kumar y colaboradores, separan la población stem y la cultivan en monocapa. En cambio, en este trabajo de tesis, aislamos a la población stem de la línea LM38-LP a través del ensayo de mamoesferas, donde cultivamos a la población stem en cultivos 3D en suspensión.

En resumen, el bloqueo de la actividad de PKC δ ejerce un rol dual a través del mecanismo de autofagia, disminuyendo la capacidad proliferativa de las células tumorales mamarias, pero activando la capacidad de auto-renovación de las células stem tumorales.

Aunque, los inhibidores de PKC δ podrían ser útiles en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, ya que limitan el crecimiento del tumor, las células supervivientes tendrían características stem y podrían presentar un mayor potencial maligno. Por lo tanto, es imprescindible determinar claramente los acontecimientos moleculares que controlan estos efectos tan dispares, con el fin de evitar efectos no deseados en un protocolo clínico.

En el capítulo II, hemos observado que el bloqueo de la actividad de PKC α sensibiliza a la línea LM38-LP y su componente stem al tratamiento con ATRA, lo que disminuiría el fenotipo maligno.

Nos preguntamos entonces si este interesante punto de interacción entre el sistema retinoide y la PKC α , sería un punto de intervención terapéutica exitosa?

Observamos que el tratamiento combinado de ATRA con el inhibidor de PKC α fue capaz de disminuir la proliferación celular más eficientemente que cada tratamiento por separado en la línea LM38-LP. Para estudiar si este efecto se debe a una interacción sinérgica entre ambas drogas, utilizamos el test de Chou-Talalay[86] en el cual se estudia la forma en la que interaccionan dos o más drogas: sinérgica, aditiva o antagónicamente. Al realizar este test confirmamos la existencia de un efecto sinérgico.

Tratando de dilucidar el mecanismo por el cual el tratamiento combinado disminuía la proliferación celular de la línea LM38-LP, hemos analizado en primera instancia, la modulación del ciclo celular. El tratamiento con ATRA arresta a las células LM38-LP en la fase G1 del ciclo celular. Sin embargo, se evidenció un incremento de la fase sub G1, lo cual es compatible con necrosis o apoptosis. Esto se corrobora un ensayo de Anexina V. Los resultados no sólo nos permitieron comprobar que los tratamientos en forma separada indujeron apoptosis, sino que la combinación entre ATRA y Gö6976 tuvo un efecto sinérgico. Nos preguntamos entonces, si las dos poblaciones mayoritarias de la línea LM38-LP responden de manera diferencial a la inhibición del crecimiento, para lo cual hemos utilizado el marcador CD24 que nos permitía diferenciar entre células luminales y mioepiteliales [108], mediante citometría de flujo. Observamos que la población sensible al tratamiento con ATRA y/o el inhibidor farmacológico de PKC α fue solamente la luminal.

En la siguiente etapa hemos evaluado si el tratamiento combinado tiene efectos sobre distintos procesos vinculados a la diseminación metastásica: como son la migración celular y la secreción de MMP-2. Hemos observado que las únicas células con capacidad migratoria son las células mioepiteliales y que el tratamiento combinado disminuyo significativamente la migración celular de la

línea LM38-LP. Además ambos tratamientos lograron inhibir la actividad de MMP-2 secretada.

Los ligandos de los RARs regulan positivamente varios genes supresores de tumor y regulan negativamente la actividad de múltiples oncogenes, sin embargo estos efectos no siempre involucran genes cuyos promotores contienen secuencias RARE, de hecho los efectos transcripcionales independientes de RARE y ejercidos por los ligandos de los RARs, como el ATRA, pueden conducir a la senescencia celular y a la secreción de moléculas que de forma parácrina llevan a la inhibición del crecimiento, como ocurre en las células MCF-7 de carcinoma mamario [109].

Por esta razón nos hemos preguntado si la inhibición farmacológica de PKC α en combinación con ATRA modula los receptores retinoides y si esta modulación se correlaciona con los efectos biológicos observados hasta el momento. Efectivamente, los efectos biológicos modulados por la terapia combinada, que disminuyen el fenotipo maligno de la línea LM38-LP, se condicen con un panel de receptores retinoides compatible con la diferenciación y la inhibición del crecimiento, conservando niveles apreciables de RAR β en el componente LEP y observando una disminución importante de RAR γ tanto en las células LEP como en las MEP. Este resultado correlaciona con lo observado en el ensayo de migración, donde bajo el tratamiento combinado se aprecia una reducción significativa de la migración de las células mioepiteliales, lo que nos permite hipotetizar que el receptor retinoide RAR γ estaría en parte implicado en la capacidad migratoria de esta estirpe celular.

Luego nos focalizamos en el análisis del efecto de los distintos tratamientos sobre las células stem/progenitoras. Primero analizamos el efecto del tratamiento combinado sobre la diferenciación de las células stem/progenitoras. Hemos observado que en un contexto similar al fisiológico (cultivo en Matrigel) el pre-tratamiento con ATRA indujo a estas células a la formación de colonias de tipo “redonda”, con evidente presencia de lumen compatible con un fenotipo menos maligno, según la clasificación de Kenny y colaboradores [103]. Además, por inmunofluorescencia comprobamos que dichas colonias “redonda” estaban polarizadas en comparación al control. Por su parte, la inhibición farmacológica de PKC α dio lugar a colonias pequeñas, con fenotipo “redonda”. El pre-

tratamiento combinado llevó al desarrollo de un fenotipo de forma “redonda” pequeña pero sin lumen ni polarización. Este resultado correlaciona con resultados de nuestro grupo de trabajo, donde observamos que la actividad de PKC α es necesaria para la inducción de la vía genómica del ATRA [82], la cual media los efectos en la diferenciación celular [110].

Cuando estudiamos el efecto del tratamiento ATRA y/o el inhibidor de PKC α sobre las células capacidad de autorrenovación y clonogénica de las células stem/progenitoras, observamos que la inhibición farmacológica de PKC α , la autorrenovación y la capacidad clonogénica del componente stem. Estos resultados correlacionan con un trabajo donde demostraron que la inhibición de PKC α conduce a la disminución de las células stem tumorales mamarias, a través del bloqueo de la transición epitelio-mesenquimática [76]. Al analizar los efectos del tratamiento con ATRA, hallamos sorprendentemente que dicho tratamiento indujo un aumento tanto del número de mamoesferas secundarias, y por ende en la capacidad de las células stem de auto-renovarse, como así también de su capacidad clonogénica. Nuevamente nos encontramos ante una función, aparentemente dual, donde el efecto del ATRA sobre la monocapa es diferente que sobre las células stem. Podríamos decir entre las funciones que el sistema retinoide ejerce sobre las células, está el de preservar la identidad del componente stem que posee cada tejido y en este caso el tumor. Ante el desbalance o reducción del número de los componentes celulares que conformar esta entidad, la activación del sistema retinoide compromete a las células con potencial stem a autorrenovarse, quizá para recuperar o restaurar por diferenciación los componentes celulares perdidos. Al combinar dichos tratamientos, la inhibición farmacológica de PKC α fue capaz de bloquear los efectos inducidos por el ATRA sobre ambos parámetros.

Una posible explicación, es que el tratamiento con ATRA estuviera modulando en las células stem/progenitor receptores implicados en la auto-renovación y mantenimiento de dichas células, como lo es RAR γ [111]. Para ello, evaluamos como los distintos tratamientos modularon los niveles de los receptores retinoides en este componente celular de la línea LM38-LP. Así, hemos confirmado que el ATRA aumento tanto los niveles de RAR γ 2 como los de RAR β . De la misma manera que ocurría sobre los parámetros de auto-renovación y clonogenicidad de

las células stem bajo la terapia combinada, hemos apreciado que el aumento del receptor RAR γ inducido por ATRA, era bloqueado casi en su totalidad por la presencia de Gö6976.

A través del uso de antagonistas específicos tanto para RAR γ como para RAR β , hemos podido confirmar, que el receptor RAR γ sería el más implicado en la capacidad clonogénica y de auto-renovación de las células stem/progenitoras, lo cual concuerda con la bibliografía descrita sobre la función de RAR γ en el mantenimiento de la auto-renovación de las células hematopoyéticas[111]. Por otro lado, la inhibición de RAR β en combinación con el tratamiento con ATRA ha conducido a un aumento significativamente mayor de la capacidad de auto-renovación de las células stem/progenitoras, en comparación a lo observado con el tratamiento con ATRA. Este resultado, nos permite hipotetizar que el receptor RAR β estaría balanceando los efectos ejercidos por el receptor RAR γ sobre las células stem/progenitoras.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos hasta el momento, quisimos finalmente estudiar *in vivo* si el tratamiento combinado tenía un efecto sinérgico tanto sobre el crecimiento tumoral como sobre la diseminación metastásica en ratones portadores de un tumor LM38-LP ortotópico. Para ello, se simuló un protocolo clínico, donde los animales comenzaron a recibir los tratamientos al momento de tumor palpable, durante tres semanas. Observamos que el tratamiento combinado provocó una disminución significativamente mayor del volumen tumoral que cada tratamiento por separado, evidenciándose nuevamente un efecto sinérgico en la disminución del crecimiento tumoral. En cambio sólo el bloqueo de actividad de PKC α , inhibió casi por completo la diseminación metastásica. Estos resultados conjuntamente con lo observado sobre el bloqueo de la capacidad clonogénica de las células stem/progenitoras, por la sola inhibición de PKC α , concuerdan con lo descrito por otros autores, donde se describe que PKC α es un marcador de agresividad en cáncer de mama y de mal pronóstico[74]. Así, podríamos hipotetizar que las células capaces de dar metástasis espontáneas en la línea LM38-LP serían las células stem/progenitoras, siguiendo la nueva hipótesis de pensar a la célula stem tumoral como la semilla de la metástasis [112].

Finalmente, estudiamos la implicancia de la expresión de RAR β , RAR γ y PKC α , en la SLE de pacientes con cáncer de mama de subtipo basal y receptor de estrógeno negativo. Para ello, utilizamos una base de datos publica on-line con gráficos de Kaplan-Meier que contiene información de pacientes con cáncer de mama y sus perfiles de expresión génica [87]. Observamos que tanto la expresión de RAR γ como de PKC α no se asociaron con la SLE de los pacientes portadores de cáncer de mama con linfonodo negativo. En cambio, la expresión de RAR β se asoció significativamente con la SLE, siendo esta inversa de lo esperado, ya que altos niveles de expresión de este receptor se asoció una menor SLE de este grupo de pacientes. Este resultado en principio contradictorio podría relacionarse con publicaciones recientes en las que se ha reportado que RAR β también estaría implicado en promover la tumorigénesis mamaria mediante la inducción de la transición epitelio-mesenquimática, a través de la activación de Wnt1 [113]. Cuando analizamos la expresión RAR β , RAR γ y PKC α en simultáneo, observamos, que aunque la isoforma RAR β este expresada en altos niveles, si al mismo tiempo hay bajos niveles de RAR γ y PKC α , desaparece la correlación entre los altos niveles de expresión de RAR β con la menor sobrevida de este grupo de pacientes. Por otro lado, cuando analizamos la implicancia de la expresión RAR β , RAR γ y PKC α en la SLE de pacientes con cáncer de mama con linfonodo positivo, nos encontramos que bajos niveles de expresión de PKC α se asoció significativamente con una mayor SLE de este grupo de pacientes. Esto era de esperar ya que esta reportado que PKC α es un marcador de agresividad en cáncer de mama [74]. Al analizar la implicancia de RAR β en los pacientes con linfonodo positivo, observamos un efecto contrario a lo que sucede, ya que altos niveles de RAR β se asoció con una mayor SLE de este grupo de pacientes. Esto concuerda con numerosos trabajos donde se ha reportado al receptor RAR β como un supresor tumoral, especialmente la isoforma 2 del receptor (RAR β 2) [114-116]. Estos resultados muestran que RAR β podría tener un rol dual, estimulando o inhibiendo la carcinogénesis.

Cuando evaluamos la combinación de RAR β , RAR γ y PKC α , hallamos que altos niveles de expresión de RAR β en combinación con bajos niveles de expresión de RAR γ y PKC α se asociaron con una mayor SLF de este grupo de pacientes, en comparación con la obtenida RAR β y PKC α por separado. Si bien los resultados

obtenidos son promisorios, sería necesario realizar un análisis multivariado para determinar si la asociación de las moléculas con la SLE es independiente de otros parámetros indicadores de pronóstico en cáncer de mama como el estadio, el grado y tipo histológico.

CONCLUSIÓN:

Si bien el tratamiento con ATRA produce un efecto beneficioso sobre el tumor LM38-LP, a través de la inducción de RAR β (implicado en diferenciación celular), el arresto del ciclo celular, el aumento de la apoptosis, la inhibición de la migración y de la actividad de MMPs, la mayoría de estos efectos se ven altamente potenciados cuando se suma un inhibidor de PKC α a este tratamiento.

La terapia con ATRA como monodroga, produce un efecto beneficioso parcial sobre el componente stem/progenitor. Mientras retarda el crecimiento de estas células, por otro lado y a expensas del aumento de RAR γ , aumenta su capacidad de auto-renovación. Quizá esta sería la explicación de por qué en la clínica los tratamientos con ATRA, que han sido tan exitosos sobre los tumores líquidos (como PML), han fallado en curar al paciente con tumores sólidos como cáncer de mama. Sin embargo, la presencia del inhibidor farmacológico de PKC α en combinación con el ATRA inhibe casi en su totalidad la clonogenicidad de las células stem/progenitoras, además de anular la modulación positiva que el ATRA tenía sobre la expresión de RAR γ . Esta combinación es una nueva e interesante estrategia terapéutica que llegaría y tendría efecto sobre cada uno de los componentes celulares presente en el tumor.

Así, hemos demostrado que la terapia combinada produce la inhibición de la progresión tumoral en esta línea mamaria mixta, actuando en forma diferencial sobre cada uno de sus componentes celulares.

Estos resultados en su conjunto han sido corroborados con el estudio *in vivo*, donde la terapia combinada reduce en forma sinérgica el volumen tumoral y la diseminación metastásica y con un estudio *in silico* de la implicancia de la expresión de RAR β , RAR γ y PKC α en la SLE de pacientes con cáncer de mama,

donde observamos que altos niveles de expresión de RAR β en combinación con bajos niveles de expresión de RAR γ y PKC α se asociaron con una mayor SLE.

La modulación conjunta de vías de señalización y/o sistemas genómicos permitirían plantear nuevas terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer de mama o su quimoprevención. La combinación de retinoides con inhibidores de la isoforma alfa de PKC, podría constituir una novel opción terapéutica para pacientes con este tipo de patología, sobre todo en tumores con elevados niveles de expresión de PKC α .

BIBLIOGRAFÍA

1. Bal de Kier Joffe, E.D., Puricelli L. and Alonso D., *Biología tumoral. Claves celulares y moleculares del cáncer*. 2008: p. 176.
2. Kreeger, P.K. and D.A. Lauffenburger, *Cancer systems biology: a network modeling perspective*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 2-8.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Schirrmacher, V., *Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies*. Adv Cancer Res, 1985. **43**: p. 1-73.
6. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S244-75.
7. Ottewell, P.D., R.E. Coleman, and I. Holen, *From genetic abnormality to metastases: murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **96**(2): p. 101-13.
8. Fidler, I.J., *Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis*. Cancer Res, 1978. **38**(9): p. 2651-60.
9. Ribatti, D., G. Mangialardi, and A. Vacca, *Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination*. Clin Exp Med, 2006. **6**(4): p. 145-9.
10. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
11. Smith, A., *A Glossary for stem-cell biology*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1.
12. Liu, A., X. Yu, and S. Liu, *Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference*. Chin J Cancer, 2013. **32**(9): p. 483-7.
13. Heppner, G.H. and B.E. Miller, *Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences*. Cancer Metastasis Rev, 1983. **2**(1): p. 5-23.
14. McDermott, S.P. and M.S. Wicha, *Targeting breast cancer stem cells*. Mol Oncol, 2010. **4**(5): p. 404-19.
15. May, C.D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(1): p. 202.
16. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
17. Li, L. and W.B. Neaves, *Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4553-7.
18. Dave, B. and J. Chang, *Treatment resistance in stem cells and breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(1): p. 79-82.
19. Alberts, B., Johnson, A. and Lewis, J., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Publishing Group, Inc, 2002: p. 1345-1364.
20. Polyak, K., et al., *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest*. Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 9-22.
21. Larsson, L.G., *Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence*. Semin Cancer Biol, 2011. **21**(6): p. 367-76.
22. Casimiro, M.C., et al., *Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present*. Expert Opin Investig Drugs, 2014. **23**(3): p. 295-304.

23. Soto J. , K.E., *El ciclo celular y sus consecuencias no programadas*. TecnoVet, 2002. **8**.
24. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**: p. 87.
25. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
26. Amaravadi, R.K., et al., *Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(4): p. 654-66.
27. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
28. Jing, K. and K. Lim, *Why is autophagy important in human diseases?* Exp Mol Med, 2012. **44**(2): p. 69-72.
29. F, O.F., T.E. Rusten, and H. Stenmark, *Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy*. FEBS J, 2013. **280**(24): p. 6322-37.
30. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *The role of Atg proteins in autophagosome formation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 107-32.
31. Turcotte, S. and A.J. Giaccia, *Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 246-51.
32. White, E. and R.S. DiPaola, *The double-edged sword of autophagy modulation in cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5308-16.
33. Brech, A., et al., *Autophagy in tumour suppression and promotion*. Mol Oncol, 2009. **3**(4): p. 366-75.
34. Sosa, M.S., P. Bragado, and J.A. Aguirre-Ghiso, *Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(9): p. 611-22.
35. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
36. Berardi, D.E., et al., *Autophagy: friend or foe in breast cancer development, progression, and treatment*. Int J Breast Cancer, 2011. **2011**: p. 595092.
37. King, B.L. and S.M. Love, *The intraductal approach to the breast: raison d'etre*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(2): p. 206.
38. Sternlicht, M.D., *Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(1): p. 201.
39. Adriance, M.C., et al., *Myoepithelial cells: good fences make good neighbors*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(5): p. 190-7.
40. Bumaschny, V., et al., *Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(2): p. R116-29.
41. Watson, C.J. and W.T. Khaled, *Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment*. Development, 2008. **135**(6): p. 995-1003.
42. Ministerio de Salud de la Nación, *Análisis de la situación del cáncer en Argentina*. <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>, 2012.
43. Polyak, K., *Molecular alterations in ductal carcinoma in situ of the breast*. Curr Opin Oncol, 2002. **14**(1): p. 92-6.

44. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
45. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
46. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
47. Tang, P., K.A. Skinner, and D.G. Hicks, *Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready?* Diagn Mol Pathol, 2009. **18**(3): p. 125-32.
48. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
49. Sotiriou, C. and L. Pusztai, *Gene-expression signatures in breast cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 790-800.
50. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
51. Karn, T., et al., *Homogeneous datasets of triple negative breast cancers enable the identification of novel prognostic and predictive signatures*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28403.
52. Rakha, E.A., et al., *Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(7): p. 2302-10.
53. Bosch, A., et al., *Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research*. Cancer Treat Rev, 2010. **36**(3): p. 206-15.
54. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R68.
55. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Mol Oncol, 2011. **5**(1): p. 5-23.
56. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
57. *Pautas en oncología. Diagnóstico, tratamiento y seguimiento del cáncer*. Instituto de Oncología Angel H. Roffo, 2015.
58. Dey, D., et al., *Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5329.
59. Wright, M.H., et al., *Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(1): p. R10.
60. Guo, W., et al., *Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state*. Cell, 2012. **148**(5): p. 1015-28.
61. Vargo-Gogola, T. and J.M. Rosen, *Modelling breast cancer: one size does not fit all*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 659-72.
62. Berardi, D.E., et al., *Myoepithelial and luminal breast cancer cells exhibit different responses to all-trans retinoic acid*. Cell Oncol (Dordr), 2015. **38**(4): p. 289-305.
63. Duong, V. and C. Rochette-Egly, *The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(8): p. 1023-31.

64. Bastien, J. and C. Rochette-Egly, *Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes*. Gene, 2004. **328**: p. 1-16.
65. Niles, R.M., *Biomarker and animal models for assessment of retinoid efficacy in cancer chemoprevention*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(9): p. 1383-91.
66. Tang, X.H. and L.J. Gudas, *Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 345-64.
67. Bushue, N. and Y.J. Wan, *Retinoid pathway and cancer therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(13): p. 1285-98.
68. Urtreger, A.J., M.G. Kazanietz, and E.D. Bal de Kier Joffe, *Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression*. IUBMB Life, 2012. **64**(1): p. 18-26.
69. Persons, D.A., et al., *Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA*. Cell, 1988. **52**(3): p. 447-58.
70. Watanabe, T., et al., *Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10159-63.
71. Vucenik, I., et al., *Inositol hexaphosphate (IP6) blocks proliferation of human breast cancer cells through a PKCdelta-dependent increase in p27Kip1 and decrease in retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **91**(1): p. 35-45.
72. Yokoyama, G., et al., *PKCdelta and MAPK mediate G(1) arrest induced by PMA in SKBR-3 breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(3): p. 720-6.
73. Jackson, D.N. and D.A. Foster, *The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 627-36.
74. Lonne, G.K., et al., *PKCalpha expression is a marker for breast cancer aggressiveness*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 76.
75. Hsu, Y.H., et al., *Definition of PKC-alpha, CDK6, and MET as therapeutic targets in triple-negative breast cancer*. Cancer Res, 2014. **74**(17): p. 4822-35.
76. Tam, W.L., et al., *Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells*. Cancer Cell, 2013. **24**(3): p. 347-64.
77. Cho, Y., A.P. Tighe, and D.A. Talmage, *Retinoic acid induced growth arrest of human breast carcinoma cells requires protein kinase C alpha expression and activity*. J Cell Physiol, 1997. **172**(3): p. 306-13.
78. Carter, C.A., G.P. Parham, and T. Chambers, *Cytoskeletal reorganization induced by retinoic acid treatment of human endometrial adenocarcinoma (RL95-2) cells is correlated with alterations in protein kinase C-alpha*. Pathobiology, 1998. **66**(6): p. 284-92.
79. Kambhampati, S., et al., *Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32544-51.
80. Kahl-Rainer, P. and B. Marian, *Retinoids inhibit protein kinase C-dependent transduction of 1,2-diglyceride signals in human colonic tumor cells*. Nutr Cancer, 1994. **21**(2): p. 157-68.
81. Ochoa, W.F., et al., *Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C(alpha)*. Biochemistry, 2003. **42**(29): p. 8774-9.

82. Berardi, D.E., et al., *Involvement of protein kinase C alpha and delta activities on the induction of the retinoic acid system in mammary cancer cells*. Mol Carcinog, 2014.
83. Zelent, A., *PCR cloning of N-terminal RAR isoforms and APL-associated PLZF-RAR alpha fusion proteins*. Methods Mol Biol, 1998. **89**: p. 307-32.
84. Zhang, L., et al., *Overexpression Nanog activates pluripotent genes in porcine fetal fibroblasts and nuclear transfer embryos*. Anat Rec (Hoboken), 2011. **294**(11): p. 1809-17.
85. Qiu, S., et al., *Migration of retinal pigment epithelium cells is regulated by protein kinase Calpha in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(10): p. 7082-90.
86. Chou, T.C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 440-6.
87. Gyorffy, B., et al., *An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(3): p. 725-31.
88. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
89. Wu, Y.T., et al., *Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase*. J Biol Chem, 2010. **285**(14): p. 10850-61.
90. Todaro, L.B., et al., *A clinically relevant bi-cellular murine mammary tumor model as a useful tool for evaluating the effect of retinoic acid signaling on tumor progression*. Breast Cancer, 2013. **20**(4): p. 342-56.
91. Viniegra, M.P., M. Arrossi, S., *Cancer de mama en Argentina. organizacion cobertura y calidad de las acciones de prevencion y control. Imforme final Julio 2010. OPS/OMS en Argentina, 2010*.
92. Woodward, W.A., et al., *On mammary stem cells*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p. 3585-94.
93. Rizvi, A.Z. and M.H. Wong, *Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home*. Stem Cells, 2005. **23**(2): p. 150-65.
94. Urtreger, A.J., et al., *Atypical protein kinase C-zeta modulates clonogenicity, motility, and secretion of proteolytic enzymes in murine mammary cells*. Mol Carcinog, 2005. **42**(1): p. 29-39.
95. Oliva, J.L., E.M. Griner, and M.G. Kazanietz, *PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors*. Growth Factors, 2005. **23**(4): p. 245-52.
96. Okuwa, H., et al., *Sphingosine suppresses mesothelioma cell proliferation by inhibiting PKC-delta and inducing cell cycle arrest at the G(0)/G(1) phase*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(4): p. 995-1004.
97. Brown, N.E., et al., *Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium*. Cancer Res, 2012. **72**(24): p. 6477-89.
98. Stacey, D.W., *Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 158-63.
99. Huang, C., et al., *Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H570-9.
100. Gonnella, R., et al., *PKC theta and p38 MAPK activate the EBV lytic cycle through autophagy induction*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(7): p. 1586-95.

101. Kumar, D., S. Shankar, and R.K. Srivastava, *Rottlerin-induced autophagy leads to the apoptosis in breast cancer stem cells: molecular mechanisms*. Mol Cancer, 2013. **12**(1): p. 171.
102. Chu, W.K., et al., *Nanog expression is negatively regulated by protein kinase C activities in human cancer cell lines*. Carcinogenesis, 2013. **34**(7): p. 1497-509.
103. Kenny, P.A., et al., *The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression*. Mol Oncol, 2007. **1**(1): p. 84-96.
104. Tarin, D., *Update on clinical and mechanistic aspects of paraneoplastic syndromes*. Cancer Metastasis Rev, 2013. **32**(3-4): p. 707-21.
105. Gong, C., et al., *Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells*. Oncogene, 2013. **32**(18): p. 2261-72, 2272e 1-11.
106. Wolf, J., et al., *A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(6): p. R109.
107. Hamaï, A., et al., *Autophagy and cancer stem cells or tumor-initiating cells in human breast cancer*. Frontiers in Pharmacology.
108. Sleeman, K.E., et al., *CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(1): p. R7.
109. Chen, Y., et al., *Agonist and antagonist of retinoic acid receptors cause similar changes in gene expression and induce senescence-like growth arrest in MCF-7 breast carcinoma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8749-61.
110. Gudas, L.J. and J.A. Wagner, *Retinoids regulate stem cell differentiation*. J Cell Physiol, 2011. **226**(2): p. 322-30.
111. Purton, L.E., et al., *RARgamma is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1283-93.
112. Velasco-Velazquez, M.A., et al., *The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications*. Am J Pathol, 2011. **179**(1): p. 2-11.
113. Liu, X. and V. Giguere, *Inactivation of RARbeta inhibits Wnt1-induced mammary tumorigenesis by suppressing epithelial-mesenchymal transitions*. Nucl Recept Signal, 2014. **12**: p. e004.
114. Jones, L.C., et al., *RARbeta2 is a candidate tumor suppressor gene in myelofibrosis with myeloid metaplasia*. Oncogene, 2004. **23**(47): p. 7846-53.
115. Jiang, A., et al., *Curcumin Reactivates Silenced Tumor Suppressor Gene RARbeta by Reducing DNA Methylation*. Phytother Res, 2015. **29**(8): p. 1237-45.
116. Moison, C., et al., *Synergistic chromatin repression of the tumor suppressor gene RARB in human prostate cancers*. Epigenetics, 2014. **9**(4): p. 477-82.