



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Inhibidores de ciclo celular y terapia endócrina
en carcinomas mamarios con distinta proporción de
isoformas de receptores de progesterona**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Gabriela Pataccini

Directora de tesis: Claudia Lanari

Director adjunto: Sebastián Giulianelli

Consejera de estudios: Edith Kordon

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)

Buenos Aires, 17 de Julio de 2023

Contenido

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
ABREVIATURAS.....	10
AGRADECIMIENTOS.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CÁNCER DE MAMA	14
RECEPTOR DE PROGESTERONA	14
Isoformas de PR	14
Mecanismo de acción de Pg/PR	16
Señalización de PR en la mama normal	19
PR y su implicancia en cáncer de mama	20
CICLO CELULAR	22
Generalidades	22
Activación y progresión del ciclo celular	23
Regulación del ciclo celular.....	24
HORMONAS Y CICLO CELULAR	26
Receptores hormonales y ciclo celular	26
Progestágenos y ciclo celular.....	26
Antiprogestágenos y ciclo celular	27
Tratamientos para el Cáncer de mama luminal	29
Terapia endócrina antiestrogénica.....	29
Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas	30
Antiprogestágenos.....	32
XENOTRANSPLANTES DERIVADOS DE PACIENTES (PDX).....	33

Generalidades	33
Ratones utilizados	34
PDX de cáncer de mama	35
Sitio de implante	36
Suplementación con estradiol	36
Similitud paciente-PDX	36
Aplicaciones	37
Limitaciones del modelo	37
<i>Breast cancer tissue culture: BCTC</i>	38
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	39
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVO GENERAL	40
Objetivo específico 1	40
Objetivo específico 2	41
Objetivo específico 3	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR	43
MANEJO DE CÉLULAS.....	43
ENSAYOS DE <i>WESTERN BLOT</i> (WB).....	45
ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA	47
ENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNm	48
ENSAYO DE CHIP	50
ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	52
ANIMALES NSG	52
ANIMALES BALB/c.....	52

MODELOS TUMORALES MURINOS	52
INOCULACIÓN DE LÍNEAS CELULARES Y TUMORES MURINOS.....	54
TRATAMIENTOS	54
PROCEDIMIENTOS REALIZADOS EN LOS ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	54
INMUNOHISTOQUÍMICA	55
Preparación de extractos tumorales	56
DESARROLLO DEL BIOBANCO DE MODELOS DE PDX DE CaM.....	57
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	57
SEGUIMIENTO DE LOS RATONES	58
CARACTERIZACIÓN DEL PDX	59
ENSAYOS TERAPÉUTICOS <i>IN VIVO</i>	60
ENSAYOS TERAPÉUTICOS <i>EX VIVO</i>	61
MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	62
RESULTADOS	63
1) GENERACIÓN DEL BIOBANCO PDX.....	64
Características de las pacientes.....	65
Crecimiento de los PDX.....	69
Características morfológicas: PDX vs. tumor parental	73
Expresión de biomarcadores: PDX vs. tumor parental.....	79
Análisis de alteraciones genómicas: <i>Whole exome sequencing (WES)</i>	81
Sensibilidad a tratamientos estándares	86
Conclusiones del capítulo de PDX.....	92
2) SENSIBILIDAD A LA TERAPIA COMBINADA CON ICDK4/6 Y ANTIPROGESTÁGENOS EN MODELOS DE CAM DEL SUBTIPO LUMINAL.....	93
Modelo PDX-685.....	93

Modelo murino	95
Modelo CDX	103
3) ESTUDIO DEL MECANISMO ASOCIADO AL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA TERAPIA COMBINADA DE MFP Y PALBO: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	106
Efecto de la terapia combinada sobre la proliferación celular.....	106
Efecto de la terapia combinada sobre los niveles de pRB y E2F1	107
Efecto de la terapia combinada sobre la expresión génica de <i>E2F1</i>	111
Efecto de la terapia con MFP sobre el reclutamiento de PR, AIB1 y SMRT en una región regulatoria del gen <i>E2F1</i>	112
Efecto de PALBO sobre los niveles de PR	114
Conclusiones del capítulo DE terapia combinada	116
DISCUSIÓN.....	117
Sección “Biobanco de PDX”	118
Sección “Terapia combinada”	123
CONCLUSIÓN GENERAL	130
APÉNDICE.....	131
MANEJO DE CÉLULAS.....	131
ENSAYOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	132
ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA	134
ENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNm	134
ENSAYO DE CHIP	135
INMUNOHISTOQUÍMICA	135
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS TUMORALES	135
TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PDX	136
BIBLIOGRAFÍA	137

RESUMEN

Aproximadamente el 70% de los carcinomas mamarios (CaM) expresan receptores de estrógeno (ER) y de progesterona (PR) y se tratan con terapia endócrina sola o en combinación con, por ejemplo, inhibidores de ciclo celular (iCDK4/6). Sin embargo, un alto porcentaje recae, por lo que es importante desarrollar nuevos agentes terapéuticos y mejorar los criterios para elegir a las pacientes que pueden responder a las distintas terapias.

En el laboratorio hemos demostrado que los antiprogestágenos inhiben el crecimiento de tumores de CaM que expresan mayores niveles de isoforma A de PR (PRA) que de PRB, denominados PRA-H. Postulamos que la administración conjunta de iCDK4/6 (palbociclib, PALBO) y antiprogestágenos (mifepristona, MFP) es beneficiosa para el tratamiento de tumores luminales PRA-H. En este trabajo de tesis nos propusimos: **a)** Desarrollar un Biobanco de PDX de CaM humano para contar con modelos fidedignos de la enfermedad y que estén disponibles para la comunidad científica, **b)** Estudiar el efecto de la combinación de MFP y PALBO en el crecimiento tumoral de distintos modelos de CaM, **c)** Investigar el mecanismo molecular asociado al efecto terapéutico del tratamiento combinado haciendo foco en la regulación del eje RB-E2F.

En este trabajo de tesis se estableció un total de 8 PDX de CaM: 2 luminales, 1 HER2+ y 5 triples negativos. Los PDX mantuvieron la expresión de marcadores con respecto al tumor parental. Se realizó una secuenciación para caracterizar el exoma de los PDX. Se evaluó *in vivo* y *ex vivo* la respuesta a distintas drogas elegidas según el subtipo tumoral de cada PDX. En particular, se evaluó *in vivo* la sensibilidad a PALBO y a MFP en el PDX luminal ER+ PRA-H, donde los tratamientos simples inhibieron el crecimiento tumoral.

En modelos experimentales murinos sensibles a MFP y a PALBO, se demostró un efecto terapéutico beneficioso al combinar ambos fármacos. En células T47D y sus variantes T47D-YA e -YB, que expresan solo PRA o PRB respectivamente, se demostró que las 3 variantes son sensibles a PALBO, pero la combinatoria con MFP fue eficiente

solo en las células que expresan PRA. El efecto inhibitorio de la proliferación celular estuvo asociado a una disminución de los niveles de pRB y de E2F1. Por último, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en las células T47D-YA. Observamos que el tratamiento con MFP aumenta el reclutamiento de PRA sobre regiones regulatorias del gen *E2F1*, demostrando una regulación directa del antiprogéstágeno sobre dicho gen.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis muestran que MFP disminuye los niveles de fosforilación de RB y la expresión de E2F1 en modelos de CaM que expresan altos niveles de PRA, existiendo una convergencia a este nivel con los iCDK4/6. Esto sugiere la posibilidad de utilizar combinaciones de ambos compuestos a bajas dosis para tratar pacientes con tumores PRA>PRB, con el fin de disminuir los efectos secundarios de los iCDK4/6.

Palabras clave: Cáncer de mama, antiprogéstágenos, inhibidores de ciclo celular, eje RB-E2F, isoformas del receptor de progesterona

ABSTRACT

Cell cycle inhibitors and endocrine therapy in breast tumors with different progesterone receptor isoforms ratio

Approximately 70% of breast carcinomas (BC) express estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) and are treated with endocrine therapy alone or in combination with other therapies, such as cell cycle inhibitors (iCDK4/6). However, a high percentage of patients relapse. Thus, it is important to develop new therapeutic agents and improve the criteria for choosing patients who benefit from different therapies.

Previously, we have shown that antiprogestins inhibit BC growth of tumor portraying higher levels of PR isoform A (PRA) than of PRB, called PRA-H. We postulate that co-administration of iCDK4/6 (palbociclib, PALBO) and antiprogestins (mifepristone, MFP) is beneficial for the treatment of PRA-H luminal tumors. In this thesis work we proposed to; **a)** develop a PDX Biobank of human BC to establish reliable models of the disease available for the scientific community, **b)** study the effect of the combined treatment of MFP and PALBO on tumor growth in different BC models, and **c)** study the molecular mechanisms associated with the therapeutic effect of the combined treatment focusing on the regulation of the RB-E2F1 axis.

A total of eight BC PDX were established: 2 luminal, 1 HER2+, and 5 triple negatives. All PDX maintained the marker expression reported in the parental tumors. Exome sequencing was performed and the response to different drugs, chosen according to each PDX tumor subtype, was evaluated *in vivo* and *ex vivo*. We specifically evaluated the sensitivity to MFP and PALBO in the luminal PDX ER+ PRA-H *in vivo*. Both single treatments inhibited tumor growth. In experimental mouse models, a beneficial therapeutic effect was demonstrated with the combined treatment in tumors sensitive to MFP and PALBO. T47D cells and their variants T47D-YA and -YB, which express only PRA or PRB respectively, were sensitive to PALBO. The combined treatment was efficient only in cells that express PRA. The inhibitory effect on cell proliferation was associated with a decrease in pRB and E2F1 levels. Lastly, chromatin immunoprecipitation assays

(ChIP) performed in T47D-YA, showed that MFP treatment increases PRA recruitment to specific regulatory regions in the *E2F1* gene, demonstrating a direct regulation of antiprogestins on E2F1.

The results presented in this thesis show that MFP inhibits RB phosphorylation and E2F1 levels in PRA>PRB BC models, with a convergence at this level with iCDK4/6. This suggests the possibility of using low-dose combinations of both compounds to treat patients who express higher levels of PRA than PRB, decreasing the side effects of iCDK4/6.

Keywords: Breast cancer, antiprogestins, cell cycle inhibitors, RB-E2F axis, progesterone receptor isoforms

ABREVIATURAS

AI: inhibidor de aromatasa

antipg: antiprogestágeno

BCTC: breast cancer tissue culture (cultivo de tejido de cáncer mamario)

CaM: cáncer de mama

CDKi: inhibidor de CDK

CDK: cyclin-dependet kinase (quinasa dependiente de ciclinas)

CP: cilindro de plástico

DOXO: doxorubicina

E2: estradiol

ER α : receptor de estrógenos α

ET: terapia endócrina

FGF2: factor de crecimiento fibroblástico 2

FT: factor de transcripción

FULVE: fulvestrant

HER2: factor de crecimiento epidérmico 2

iCDK4/6: inhibidores de CDK4/6

MFP: mifepristona

MPA: acetato de medroxiprogesterona

NSG: non-obese diabetic-scid y NOD.Cg-Prkdc scid Il2rg tm1Wjl /SzJl

P0,1, etc.: pasaje 0, 1, etc.

PAX: paclitaxel

PDX: patient derived xenograft (xenotransplante derivado de pacientes)

PFS: progresión libre de enfermedad

Pg: progesterona

PR: receptor de progesterona

PRA: receptor de progesterona isoforma A

PRA-H: carcinoma mamario que expresa mayores niveles de PRA que de PRB

PRB: receptor de progesterona isoforma B

PRE: progesterone responsive element (sitios respondedores a progesterona)

PTM: modificaciones post traduccionales

RB: proteína retinoblastoma

RH: receptores hormonales

sc: subcutáneo

SERD: degradador selectivo del receptor de estrógenos

SERM: modulador selectivo del receptor de estrógenos

TAM: tamoxifeno

TDM1: trastuzumab emtansine

TN: triple negativo

TZ: trastuzumab

WB: western blot

AGRADECIMIENTOS

Agradezco haber elegido el laboratorio de Carcinogénesis para realizar mi doctorado, porque tuve la suerte de encontrar una directora que además de ser impecable científicamente, es una persona que desea lo mejor y te ayuda a conseguirlo,

En frente de Claudia, encontré a Caro que enseña qué es una buena ciencia y es una compañera más cuando es necesario,

Seba, que aún en la distancia supo acompañarme y guiarme en experimentos

Ani, con sus correcciones tan dedicadas ♥

Encontré amiguis, que fueron super compañeros y que hicieron que todo sea más colorido. ♥Virgi, Ceci, Sol, Jime, Flor, Andrés, Noe y Karen ♥

A Vicki, Pao, Colo, Virgi, Pipi, Marina, Luisa y Leo ♥

A Silvia por prestarnos un ojo

A Naty y Yani por siempre cuidar de nuestros ratoncitos

Gracias a mis amigas de siempre ♥

Gracias a mi familia, mis hermanas y hermano, mis viejis y la bebita más hermosa de los bálticos que extraño todos los días ♥

INTRODUCCIÓN

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CaM) es el cáncer de mayor incidencia y la primera causa de muerte en mujeres (Sung et al., 2021). Ha sido clasificado en los siguientes subtipos moleculares, *luminal A*: receptor de estrógenos α (ER α) y receptor de progesterona (PR) positivo, bajo índice de proliferación y factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) negativo; *luminal B*: ER α positivo con menor expresión de PR que el luminal A o PR negativo, con alta tasa de proliferación y con sobreexpresión ocasional de HER2; *HER2 positivo*: ER α negativo, PR negativo y sobreexpresión de HER2; *Basal*: incluye a los tumores triples negativos (TN) y a los tumores con baja expresión de Claudinas (Perou et al., 2000; Prat & Perou, 2011).

Hoy en día, los niveles de PR se utilizan en la clínica para evaluar la funcionalidad del ER α . Sin embargo, existe amplia evidencia de que el PR está involucrado en el desarrollo del CaM. Además, un alto porcentaje de pacientes no responde a la terapia antiestrogénica desde un principio (resistencia constitutiva) o adquiere resistencia a la terapia con el tiempo (resistencia adquirida). Por todo esto proponemos al **RECEPTOR DE PROGESTERONA**, aún no explotado en la clínica, como un blanco terapéutico para el tratamiento del CaM. Además, buscamos drogas que, en combinación con tratamientos dirigidos al PR, potencien el efecto terapéutico final.

RECEPTOR DE PROGESTERONA

Isoformas de PR

La proteína PR está codificada por el gen *PGR*, localizado en el cromosoma 11. Su expresión está regulada por promotores que producen principalmente dos transcritos que dan lugar a dos proteínas de diferente tamaño: PR isoforma B (PRB, 116 kDa) y PR isoforma A (PRA, 94 kDa). El transcrito completo está controlado por el promotor distal de PRB y utiliza el primer codón AUG para el inicio de la traducción, mientras que PRA está controlado por el promotor proximal, y su traducción inicia en el segundo codón AUG.

PRA y PRB son miembros de la familia de los receptores esteroides y comparten estructuras y dominios con otros receptores hormonales (RH). El dominio de unión al ADN, la región bisagra y el dominio de unión al ligando son idénticos en PRA y PRB. La actividad funcional de ambos receptores está mediada por los dominios de activación (AF), que proveen un lugar de anclaje para los corre reguladores de la transcripción. Los receptores se diferencian en el extremo N-terminal: los primeros 164 aminoácidos en el N-terminal de PRB están ausentes en PRA. Esta región, presente únicamente en PRB, media una función de transactivación que contribuye a la unión diferencial de cofactores y a las distintas propiedades de las dos isoformas [revisado (Patel et al., 2015); **Figura I-1**].

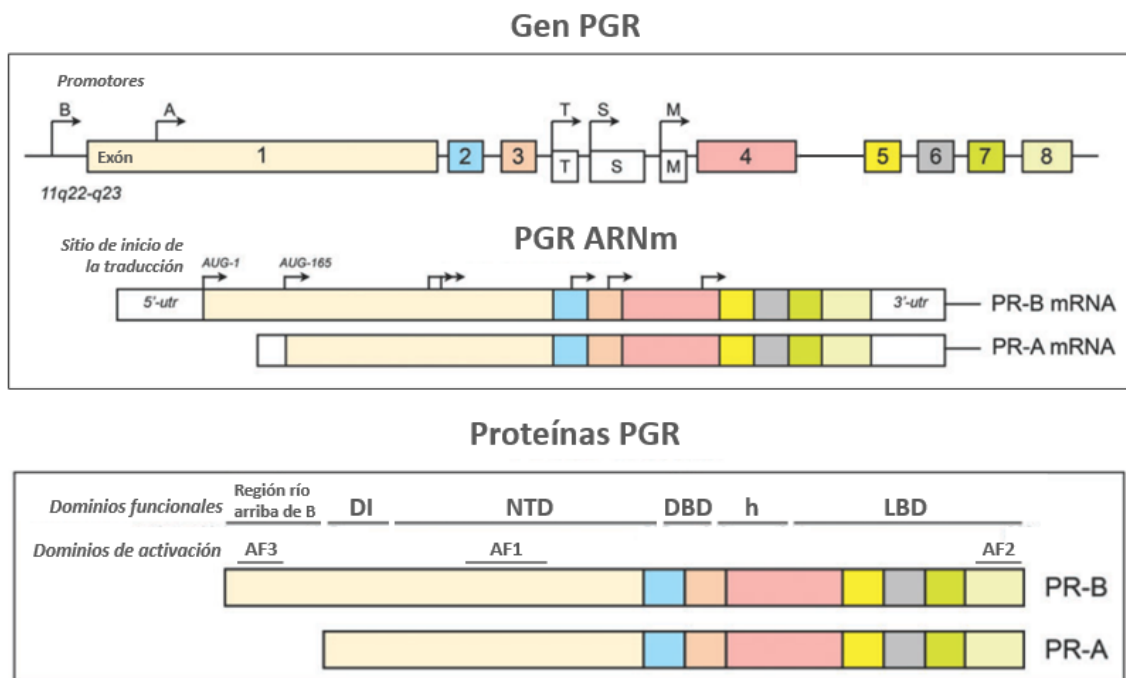


Figura I-1. Estructura de las dos isoformas de PR producidas a partir del gen PGR. La transcripción está bajo la regulación del promotor B y el promotor A, que producen dos transcritos que solo difieren en los primeros 164 aminoácidos. Dominio inhibitorio (DI), dominio amino-terminal (NTD), dominio de unión al ADN (DBD), dominio de unión al ligando (LBD) y región bisagra (h). Adaptado de (Patel et al., 2015).

Mecanismo de acción de Pg/PR

Los RH ejercen su acción como factores de transcripción (FT) y como moléculas traductoras de señales. En particular, PR funciona a nivel transcripcional (vía genómica) y también activa vías de traducción de señales (vía no genómica) asociadas, en su mayoría, a cascadas pro-proliferativas en la glándula mamaria.

♥ *Vía genómica*

La respuesta biológica a la progesterona (Pg) está dada por la combinación de las acciones de PRA y PRB. La vía clásica de acción de PR involucra la unión al ligando en el citoplasma, que induce fosforilaciones que lo liberan de las chaperonas, responsables de su estabilidad en dicho compartimento. Una vez liberado, el receptor dimeriza, trasloca al núcleo y modula la expresión de sus genes blanco. Los promotores de dichos genes suelen presentar sitios respondedores a la Pg (sitios PRE), que son secuencias consenso específicas de ADN donde PR es reclutado luego de su activación. Los homodímeros y heterodímeros tienen distintas actividades transcripcionales sobre grupos específicos de promotores [revisado en (Patel et al., 2015; **Figura I-2**).

En la línea celular humana T47D modificada para que solo exprese PRA o PRB, T47D-YA y T47D-YB, respectivamente (Sartorius et al., 1994), se vio que PRB controla la mayoría de los genes blancos de Pg (65%), mientras que PRA regula solo un 4% y el 24% depende de ambas isoformas (Richer et al., 2002). Por lo tanto, PRB funciona como un activador transcripcional fuerte, mientras que PRA es transcripcionalmente débil y funciona como un represor ligando-dependiente de la actividad transcripcional de PRB, especialmente cuando PRA>PRB. Aunque el mecanismo preciso por el cual PRA transreprime no está del todo entendido, ambas isoformas presentan el mismo dominio inhibitorio, pero solo es activo en PRA. Esto sugiere que las isoformas tienen conformaciones estructurales diferentes y que el dominio inhibitorio es funcional solo en PRA porque se asocia a un *set* específico de cofactores, distinto a los de PRB. Por ejemplo, se describió que PRA tiene mayor afinidad por el correpressor SMRT, y que esta interacción está facilitada por el dominio inhibitorio. Así mismo, PRA es incapaz de reclutar los coactivadores GRIP1 y SRC-1, a diferencia de PRB (Giangrande et al., 2000). Estas observaciones llevan al concepto de que PRA y PRB tienen actividades

transcripcionales opuestas, y que la respuesta neta a la Pg está dada por las abundancias relativas de las isoformas. Este mecanismo permite el control de la respuesta a la Pg en la célula blanco a través de la modulación de los niveles de cada una de las isoformas.

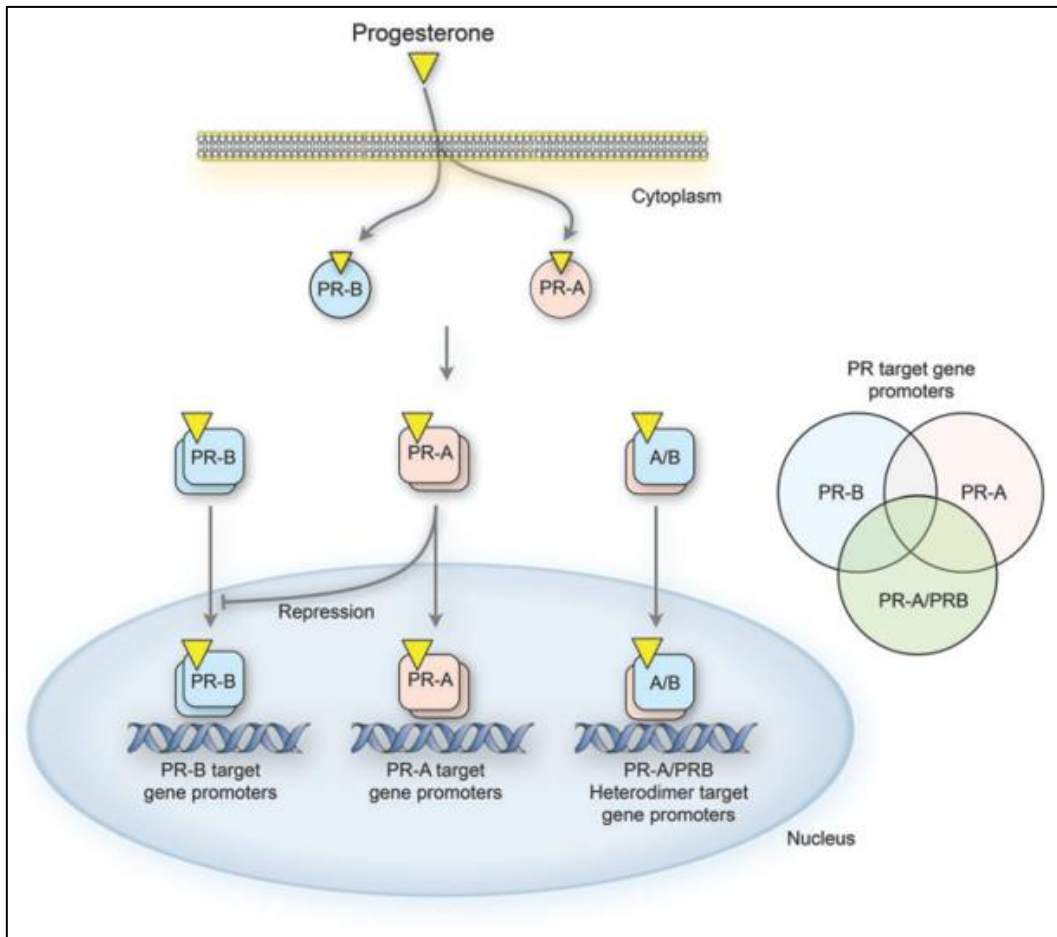


Figura 1-2. Interacciones funcionales de PRA y PRB. Luego de la unión al ligando, los receptores forman homo y heterodímeros, los cuales modulan la expresión de genes específicos en el núcleo. Extraído de (Patel et al., 2015).

La Pg puede tener efectos opuestos de acuerdo al tejido blanco y su contexto celular. Por ejemplo, los progestágenos son mitogénicos en la glándula mamaria, pero inhibitorios de la proliferación celular en el útero y los ovarios; las bases de esta divergencia son todavía desconocidas. El potencial pleiotrópico de la Pg/PR, se ve afectado de forma célula- y contexto-dependiente, siendo los siguientes factores los que determinan la acción final:

- Correguladores: la unión con coactivadores o correpresores es esencial para la modulación de PR sobre la transcripción de genes, llevando a la activación o

represión de ciertos genes blanco. Por ejemplo, SRC-1 es una quinasa con función de activador transcripcional de PR (Jafari et al., 2022).

- Interacción de PR con otros FT: el PR puede interactuar con otros FT como AP1, NFkB, STAT5 y SP1 para regular genes sin sitios PRE (Faivre et al., 2008; Subtil-Rodriguez et al., 2008; Truong & Lange, 2018).
- Modificaciones post traduccionales (PTM): la fosforilación de serinas, acetilación, ubiquitinación y sumoylación son modificaciones que regulan la función de PR afectando la sensibilidad hormonal, la selectividad de promotores génicos, el *turnover*, la estabilidad, el tráfico nuclear y la actividad transcripcional. Por lo tanto, distintas señales hormonales permiten a las células responder de múltiples maneras mediante la variación combinatoria de estas PTM que, a su vez, suelen ser ligando-dependiente, como así también independientes de ligando a través de proteínas quinastas [revisado en (Daniel et al., 2010; Grimm et al., 2016; Patel et al., 2016); **Figura I-3**].

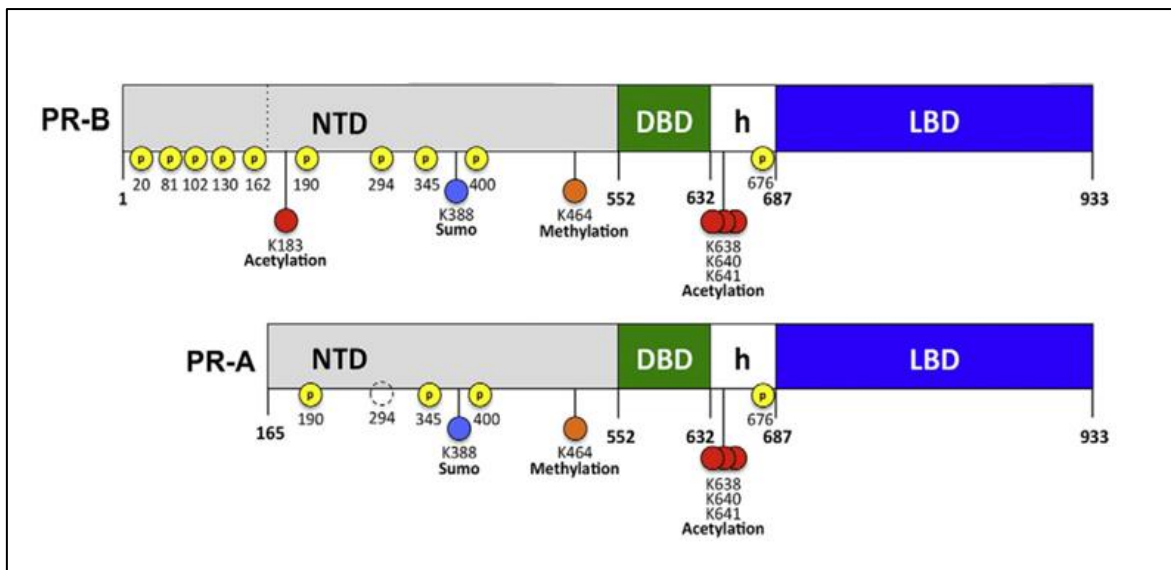


Figura I-3. Regiones sensibles a modificaciones post traduccionales. Dominio de unión al ligando (LBD), dominio de unión al ADN (DBD), dominio amino-terminal (NTD), y residuos de serina capaces de fosforilarse (p). Extraído de (Daniel et al., 2010; Grimm et al., 2016; Patel et al., 2016).

♥ *Vía no genómica*

Los PR extranucleares son capaces de realizar una rápida activación de quinastas (MAPK, PI3K/Akt y c-Src), luego del tratamiento con progestágenos (Boonyaratanakornkit et al., 2001). A pesar de que las acciones no genómicas de PR se

consideran funcionalmente independientes de las genómicas, los receptores nucleares y citoplasmáticos son probablemente parte de la misma población dinámica. En respuesta a estímulos hormonales, los PR que se encuentran transientemente cerca de la membrana, activan a quinasas. Las quinasas activadas fosforilan sustratos cercanos (otros PR, correguladores). Esto se resume en complejos conteniendo RH, correguladores y moléculas de señalización (quinasas), que traslocan al núcleo para asociarse con regiones regulatorias del ADN y así activar o inhibir la expresión génica. En general, la señalización de las quinasas es un mecanismo que permite seleccionar promotores específicos. Esta es una faceta importante de PR y explica por qué la firma molecular de PR cambia entre células epiteliales normales y neoplásicas: bajo la influencia de ciertas vías comúnmente activadas en células neoplásicas mamarias, cambia la señalización de PR y, por ende, la selección de promotores, lo que resulta en una biología celular/tumoral alterada (Daniel et al., 2011).

Asimismo, hay que sumarle a esta regulación que ambas isoformas de PR también actúan de forma ligando-independiente, ampliando el abanico de respuestas dependiendo del contexto. La activación de PR ligando-independiente ha sido propuesta como un factor que contribuye a la hormono-independencia (Giulianelli et al., 2008; Hagan et al., 2011).

Señalización de PR en la mama normal

Durante la pubertad, cuando los niveles de Pg son bajos y existe una alta expresión de PR en la glándula mamaria, Pg regula los nichos de las células *stem*. Por otro lado, el estradiol (E2) induce una rápida elongación de los conductos mamarios. En esta etapa, los ductos llegan hasta el extremo de la almohadilla de grasa (*fat pad*), en donde se forman los brotes terminales (**Figura I-4.1**). Durante el ciclo menstrual, el aumento de la Pg durante la fase lútea se asocia con un alto índice proliferativo de las células epiteliales de los conductos mamarios que resulta en ramificaciones laterales. Es interesante que, durante dicha fase, la Pg tiene un efecto contrario (antiproliferativo y diferenciador) en el útero. Estudios con ratones *knockout* demostraron que PRB, más que PRA, es necesario para la ramificación de los conductos (**Figura I-4.2**), mientras que PRA es necesaria para la función uterina. El tercer rol fisiológico de PR ocurre durante el

último trimestre del embarazo, en donde participa en la alveogénesis (diferenciación de las células epiteliales en células secretoras de leche) y es requerido PRA (Figura I-4.3). Las funciones diferenciales de PR muestran las funciones contexto-dependientes de ambas isoformas en el epitelio mamario, sin embargo, los mecanismos subyacentes aún son desconocidos [revisado en (Briskin, 2013; Briskin & Scabia, 2020)].

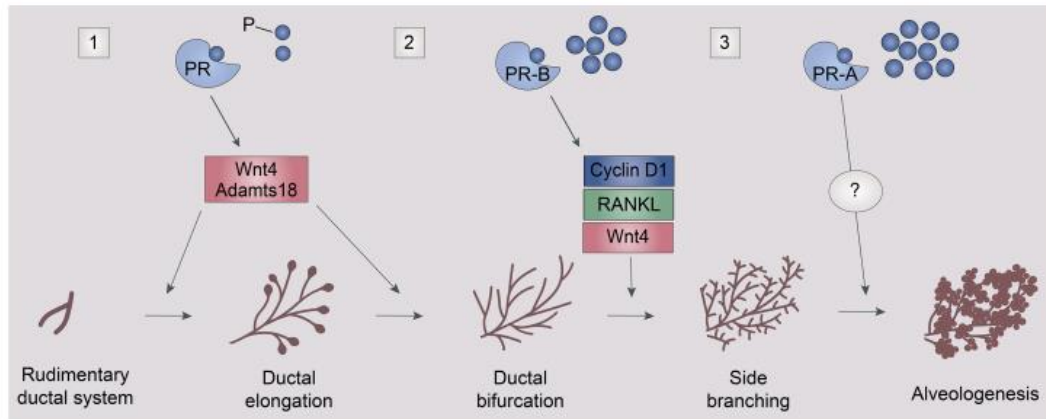


Figura I-4. Señalización de PR en las distintas etapas de desarrollo. 1) En la pubertad, PR induce la activación de las células stem mamarias. 2) En la glándula mamaria adulta durante los ciclos menstruales (fase lútea) PRB induce la ramificación lateral de los brotes terminales. 3) Durante el último trimestre del embarazo, PRA participa de la alveogénesis. Extraído de (Briskin & Scabia, 2020).

La acción de RH es necesaria para el desarrollo normal de la glándula mamaria. Tanto ER α como PR, se expresan en un bajo porcentaje de las células epiteliales mamarias adultas. De hecho, solo el 10-20% de las células epiteliales coexpresan ambos receptores. Interesantemente, una variedad de estudios concluyó que la mayoría de las células proliferativas en la mama son RH-. Entonces, ese 10-20% de células RH+, en respuesta a la Pg, provee las señales mitogénicas parácrinas a las células RH-. Beleut y colaboradores describieron 2 mecanismos por los cuales la Pg induce la proliferación de las células epiteliales mamarias: por un lado, un grupo de células PR+ (5%) prolifera por mecanismos dependientes de Ciclina D1 (vía autócrina) y, por otro lado, un gran número de células PR- prolifera por mecanismos RANKL-dependientes (vía parácrina; Beleut et al., 2010).

PR y su implicancia en cáncer de mama

Datos epidemiológicos han demostrado que el riesgo de CaM aumenta con una menarca temprana, menopausia tardía o ciclos menstruales cortos. Todos estos factores

aumentan el número total de ciclos menstruales en la vida de una mujer, aumentando así la exposición a hormonas ováricas (Briskin, 2013). En la clínica se observó que mujeres bajo el tratamiento de reemplazo hormonal (E2 + progestágenos sintéticos) tenían mayor riesgo de desarrollar CaM que aquellas que recibieron el tratamiento solo con E2. Estas mujeres, además, presentaron tumores más grandes y de mayor grado (Women's Health, 2002). Los progestágenos sintéticos tienen una vida media mayor y son más estables que su contraparte natural. Asimismo, pueden unirse a otros RH, como AR y GR, activando otras vías de señalización (Sitruk-Ware & Spitz, 2003).

La mayoría de los tumores mamarios recién diagnosticados clasifican como RH+, en contraste con la glándula mamaria en donde las células proliferativas son RH-. Esto podría sugerir que las células RH+ sufren un cambio temprano hacia mecanismos autocrinos de señalización y/o que el linaje RH+ conserva la capacidad proliferativa. Sin embargo, las bases moleculares de este *switch* de una señalización parácrina a una autocrina son desconocidas. Además las lesiones premalignas y el CaM de estadio temprano, muestran un desbalance en los niveles de las isoformas de PR, generalmente favoreciendo mayor expresión de PRA que PRB (Graham et al., 1995), a diferencia del epitelio mamario donde suelen expresarse de manera equimolar (Mote et al., 2002). La importancia clínica del desbalance de isoformas se observa en la respuesta a tratamientos. Por ejemplo, alta expresión de PRA (PRA-H) se relaciona con una recaída temprana a tamoxifeno (TAM), pero no así a inhibidores de aromatasa (AI; Mote et al., 2015). Sin embargo, dichas pacientes se beneficiarían de un tratamiento con antiprogestágenos (Rojas et al., 2017), indicando que la proporción de isoformas de PR es un factor predictivo. Nuestro laboratorio y otros han demostrado que los tumores PRA-H son tumores más metastásicos (Graham et al., 2005; McFall et al., 2015; McFall et al., 2018; Abascal et al., 2022) con una disminución de la adhesión celular y un menor índice proliferativo (Rojas et al., 2017) que los tumores PRB-H. Los tumores PRA-H tiene un perfil transcriptómico que correlaciona con tumores del subtipo Luminal A (Rojas et al., 2017). Por lo tanto, la complejidad de la señalización de PR en CaM debe estudiarse con profundidad para poder realizar consensos clínicos de las implicancias de tener una isoforma por sobre la otra.

CICLO CELULAR

Generalidades

El ciclo celular es una serie de eventos finamente regulados que gobiernan la replicación del ADN y la división celular. El ciclo celular eucariota está dividido en 4 fases: fase G1 (fase *gap* 1), fase S (fase de síntesis de ADN), fase G2 (segunda fase *gap*) y finalmente la fase M (mitosis). G0 (estado de quiescencia) es un estado por fuera del ciclo de proliferación, donde la célula no prolifera, pero tiene el potencial de hacerlo. Además, existen múltiples puntos de control para asegurar una replicación y segregación de cromátidas adecuada. Este control sirve para evitar la inestabilidad genómica que puede conducir o potenciar la tumorigénesis (Thu et al., 2018). La entrada y progresión del ciclo celular requiere de estimulación por mitógenos (factores de crecimiento, hormonas). La fase G1 es la única fase sensible a dichos factores, pasada la fase G1 la célula es refractaria a mitógenos y a anti-mitógenos [revisado en (Coleman et al., 2004)].

El ciclo celular está controlado por quinasas dependientes de ciclinas (CDK), que dependen de las ciclinas para su activación y especificidad de sustrato. Si bien a la fecha se han reportado 20 ciclinas y quinasas, pocas están involucradas estrictamente con el ciclo celular (Lim & Kaldis, 2013). Algunos de los mecanismos que no están relacionados con el ciclo celular son la regulación transcripcional, el metabolismo, la diferenciación y el desarrollo neuronal (Peyressatre et al., 2015). Mientras que las CDK son ubicuas y se encuentran constantemente expresadas, las ciclinas tienen una expresión periódica y se degradan en etapas específicas del ciclo celular para asegurar una progresión del ciclo adecuada (**Figura I-5**).

La transición entre fases está regulada por un cambio en la actividad de CDK específicas. La acumulación secuencial de las distintas ciclinas permite la formación de complejos ciclina-CDK específicos, que tienen como blanco distintos sustratos involucrados en la transición de fases. En la transición G1/S el complejo predominante es ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2, seguido por ciclina A-CDK2 y ciclina B-CDK1 durante G2 y mitosis (Caldon et al., 2006). Las ciclinas y CDK tienen funciones redundantes. Se observó que las ciclinas A2 y B1 son aquellas que llevan funciones únicas. En cuanto a

las CDKs, CDK1 es suficiente para llevar a cabo el ciclo celular [revisado en (Bretones et al., 2015)].

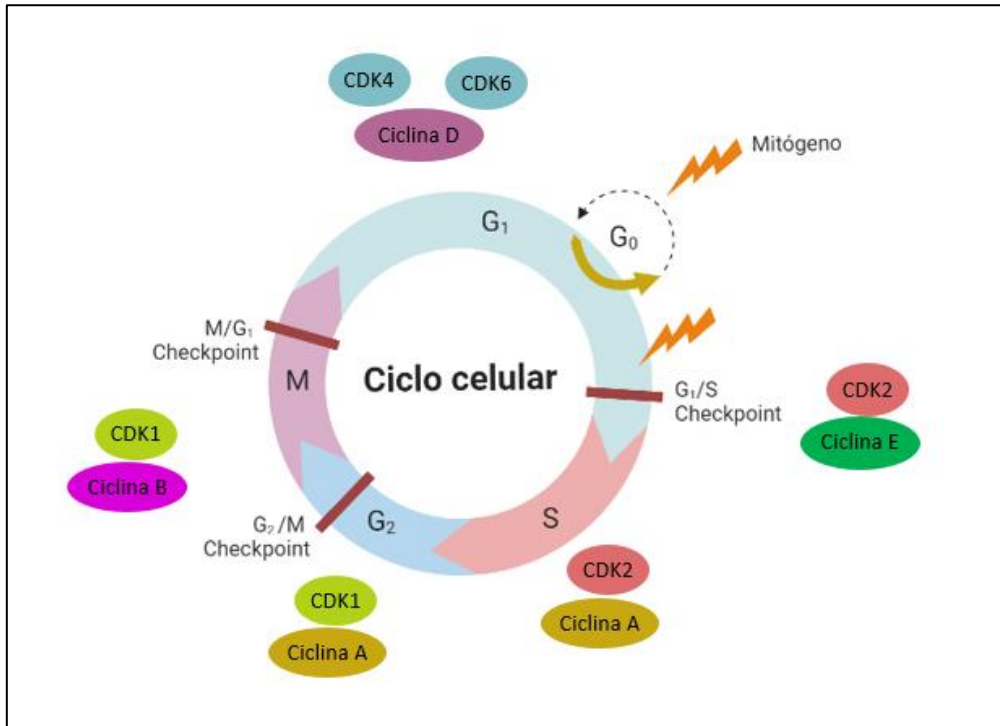


Figura 1-5. Ciclo celular de mamíferos. Se muestran las 4 fases y los puntos de control (checkpoints). Se muestran los complejos ciclina/CDK que participan en cada fase.

Activación y progresión del ciclo celular

Factores mitogénicos (factores de crecimiento, E2 y Pg) cuando se unen a sus respectivos receptores, inducen la expresión y acumulación de ciclina D que se une y activa la función de CDK4/6 en la fase G₁ temprana. Dicho complejo fosforila parcialmente a la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (RB), en alguno de sus 14 sitios sensibles a ser fosforilados por CDKs, en un evento llamado hipofosforilación (ya que se compara con el estado máximo de fosforilación). RB es su estado no fosforilado mantiene secuestrado al factor E2F. RB hipofosforilado libera una pequeña cantidad de E2F. Este factor de transcripción inicia la expresión de ciclina E1, ciclina E2 y de sí mismo. La ciclina E se une y activa a CDK2, la cual conduce a la hiperfosforilación de RB y su posterior inactivación completa. De este modo, la célula pasa el punto de control G₁/S, llamado punto de restricción. Pasado este punto, la célula se compromete a continuar la división celular, aún en ausencia de estímulos externos. Cabe mencionar que este pasaje está regulado por un balance positivo de factores pro mitogénicos, y en

el caso de que los factores anti-mitogénicos predominen, la célula retorna a G0. Este punto de restricción, también llamado punto de no retorno, es el más importante del ciclo celular y está rigurosamente regulado [(Rocca et al., 2017); **Figura I-6**]. La acción conjunta de ciclina D/CDK4/6 y ciclina E/CDK2 lleva a la progresión del ciclo celular más allá del punto de restricción.

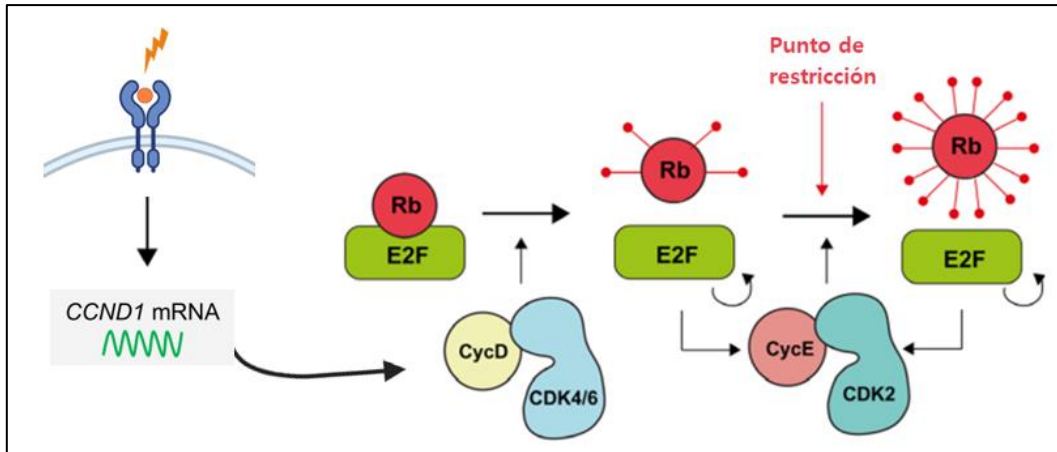


Figura I-6. Modelo de regulación del punto de restricción por RB. Células quiescentes presenta el estado no fosforilado de RB. Luego de una señal mitogénica, el complejo ciclina D/CDK4/6 fosforila de forma progresiva pero incompleta a RB, retirando la inhibición sobre E2F. Luego, E2F inicia la transcripción de ciclina E y de sí mismo, para alcanzar la hiperfosforilación de RB y así pasar el punto de restricción. Adaptado de Pennycook & Barr, 2020.

Otra vía de activación para promover la transición G1/S, paralela al eje RB/E2F, es a través de Myc. La expresión de este FT correlaciona positivamente con la proliferación celular. Su activación induce la expresión de una variedad de ciclinas (D, E, A), CDKs (1,2,4,6) y de E2F lo cual permite la progresión del ciclo celular [revisado en (García-Gutiérrez et al., 2019)].

Regulación del ciclo celular

♥ *Inhibidores de CDK*

Existen dos clases principales de inhibidores de CDK (CDKi): la familia INK4, que incluye a p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) y p19 (INK4C), que bloquea la formación del complejo de ciclina D con CDK4/6 en la fase G1 y la familia CIP/KIP, que incluye a p21 (Cip1), p27 (Kip1) y p57 (Kip2), que actúan sobre todos los complejos ciclina-CDK. Los CDKi son reguladores críticos del complejo ciclina-CDK (Sherr & Roberts, 1999).

Familia INK4: los cuatro miembros de esta familia tienen funciones muy similares. La inhibición es a través de interacciones 1:1 y secuestro de las CDK4/6 libres impidiendo su actividad quinasa y asociación con ciclinas. La proteína p16 (INK4) es la más estudiada, es un supresor tumoral y tiene un rol muy importante en senescencia (Kumari & Jat, 2021).

Familia CIP/KIP: son inhibidores de los complejos ciclina A-E/CDK2 y ciclina B/CDK1, pero son reguladores positivos de ciclina D/CDK4/6. Los complejos ciclina D/CDK4/6 también funcionan como una esponja de p21 y p27, liberando al complejo ciclina E/CDK2 de su inhibición. Por lo tanto, los niveles relativos de ciclinas, CDK y CDKi determinan si la célula progresará en el ciclo o no. El complejo ciclina E/CDK2 también fosforila proteínas con un rol directo sobre la replicación del ADN, como NPAT que facilita la síntesis de histonas y componentes del complejo pre replicativo (Hwang & Clurman, 2005). La actividad del complejo ciclina E/CDK2 está finamente regulado por interacciones proteína-proteína, fosforilación y degradación, pero el primer nivel de control es a través de su expresión periódica. Dado que ciclina E es un gen blanco de E2F, la hipofosforilación de RB y la liberación de pequeñas cantidades de E2F inicia la expresión de la ciclina E, la cual llega a su máximo en la transición G1/S. Un segundo nivel de control del complejo ciclina E/CDK2 es por medio de los CDKi p21 y p27, ya que su interacción con el complejo inhibe profundamente la actividad quinasa. La disponibilidad de p21 y p27 está dada por su abundancia total y también a través del secuestro de ciclina D/CDK4/6, como se mencionó anteriormente [revisado en (Caldon et al., 2006)].

Tanto p21 como p27 se unen y estabilizan al complejo ciclina D/CDK4/6, p16 se une específicamente a CDK4 y 6 inhibiendo la actividad quinasa y rompiendo la unión con la ciclina D. Esto también lleva de forma indirecta a la liberación de p21 y p27 (que funcionan como estabilizadores del complejo ciclina D/CDK4/6), y estos CDKi libres tienen una función inhibitoria sobre el complejo ciclina E/CDK2 [revisado en (Rocca et al., 2017)].

♥ *Activadores de CDK*

Cdc25A: es una fosfatasa que remueve fosforilaciones inhibitorias de las CDK2, 4 y 6. Suele estar sobreexpresada en tumores de CaM y correlaciona con una mayor actividad enzimática de CDK2 (Cangi et al., 2000).

HORMONAS Y CICLO CELULAR

Receptores hormonales y ciclo celular

El eje ER α /E2 estimula la proliferación y progresión de un gran porcentaje de tumores mamarios, y las terapias estándar están dirigidas a este receptor. Sin embargo, existen numerosos estudios en aumento que demuestran que PR también juega un rol importante en la tumorigénesis mamaria, aunque aún no está explotado como blanco terapéutico.

ER α y PR ejercen funciones específicas en distintas fases del ciclo celular. La función como FT se activa de forma dependiente de la fase del ciclo celular para asegurar que cada etapa se desarrolle en tiempo y forma. Alteraciones de estas funciones son fundamentales en el proceso de malignización del epitelio mamario.

Progestágenos y ciclo celular

En células epiteliales mamarias, la Pg y el E2 inducen la entrada a G1 de las células quiescentes a través de la activación de genes relacionados con el ciclo celular, como por ejemplo ciclina D y c-Myc. La ciclina D, que es un sensor de mitógenos que integra la señalización extracelular y envía la información a la maquinaria del ciclo celular, juega un rol fundamental en la fisiología normal y patológica de la glándula mamaria. La mitad de los tumores mamarios presentan sobreexpresión de esta proteína, aunque la amplificación génica se observa solo en el 13-15% de los casos. Esto sugeriría que mecanismos epigenéticos y/o señalización hormonal aberrante contribuyen a este fenotipo específico del CaM (Cicatiello et al., 2004).

Los progestágenos en combinación con EGF aumentan sinérgicamente la expresión de ciclina D y E. Esta última es necesaria para la entrada de las células a la fase

S y, a diferencia de la ciclina D, la ciclina E es capaz de promover la transición de G1/S aún en células con RB no funcional (Lange et al., 1999). Como se describió anteriormente, las ciclinas favorecen la progresión del ciclo celular a través de la interacción con CDK. Los progestágenos activan a CDK2, que a su vez fosforila a PR. Narayanan y colaboradores, demostraron que la actividad transcripcional de PR es dependiente de la fase del ciclo celular, con una actividad máxima en la fase S y una actividad muy baja en la fase G2/M (Narayanan et al., 2005). El complejo ciclina A2/CDK2, que gobierna la fase S, es necesario para la máxima acción sobre los genes blanco de PR (Moore et al., 2014). Con respecto a la ciclina D, en un modelo de expresión constitutiva se observó que ésta aumenta la función y expresión de PR, de forma CDK4/6 independientes (Yang et al., 2010).

Wade y colaboradores reportaron un aumento de la expresión de E2F1 en células T47D luego del tratamiento con la progestina R5020. En primer lugar, demostraron que la unión de PR al ligando regula directamente la expresión de E2F1 al unirse a sitios *enhancer* del promotor del gen. En segundo lugar, R5020 induce la fosforilación de RB, y así libera E2F que se recluta en su propio promotor (Wade et al., 2010). En línea con estos hallazgos, otros autores realizaron un análisis de ChIP-Seq y confirmaron la unión de PR a secuencias regulatorias de E2F1 luego del tratamiento con el antiprogestágeno mifepristona (MFP; Yin et al., 2012).

Antiprogestágenos y ciclo celular

Musgrove y colaboradores demostraron que el tratamiento con antiprogestágenos arresta a las células T47D en fase G1. Esto se asoció con una disminución de la fosforilación de RB y de la actividad de CDK4, CDK6 y CDK2. Por otro lado, los antiprogestágenos inducen la expresión del inhibidor de ciclo celular p21, tanto a nivel del ARNm, como de la proteína. Estos efectos fueron revertidos con el agregado de ciclina D exógena (Musgrove et al., 1997). Posteriormente, Alban y colaboradores, mostraron que la hiperfosforilación de RB inducida por R5020 y por E2 podía ser bloqueada por antiprogestágenos y antiestrógenos, respectivamente, sin evidencia de un antagonismo cruzado (los antiestrógenos no impiden la fosforilación de RB inducida por R5020, y viceversa; Alban et al., 2001).

Nuestro grupo demostró que la respuesta de carcinomas mamarios a antiprogestágenos es altamente dependiente de la proporción de isoformas de PR. Resumidamente, los antiprogestágenos inducen la regresión tumoral al aumentar la asociación entre PR y su correpresor SMRT. Luego, este complejo se une a las regiones regulatorias de *MYC* y *CCND1* disminuyendo la expresión de ambos genes (Wargon et al., 2015).

La **Figura I-7** resume las acciones de PR sobre el ciclo celular. Cabe mencionar que los efectos más estudiados son los proliferativos, que están dirigidos principalmente por PRB unido a progestágenos. Con respecto al efecto antiproliferativo desencadenado por antiprogestágenos, nuestro laboratorio demostró la disminución de los niveles de ciclina D1 (**a**; Wargon et al., 2015). Está reportado que MFP disminuye la fosforilación de RB utilizando la línea T47D, de forma que queda aún resolver la pregunta si PRA media este efecto (**b**; Musgrove et al., 1997). Por último, está demostrado que PR se une a regiones regulatorias del gen *E2F1*. En particular en esta tesis nos interesa evaluar si el complejo PRA/MFP es capaz de inhibir su expresión (**c**; Yin et al., 2012).

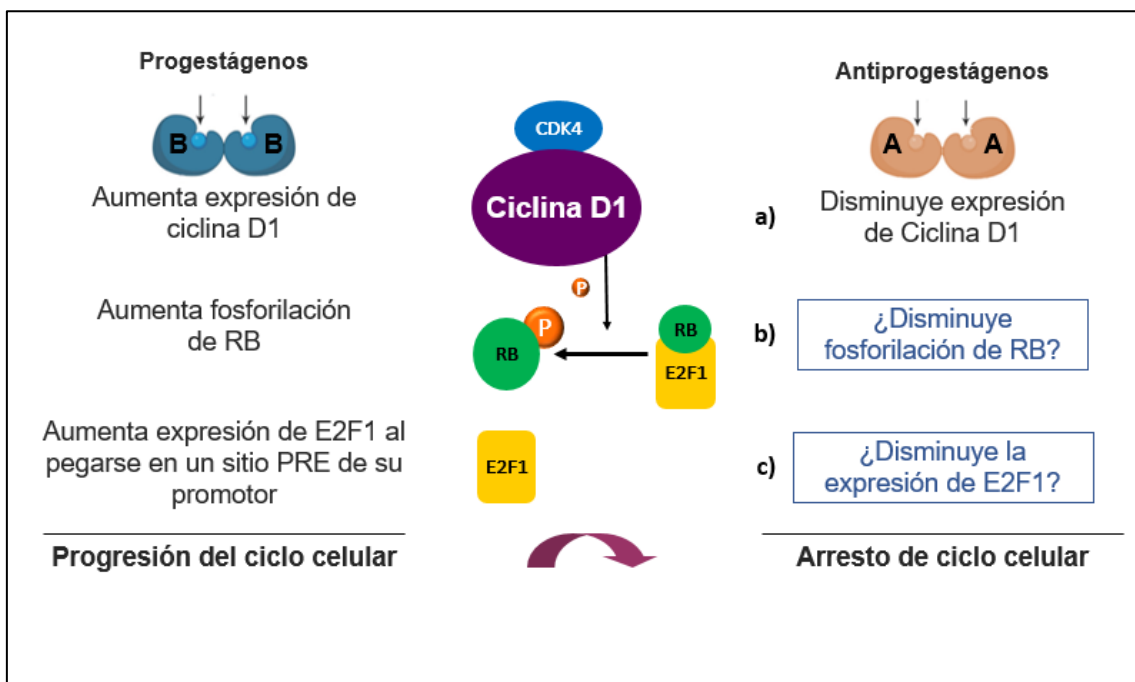


Figura I-7. Acciones de progestágenos y antiprogestágenos sobre el ciclo celular. Ligandos de PR tienen acciones opuestas sobre el ciclo celular. Cuando antiprogestágenos, como la MFP, se encuentran en un contexto celular donde hay abundancia de PRA, desencadenan vías que conllevan al arresto del ciclo celular. Se observa el efecto contrario cuando progestágenos, como el MPA, se encuentran en un contexto PRB.

TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER DE MAMA LUMINAL

Terapia endócrina antiestrogénica

Los tumores luminales son el subtipo más común con un pronóstico variable. A pesar de los avances en el diagnóstico y en el manejo del CaM temprano, aproximadamente un tercio de las pacientes progresa hacia una enfermedad metastásica. Los tumores que expresan al menos un 1% de ER α y/o PR son considerados tumores RH positivos (RH+; Allison et al., 2020). Dentro de este subgrupo, los pacientes que no sobreexpresan HER2 y tampoco presentan metástasis al momento del diagnóstico reciben como tratamiento estándar terapia endócrina dirigida al ER α durante 5 o 10 años. Dentro de esta terapia se encuentra el tamoxifeno (TAM), modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM), que inhibe de manera competitiva la unión de los estrógenos a ER α . Asimismo, existen inhibidores de aromatasa (AI; anastrozole, exemestane y letrozole) que disminuyen los niveles circulantes de estrógenos al inhibir la conversión de andrógenos a estrógenos. También se utilizan degradadores selectivos del receptor de estrógenos (SERD) como el fulvestrant, que induce la desestabilización y la degradación del ER α [revisado en (Waks & Winer, 2019)].

A pesar de que las terapias antiestrogénicas son generalmente efectivas, aproximadamente el 40% de las pacientes adquiere resistencia al tratamiento. Esto lleva al desarrollo de recurrencias de peor pronóstico que el tumor primario y representa un desafío para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas (Fontes-Sousa et al., 2019). Es importante remarcar que la resistencia a la terapia endócrina puede ser previa al tratamiento o inducirse como consecuencia del mismo (Belachew & Sewasew, 2021).

El uso de tratamientos combinados es una estrategia que ofrece a las pacientes la ventaja de obtener el beneficio máximo de la terapia combinando las potencialidades de las diferentes drogas. A continuación, se detallarán los inhibidores ciclo celular, más específicamente de CDK4/6 (iCDK4/6) los cuales se utilizan en combinación con la terapia endócrina.

Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

A partir del año 2015, la FDA aprobó el uso de tres inhibidores del ciclo celular con la potencialidad de superar la resistencia endócrina: palbociclib, ribociclib y abemaciclib. Estos inhibidores interfieren con CDK4/6 impidiendo la fosforilación de RB. La reducción en los niveles de fosforilación de RB conduce al arresto del ciclo celular entre las fases G1 y S. Experimentos *in vitro* han demostrado que los iCDK4/6 inhiben la proliferación celular en modelos luminales preferentemente porque, a diferencia de los TN, presentan un eje RB-E2F funcional y dependen de este para progresar en el ciclo celular (Cangi et al., 2000). Más aún, los tumores luminales suelen sobreexpresar o tener amplificados los genes de ciclina D1 y CDK4. De hecho, en tumores ER α , el E2 funciona como mitógeno al permitir la progresión del ciclo celular a través del aumento de los niveles de ciclina D1, entre otros mecanismos (Eggersmann et al., 2019; Thu et al., 2018; **Figura I-8**). Estas características hacen a los tumores luminales candidatos a responder a iCDK4/6. Si bien los pacientes con tumores TN también podrían beneficiarse del uso de estos inhibidores, las terapias convencionales propuestas para este subtipo tumoral (quimio- y radioterapia) continúan siendo más efectivas.

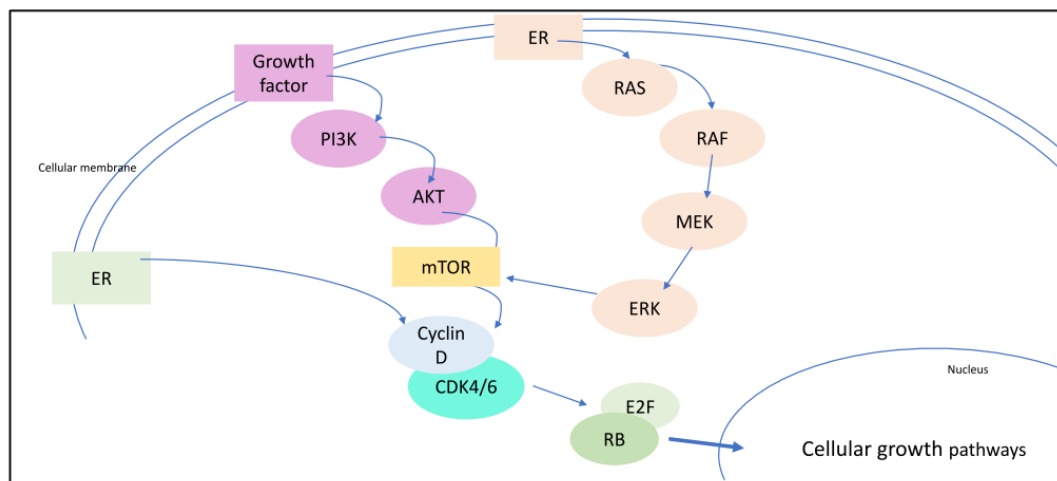


Figura I-8. Vías de señalización en tumores luminales que convergen en la progresión del ciclo celular. ER y algunos factores de crecimiento aumentan los niveles de ciclina D y favorecen la progresión del ciclo celular. Extraído de (Elfgen & Bjelic-Radisic, 2021).

En ensayos clínicos randomizados se ha demostrado que la terapia endócrina en combinación con iCDK4/6, mejoran significativamente la progresión libre de enfermedad (PFS) por varios meses en comparación con la terapia endócrina sola (Li et

al., 2020). Los primeros ensayos clínicos, PALOMA-1 y PALOMA-2, utilizando Palbociclib mostraron mejorías en la PFS en pacientes con tumores ER α + HER2- sin tratamiento previo (Finn et al., 2015; Finn et al., 2016). Asimismo, palbociclib también fue ensayado en pacientes ER α + HER2- que progresaron luego de la terapia endócrina. Los resultados de dicho ensayo, PALOMA-3, permitieron que en 2016 la FDA apruebe su uso en combinación con fulvestrant (Cristofanilli et al., 2016).

Más recientemente y a partir de los resultados de los ensayos clínicos MONALEESA-2, -3 y -7 (Hortobagyi et al., 2016; Hortobagyi et al., 2018; Slamon et al., 2018; Tripathy et al., 2018) y MONARCH-1, -2 y -3 (Dickler et al., 2017; Goetz et al., 2017b; Sledge et al., 2017) se aprobó el uso de dos nuevos iCDK4/6, el ribociclib y el abemaciclib en primera y en segunda línea para el CaM avanzado ER α + HER2-. La **tabla I-1** resume los ensayos clínicos que evaluaron los tres iCDK4/6 y sus respectivos resultados (Elfgen & Bjelic-Radistic, 2021).

Clinical Trial	Patient Selection	n	Therapeutic Regimen	PFS (Months)	OS
PALOMA-1	Postmenopausal women without systemic treatment for advanced disease	165	Palbociclib + letrozole versus letrozole alone	20.2 versus 10.2 (HR 0.488; 95% CI 0.319–0.748; one-sided $p = 0.0004$)	Not significant
PALOMA-2	Postmenopausal women without systemic treatment for advanced disease	666	Palbociclib + letrozole versus placebo + letrozole	24.8 versus 14.5 (HR 0.58; 95% CI 0.46–0.72; $p < 0.001$)	Immature data
PALOMA-3	Postmenopausal women with progress under endocrine therapy	521	Palbociclib + fulvestrant versus placebo + fulvestrant	9.5 versus 4.6 (HR 0.46; 95% CI 0.36–0.59; $p < 0.0001$)	Not significant
MONARCH-2	Pre- and postmenopausal women with progress under endocrine therapy	669	Abemaciclib + fulvestrant versus placebo + fulvestrant	16.4 versus 9.3 (HR 0.553; 95% CI 0.449 to 0.681; $p < 0.001$)	Not significant
MONARCH-3	Postmenopausal women without systemic treatment for advanced disease	493	Abemaciclib + endocrine therapy versus placebo + endocrine therapy	28.2 versus 14.8 (HR 95%; CI 0.418–0.698; $p < 0.0001$)	Immature data
MONALEESA-2	Postmenopausal women without systemic treatment for advanced disease	668	Ribociclib + fulvestrant versus placebo + fulvestrant	25.3 versus 16.0 (HR 0.568; 95% CI 0.457–0.704; $p < 0.0001$)	Immature data
MONALEESA-3	Postmenopausal women without systemic treatment for advanced disease	726	Ribociclib + letrozole versus placebo + letrozole	20.5 versus 12.8 (HR 0.59; 95% CI 0.48–0.73; $p > 0.001$)	57.8% vs 45.9% at 42 months (HR 0.72; 95% CI 0.57–0.92; $p = 0.00455$)
MONALEESA-7	Peri-/premenopausal	672	Ribociclib + endocrine therapy versus placebo + endocrine therapy	23.8 versus 13.0 (HR 0.55; 95% CI 0.44–0.69; $p > 0.001$)	70.2% vs 46.0% at 42 months (HR 0.71; 95% CI 0.54–0.95; $p = 0.00973$)

PFS = progression-free survival; HR = hazard ratio; OS = overall survival; CI = confidence interval.

Tabla I-1 Ensayos clínicos prospectivos y randomizados con iCDK4/6 en pacientes con tumores avanzados ER α + HER2-. Extraído de (Elfgen & Bjelic-Radistic, 2021).

Antiprogestágenos

Los antiprogestágenos son un grupo de compuestos que tienen la capacidad de unirse al PR con diferentes niveles de afinidad. La unión induce efectos agonistas, antagonistas o mixtos en función de la estructura molecular del ligando, concentración y el contexto celular. El primer antiprogestágeno sintetizado para uso humano fue la MFP o RU486. La MFP tiene la capacidad de inducir la dimerización de PR y su unión al ADN con una afinidad mayor que el ligando natural. El efecto inhibitorio de la MFP se basa en el reclutamiento de correpresores (Jackson et al., 1997). La MFP se utiliza actualmente para diversas indicaciones ginecológicas y obstétricas, tales como la interrupción voluntaria del embarazo, como anticonceptivo de emergencia, para inducir el parto, para tratar endometriosis, para el tratamiento de algunas neoplasias como meningiomas o leiomiomas, y en la enfermedad de Cushing dada su actividad antiglicocorticoide [revisado en (Islam et al., 2020)]. MFP induce la dimerización de PR y su posterior interacción con los promotores de los genes blanco. Si la célula presenta un contexto de mayor expresión de PRB, se activarán genes relacionados con la proliferación celular. Por el contrario, si el contexto celular es de mayor expresión de PRA, se inhibirá la expresión de genes relacionado con la proliferación celular y se expresarán genes relacionados con el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Vanzulli et al., 2002; Wargon et al., 2015; Islam et al., 2020).

Nuestro laboratorio, utilizando líneas celulares de CaM que expresan diferencialmente las isoformas de PR, modelos murinos y cultivos *ex vivo* derivados de pacientes, ha contribuido en el conocimiento actual de la MFP como posible terapia para los tumores mamarios haciendo hincapié en que dicha terapia sería beneficiosa solo en aquellos pacientes cuyos tumores expresan mayores niveles de PRA que PRB (Elia et al., 2023).

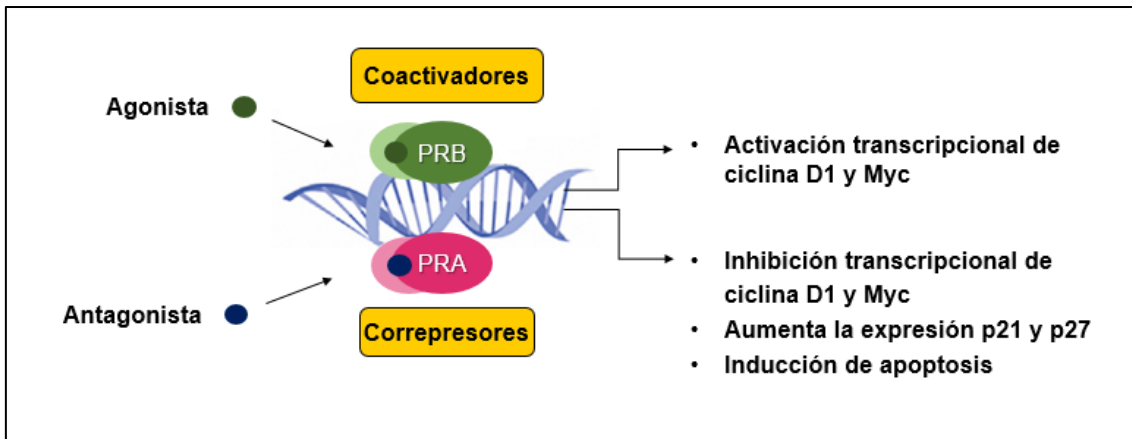


Figura I-9. Mecanismo de acción de antiprogéstagenos en CaM. La mifepristona puede actuar como un agonista (reclutando coactivadores y aumentando la transcripción de genes pro-proliferativos) o como un antagonista (reclutando correpresores y aumentando la transcripción de genes anti-proliferativos).

XENOTRANSPLANTES DERIVADOS DE PACIENTES (PDX)

Generalidades

Patient derived xenograft o PDX son modelos en los cuales se transplanta un fragmento de tumor de un paciente a un ratón inmunosuprimido para establecer un tumor de células neoplásicas humanas creciendo en un huésped murino. En la última década se han publicado numerosas revisiones señalando los avances en el campo (Byrne et al., 2017; Abdolahi et al., 2022). Cuando el tumor crece se puede transplantar en otro ratón y así sucesivamente. Estos modelos presentan múltiples ventajas frente a otros, entre las cuales se destaca que recapitulan la histología, el perfil genómico, el comportamiento metastásico, la dependencia hormonal y la respuesta al tratamiento del tumor parental del cual derivaron.

La heterogeneidad inter- e intra-tumoral dificulta la elección precisa de tratamientos adecuados para cada paciente, y los modelos *in vitro* e *in vivo* comúnmente utilizados no pueden cubrir esta necesidad. Esto se evidencia en que el 90% de las drogas oncológicas que resultan favorables en esos modelos preclínicos luego fallan en ensayos clínicos.

Hasta el momento se han logrado establecer PDX de casi todos los tipos de cáncer, con mayor o menor éxito. Si bien el CaM es el tipo de cáncer más frecuente en la población mundial (Sung et al., 2021), algunos tipos de tumores menos frecuentes (esófago y páncreas) poseen una tasa de éxito de injerto mucho más elevada (**Figura I-10**). Esto refleja que el establecimiento de PDX de tumores mamarios es una tarea con múltiples factores a tener en cuenta para lograr el éxito de su desarrollo (Weeber et al., 2017; Kuwata et al., 2019; Wang et al., 2019; Lan et al., 2021).

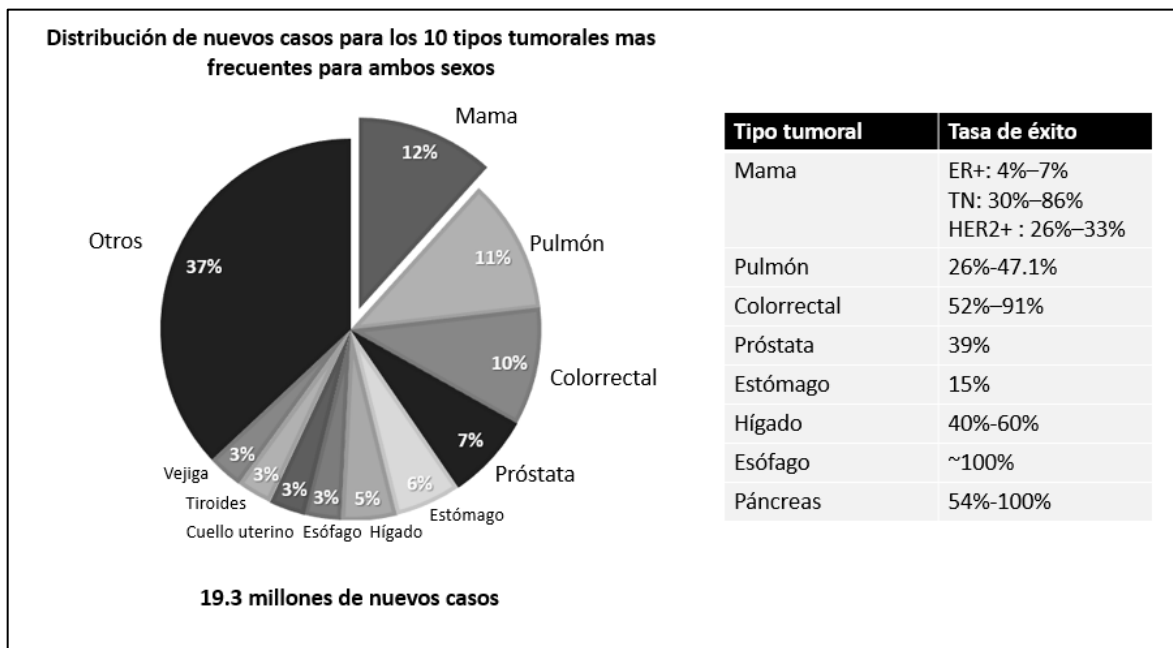


Figura I-10. Incidencia de cáncer en ambos sexos y la tasa de éxito de injerto de PDX de dichos tipos tumorales. Izquierda: Datos de GLOBOCAN 2020. Se muestra el porcentaje de nuevos casos de cáncer en ambos sexos. Derecha: Tabla que ilustra el rango de éxito para el establecimiento de un injerto de PDX para cada tipo tumoral.

Ratones utilizados

Para la generación de un PDX es clave que el huésped esté inmunosuprimido para que el sistema inmune del mismo no rechace el transplante. Los ratones *Non-obese diabetic* (NOD)-scid y NOD.Cg-Prkdc scid Il2rg tm1Wjl /SzJl (NSG), con una depleción casi total o total de células NK y de la cascada de señalización de citoquinas involucradas en inmunidad innata, son actualmente el modelo elegido, ya que tienen una inmunosupresión severa, contribuyendo al mayor éxito en el desarrollo de PDX. En la **Tabla I-2**, se mencionan ejemplos de cepas de ratones inmunodeficientes y sus principales características.

Cepa de ratón	Cel. B maduras	Cel. T maduras	Cel. dendríticas	Macrófagos	Cel. NK	Complemento hemolítico	Permeabilidad	Tolerancia a la radiación
NSG	Ausente	Ausente	Defectuoso	Defectuoso	Ausente	Ausente	Muy Baja	Baja
NRG	Ausente	Ausente	Defectuoso	Defectuoso	Ausente	Ausente	Ausente	Alta
NOD SCID	Ausente	Ausente	Defectuoso	Defectuoso	Defectuoso	Ausente	Baja	Baja
Fox chase SCID beige	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Defectuoso	Presente	Baja	Baja
SCID	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Baja	Baja
B6 Rag1	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Alta
Nude endogámico	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	N/A	Alta
Nude exogámico	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	N/A	Alta

Tabla 1-2. Diferencias entre los distintos tipos de ratones inmunodeficientes utilizados para desarrollar PDX. Extraído de (Stribbling & Ryan, 2022).

PDX de cáncer de mama

En 2016 se realizó un análisis del porcentaje de los subtipos clínicos de CaM que estaban representados en un Consorcio de PDX (*International Breast Cancer Patient-derived Xenograft Consortium* (Dobrolecki et al., 2016)). El subtipo con más representación fue el TN (56%), mientras que este subgrupo representa aproximadamente al 10% de las pacientes. En contraposición, los tumores ER α + que son preponderantes en la clínica (~75%), representaron sólo el 36%. Con respecto a los tumores HER2+, que representan el ~10-15% en la clínica, alcanzaron un 8% en la colección de PDX. Una posible explicación de la elevada tasa de implantación de los tumores TN puede ser que estos presentan mayores niveles de células iniciadoras de tumor (TICs o *cancer stem cells*). Otro factor, podría ser que los ratones inmunosuprimidos no expresen ciertos factores (por ejemplo, IL-6 o HGF) que tumores de bajo grado, pero no de alto grado, necesitan para crecer. Más aún, el tejido tumoral que proviene de un sitio metastásico tiene una mayor tasa de implantación que tumores primarios. En consecuencia, el hecho que un tumor crezca en un PDX es, por sí mismo, un mal factor pronóstico, fenómeno que se traslada a otros cánceres además del CaM (Eyre et al., 2016; Chen et al., 2020).

Sitio de implante

Los tumores se pueden transplantar de manera heterotópica, por ejemplo, en el s.c. u ortotópica, en el órgano del cual derivaron las células tumorales. En el caso del CaM, el trasplante ortotópico sería en el panículo adiposo de la glándula mamaria (*fatpad*) o dentro de los conductos mamarios. El grupo de la Dra. Brisken (Basilea), demostró que la implantación ortotópica intraductal de tumores luminales es más exitosa que la heterotópica, ya que este microambiente favorecería la expresión de genes luminales. Esta tecnología se ha denominado MIND (del inglés, *mouse mammary gland intraductal*; Sflomos et al., 2016). Brevemente esta técnica consiste en realizar una digestión del tumor e inocular la suspensión de células, tanto epiteliales como estromales, dentro del conducto mamario a través del pezón del ratón.

Otra técnica que podría explorarse para incrementar la eficiencia de toma de los injertos de PDX es la utilización de un cilindro de vidrio o plástico (CP) sc. y colocar el tumor dentro del mismo. Esta técnica fue utilizada para hacer crecer tumores alogénicos que de otra manera hubieran sido rechazados (Saal et al., 1972). En esta tesis utilizaremos la técnica de CP, además de la clásica inoculación del tumor de forma sc., para evaluar el éxito de PDX de CaM.

Suplementación con estradiol

Es muy difícil establecer PDX a partir de tumores primarios ER α + de bajo grado, particularmente del subtipo luminal A, aún en presencia de estradiol exógeno. Para aumentar la probabilidad de toma tumoral se suele administrar E2 mediante la implantación de *pellets* sc. o el agregado en el agua de bebida (Eyre et al., 2016). Esta suplementación favorece la implantación de tumores ER α + y ER α -, ya que el E2 impacta sobre el microambiente tumoral, promoviendo la angiogénesis y modulando el desarrollo de tumores independientemente de su expresión de RH (Pequeux et al., 2012).

Similitud paciente-PDX

Numerosos estudios han demostrado que el PDX recapitula al tumor parental fielmente al menos en los primeros 15 pasajes (Zhang et al., 2013). Si bien existe una

selección clonal en la implantación del tumor, los PDX suelen mantener la heterogeneidad presente en el tumor parental. Tanto a nivel histológico estructural (H&E) como a nivel de expresión de biomarcadores (ER α , PR, HER2 y Ki67) los PDX son virtualmente indistinguibles de los tumores que les dieron origen (DeRose et al., 2011). A nivel genómico, se encontró que los PDX presentan rearrreglos genómicos, alteración del número de copias, perfil mutacional y frecuencia de variantes alélicas similares al tumor parental (Goetz et al., 2017a). A nivel transcripcional, los PDX muestran una notoria similitud del perfil de expresión de ARNm (Bergamaschi et al., 2009). Con respecto al comportamiento metastásico, los PDX son capaces de producir células circulantes que forman micro y macrometástasis en órganos distantes conservando cierta órgano-especificidad a la del paciente (DeRose et al., 2011).

Aplicaciones

Los modelos PDX se utilizan para el desarrollo de drogas, ensayos pre- y co-clínicos y medicina de precisión (Hidalgo et al., 2014). El término medicina de precisión lo define el NIH como un enfoque emergente para el tratamiento y la prevención de enfermedades que toma en cuenta la variabilidad génica, ambiental y de estilo de vida de cada paciente. El avance de las tecnologías de biología molecular ha permitido detectar mutaciones comunes en vías de señalización y blancos moleculares que pueden ser utilizados con terapias dirigidas. Los modelos PDX que imitan fehacientemente el tumor del paciente son poderosas herramientas para la medicina de precisión. Asimismo, aumentan las probabilidades de éxito de las terapias evaluadas en ensayos clínicos, facilitando la investigación translacional (Yoshida, 2020; Guillen et al., 2022).

Limitaciones del modelo

Los modelos PDX son herramientas importantes para identificar mecanismos de resistencia *de novo* o adquiridos, para la identificación de nuevos biomarcadores, para guiar la búsqueda de nuevas terapias dirigidas y para la evaluación de nuevas terapias experimentales. Aunque son superiores a las líneas celulares en la recapitulación de la heterogeneidad tumoral, este modelo está sobrerrepresentado por aquellos tumores más malignos. De hecho, la toma tumoral y su velocidad de crecimiento son factores pronósticos *per se*. Los tumores más diferenciados ER α + con un bajo Ki67 son los más

difíciles de implantar, y el éxito en el injerto puede ser a costa de la selección de las células más indiferenciadas y agresivas, lo cual podría resultar en un tumor un poco diferente al del paciente.

El aspecto financiero también debe tenerse en cuenta, ya que criar y mantener los ratones NSG en condiciones de esterilidad es costoso. En línea con esto, la propuesta de realizar ensayos *ex vivo* a partir de PDX puede resultar en una alternativa económica, con resultados rápidos y manteniendo la heterogeneidad y estructura tumoral que deriva de un paciente.

Breast cancer tissue culture: BCTC

El cultivo de tejido de tumores mamarios, o BCTC, consiste en cultivar de forma *ex vivo* fragmentos pequeños del tumor primario extraídos directamente del paciente. La misma tecnología puede aplicarse a partir de muestras obtenidas de un PDX. Este ensayo consiste en colocar rodajas/secciones del tumor de unos ~100 μm de espesor cortadas con un vibrátomo, sobre un soporte en una placa multipocillo y evaluar los efectos de tratamientos simples y combinados a través de marcadores de proliferación como Ki67. En nuestro laboratorio hemos utilizado esta técnica para evaluar la respuesta a antiprogéstágenos en tumores mamarios (Rojas et al., 2017). La principal ventaja de realizar estos ensayos con muestras obtenidas a partir de PDX es que, al disponer de una mayor cantidad de material biológico, se pueden ensayar de forma simultánea múltiples drogas, combinaciones y concentraciones. Modelos alternativos incluyen el cultivo de esferoides u organoides a partir de PDX (Yoshida, 2020).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Dado que: **1)** en el laboratorio hemos demostrado que los antiprogestágenos son una opción terapéutica para pacientes con tumores de CaM PRA>PRB; **2)** si bien los inhibidores de ciclo celular tienen asociados múltiples efectos adversos, son la terapia más novedosa para tumores luminales y muestran mejoría significativa en la PFS; **3)** el uso de terapias combinadas es un enfoque que permite obtener la máxima eficacia de cada tratamiento y permite reducir las dosis de cada uno, con el fin de disminuir los efectos adversos; **4)** la falta de modelos preclínicos fidedignos de CaM dificulta la selección de terapias que sean efectivamente adecuadas para cada paciente, proponemos la hipótesis y objetivos detallados a continuación.

HIPÓTESIS

Tumores luminales con mayor expresión de la isoforma A del receptor de progesterona (PRA>PRB) responderán a la combinación terapéutica de inhibidores del ciclo celular y antiprogestágenos. El desarrollo y uso de modelos preclínicos que recapitulen el tumor de la paciente son una herramienta valiosa para identificar y/o validar dichas terapias oncológicas.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto del tratamiento endócrino con antiprogestágenos en combinación con inhibidores de CDK4/6 en modelos experimentales de CaM humano con distinta proporción de isoformas de PR. Para esto, utilizaremos modelos que han sido ampliamente estudiados y modelos nuevos generados en el laboratorio. Para llevar a cabo el objetivo general nos proponemos:

Objetivo específico 1

Generar modelos experimentales de CaM humano para el estudio de la terapia combinada de iCDK4/6 y antiprogestágenos: Desarrollo del Biobanco de PDX.

Objetivo específico 2

Evaluar la sensibilidad a la terapia combinada iCDK4/6 y antiprogestágenos en los siguientes modelos de CaM luminal:

- Modelo PDX (*in vivo* y *ex vivo*)
- Modelos murinos (*in vivo*)
- Modelos humanos (CDX)

Objetivo específico 3

Estudiar el mecanismo asociado al efecto terapéutico del tratamiento de iCDK4/6 y antiprogestágenos utilizando líneas celulares humanas de CaM.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR

MANEJO DE CÉLULAS

Las soluciones utilizadas se detallan en las páginas 131-132 del apéndice.

♥ *Características generales de las líneas celulares utilizadas*

Los ensayos *in vitro* se realizaron con las líneas celulares T47D-WT (RRID:CVCL_0553), T47D-YA y T47D-YB. La línea celular T47D-WT, adquirida en la ATCC, se estableció a partir de un derrame pleural de una paciente de 54 años con un carcinoma mamario del tipo ductal infiltrante (Keydar et al., 1979). Esta línea celular expresa ER α y PR. Para generar las variantes T47D-YA e -YB, el grupo liderado por la Dra. Horwitz aisló por citometría de flujo el clon T47D-Y que no expresa PR. Por transfección estable de plásmidos de expresión de PRA o PRB, se generaron las variantes T47D-YA y T47D-YB, respectivamente (Jacobsen et al., 2002). Ambas líneas celulares poseen niveles de expresión de PR similares a los de la línea T47D-WT. Estas líneas celulares sirven de modelos fisiológicos para el estudio de los mecanismos de acción de las isoformas de PR y su participación en la fisiopatología tumoral. Las células T47D-YA y T47D-YB fueron cedidas gentilmente por la Dra. Horwitz (Universidad de Colorado, EE.UU.). Las tres líneas celulares fueron validadas por Labcorp, Burlington, USA.

♥ *Mantenimiento de líneas celulares*

Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's Mod. Of Eagle's Medium/Ham's F-12 (DMEM/F12, Corning, sin glutamina, ni rojo fenol). A este medio se le adicionó bicarbonato de sodio (S5761; Sigma-Aldrich) y glutamina (2 mM). Este medio de cultivo se utilizó para realizar el ayuno de las células previo a los ensayos (medio de ayuno). Para el mantenimiento de las células se utilizó un medio de cultivo completo, suplementado con 10% de suero fetal bovino de complementado (SFB; Natocor, Argentina) y 1×10^{-9} M de insulina (Denver, Argentina). En el caso de las células T47D-YA y T47D-YB, se agregó además 200 μ g/ml de G418 (Geneticina, InvivoGen) para seleccionar a las células transfectadas con los plásmidos respectivos. Los medios de cultivo se cambiaron 3 veces por semana y las células se mantuvieron en estufa a 37 °C en 5% CO₂.

♥ *Repique celular*

Una vez que las células alcanzaron un 80% de confluencia, se aspiró el medio de cultivo y las células adheridas se lavaron con PBS 1X estéril e incubaron durante 1-2 minutos a 37°C con una solución de tripsina (Gibco) 0,25%-EDTA (Anedra) 0,02% en un volumen suficiente para cubrir el fondo de la placa. Una vez que el 50% de las células se despegaron, se inactivó la tripsina con medio completo, utilizando al menos el mismo volumen que el utilizado de tripsina. Luego, las células se traspasaron a un tubo *falcon* con medio completo y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en medio de cultivo completo. Finalmente, las células se sembraron en las placas correspondientes a cada ensayo, en una dilución adecuada.

♥ *Congelamiento y almacenamiento de líneas celulares*

Las células se tripsinizaron según se explicó en el apartado anterior. Luego de centrifugarlas, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en medio de congelado. Las células se fraccionaron de a 1,2 ml en criotubos y se congelaron a -80°C en recipientes aptos para la reducción gradual de temperatura (Mr. Frosty, Thermo Fisher). Pasadas al menos 24 horas, los criotubos se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su uso.

♥ *Ensayos de proliferación celular y respuesta a drogas*

Se sembraron $1,5 \times 10^4$ células por pocillo en placas de 24 pocillos (p24) en medio de cultivo completo. Luego de 24 horas, las células se ayunaron por 24 horas con medio de ayuno. Por último, las células se trataron con las drogas detalladas en la **Tabla M-1** en DMEM/F12 con 7% SFB. Se realizó un recambio del medio de cultivo cada 48 horas. Finalizados los 5 días de tratamiento, se procedió al conteo celular. Para ello, primero se lavaron las células con PBS 1X y se agregaron 90 µl/pocillo de tripsina. Luego, se inactivó la acción de la tripsina con 10 µl SFB/pocillo. El conteo celular se realizó utilizando el contador automático de células Countess II (Thermofisher). Los experimentos se repitieron como mínimo 2 veces y se realizó un mínimo de 5 réplicas para cada tratamiento.

Droga	Fabricante	Concentración final
<i>Mifepristona</i>	Abcam (Cambridge, MA)	10 nM
<i>Acetato de Medroxiprogesterona</i>	Abcam (Cambridge, MA)	10 nM
<i>Palbociclib</i>	MCE (Princeton, NJ)	100 nM
<i>Factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2)</i>	Provisto por Dr. Baldi	50 ng/ml

Tabla M-1. Drogas utilizadas en ensayos de proliferación celular, WB, IF o RT-qPCR.

ENSAYOS DE WESTERN BLOT (WB)

Las soluciones utilizadas se detallan en las páginas 132-134 del apéndice.

♥ *Preparación de extractos celulares totales*

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de las líneas celulares cultivadas en placas de 6 pocillos (Biofil TCP 011006). Se sembraron 6×10^5 células/pocillo en medio de cultivo completo, alcanzando una confluencia aproximada del 80% a las 24 horas. Las células se lavaron con PBS 1X y ayunaron por 24 horas en medio de ayuno. Luego, se trataron con las drogas detalladas en la **Tabla M-1** por 24 horas. Finalizado el tratamiento, se procedió a la extracción de proteínas. Primero, manteniendo las placas en hielo, se realizó un lavado con PBS 1X frío y luego se adicionó 100 μ l/pocillo de *buffer* RIPA suplementado con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich, P8340) y fosfatasa (NaF y β -Glicerofosfato disódico pentahidratado). Se levantaron los lisados celulares con un *scraper* y se recuperaron en tubos de 1,5 ml, que se incubaron en hielo durante 30 minutos en agitación para favorecer la extracción proteica. Por último, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C (Centrífuga 5415 R, Eppendorf) por 20 minutos. Los sobrenadantes (fracción proteica), se recuperaron en tubos de 1,5 ml y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

♥ *Cuantificación de proteínas*

Se utilizó el *kit* comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (cat.# 23227; ThermoFisher) y las determinaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva estándar con concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina (BSA, ThermoFisher). La concentración de proteínas se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida con la curva estándar, utilizando los valores de absorbancia medidos a 620 nm para cada muestra, medidos en el lector de placas de Elisa (Multiskan FC, Thermo Scientific).

♥ *Corrida electroforética y revelado*

Las muestras proteicas (25-50 µg de proteínas totales/calle) se disolvieron en *cracking buffer* y se hirvieron durante 5 minutos para realizar la desnaturalización. Luego, se sembraron en los geles correspondientes y se separaron en un gel de poliacrilamida discontinuo utilizando el sistema Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se corrieron junto con 2 µl de un marcador de peso molecular en cada gel (Thermo Scientific). Se realizó la electroforesis durante 20-30 minutos a 80 V hasta que la muestra pasó el gel concentrador, y por 90-120 minutos a 100 V en el gel separador. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas a 80 V en hielo. Se realizó un lavado en TBS-Tween (TBS-T) por 5 minutos y las membranas se bloquearon 1 hora en solución de bloqueo (leche al 5% en TBS-T) a temperatura ambiente y luego se lavaron en TBS-T durante 5 minutos. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes *overnight* (ON) a 4°C en agitación (ver **Tabla M-2**). Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 minutos y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rabanita (HRP, Vector Laboratories). Las bandas inmunorreactivas se revelaron mediante el agregado de un sustrato que genera una señal quimioluminiscente al ser modificado por la enzima peroxidasa. Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica (Agfa). Finalmente, las placas se escanearon y las bandas se cuantificaron con el programa ImageJ (NIH).

Anticuerpo	Fabricante	Dilución
E2F1	Santa Cruz Biotech (sc-251 Santa Cruz, CA)	1:100
pRB	Cell Signaling (8516S; Danvers, MA)	1:1000
PR	Cell Signaling (8757S; Danvers, MA)	1:1000
β -Actina	Santa Cruz (sc-4778; Santa Cruz, CA)	1:500
Tubulina	Sigma (T0198 Clon D66)	1:10.000
Anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa	Vector Laboratories	1:2000
Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa	Vector Laboratories	1:2000

Tabla M-2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en ensayos de WB.

ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las soluciones utilizadas se detallan en la página 134 del apéndice.

Se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas p24 sobre un cubreobjetos (*Cover glass*, 12 mm HDA) pre-esterilizado con etanol 70%. Transcurridas 24 horas, las células se lavaron con PBS 1X y ayunaron por 24 horas en medio de ayuno. Luego, se trataron con las drogas detalladas en la **Tabla M-1** en medio de cultivo suplementado con 7% SFB por otras 24 horas. Trascurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS 1X frío y se fijaron en metanol 100% por 1 hora a -20°C . Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos y se permeabilizaron las membranas celulares con 0,25% tritón en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos y se bloquearon con SFB 5% en 0,25% tritón en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se incubaron *ON* a 4°C con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en tritón 0,1 % en PBS 1X. Al día siguiente, se lavaron con PBS 1X (3 veces durante 5 minutos) y se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario 1:100 en PBS 1X. Luego de 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X, se tiñeron los núcleos con DAPI (Sigma 1 $\mu\text{g/ml}$) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron, montaron los preparados con solución de montaje para

fluorescencia (Vectashield, Vector Labs) y se sellaron con esmalte transparente. Los preparados se conservaron a -20°C y se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Spinning Disk-TIRF-Olympus DSU IX83). Para cada anticuerpo se analizaron las muestras a comparar entre sí (tratamientos) al mismo momento y con la misma ganancia. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS 1X.

ENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNm

Las soluciones utilizadas se detallan en las páginas 134-135 del apéndice.

♥ *Extracción de ARN total*

Los extractos de ARN se obtuvieron a partir de las líneas celulares cultivadas en placas p6. Se sembraron 6×10^5 células/pocillo en medio de cultivo completo, alcanzando una confluencia aproximada del 80%. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 1X y ayunaron por 24 horas en medio de ayuno. Luego se trataron con las drogas detalladas en la **Tabla M-1** por 18 horas. Finalizado el tratamiento, se procedió a extraer el ARN. Para ello, se descartó el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se agregó 1 ml/pocillo de TRIzol (Invitrogen). Se recogieron las muestras en tubos de 1,5 ml rotulados, pipeteando hacia arriba y abajo para favorecer la lisis celular. Luego, se adicionaron 200 μl de cloroformo/tubo (Laboratorio Cicarelli), se agitó vigorosamente, incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Luego, se recuperó la fase superior (fase acuosa) y se traspasó a un tubo de 1,5 ml limpio y rotulado al cual se le adicionó 500 μl de isopropanol (Laboratorio Cicarelli) y se precipitó 2 horas a -80°C . Finalizada la precipitación del ARN, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 13.000 rpm a 4°C y los *pellets* obtenidos (ARN) se lavaron de sales 3 veces con etanol 70% frío. Finalmente, las muestras se dejaron secar en un bloque térmico (Benchmark) a 37°C y se resuspendieron en 30 μl de H_2O DEPC. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa de 1,2 % para evaluar la integridad del ARN y se cuantificó el ARN en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

♥ *Electroforesis en gel de agarosa*

Para resolver las bandas de ARNm correspondientes a 18S y 28S, utilizadas como marcador de integridad del ácido nucleico, se realizó un gel de agarosa de 1,2%. Se

sembraron 200 µg de ARN mezclados con los volúmenes correspondientes de *loading buffer* 6X y SYBR *green* 5X (Invitrogen), de manera que ambos quedasen 1X. Se sembró un marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 pb ADN Ladder Plus, Fermentas) mezclado con SYBR *Green* (Invitrogen). Los geles se corrieron durante 30-40 minutos a 90 V y las muestras se visualizaron en el equipo G:BOX, utilizando un filtro de UV.

♥ RT-qPCR

El ADNc se sintetizó a partir del ARN total mediante retrotranscripción utilizando la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoScientific). Brevemente, en un tubo se preparó la mezcla de reacción conteniendo (para cada muestra): 2 µg de muestra de ARN, 0,2 µg de *random primers* (RP; Genbiotech), 2 µl dNTPs 10 mM (Genbiotech), 4 µl de *buffer* de reacción (5X), 1 µl de transcriptasa reversa (200 U) y H₂O DEPC en cantidad necesaria para completar un volumen final de 20 µl. Los tubos se incubaron en un termociclador (MyGenie96 Thermal Block, BIONEER) con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 10 minutos a 70°C. El ADNc resultante se conservó a -20°C hasta su uso.

El análisis de expresión de los transcriptos se realizó por PCR en tiempo real (qPCR) con el equipo Biorad C1000 Touch Thermal Cycler. Para este ensayo se utilizó la mix SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) en un volumen final de reacción de 15 µl por pocillo. A la mezcla de reacción se le agregaron: 7,5 µl de mixSsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 0,75 µl de una solución 10µM de los *primers* de interés *Forward* + *Reverse* (concentración final de 0,5 µM), la muestra de ADNc y H₂O en la cantidad necesaria para completar el volumen final de 15 µl. Cada muestra se midió por duplicado (réplicas técnicas). Se incluyeron, además, controles negativos de PCR (control de agua y de muestra de ARN sin retrotranscribir, para verificar la amplificación de ADN genómico). La amplificación se realizó siguiendo el siguiente programa: 95°C por 10 minutos y 40 ciclos de: 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos y 60°C por 30 segundos. Los niveles de expresión de los transcriptos de los genes evaluados se estimaron mediante el método de $\Delta\Delta C_t$, utilizando los niveles de expresión de GAPDH para la normalización. Las secuencias de cada par de *primers* utilizados se detallan en la **Tabla M-3**.

Gen	Secuencia <i>primer Forward</i>	Secuencia <i>primer Reverse</i>
<i>E2F1</i>	CCA GCT CAT TGC CAA GAA GT	CAG TGT CCT CGG AGA GCA G
<i>Ciclina D1</i>	GCG GAG GAG AAC AAA CAG AT	TGA GGC GGT AGT AGG ACA GG
<i>GAPDH</i>	CAA CGA CCA CTT TGT CAA GC	TCT TCC TCT TGT GCT CTT GCT G

Tabla M-3. *Primers utilizados para evaluar los niveles de los transcritos seleccionados.*

ENSAYO DE CHIP

Las soluciones utilizadas se detallan en la página 135 del apéndice.

♥ *Cross-linking de proteínas-ADN a partir de células en cultivo*

Se utilizó el *kit* de Diagenode iDeal CHIP-qPCR kit. Brevemente, se plaquearon las células en una confluencia del 80% en SFB 10% sin insulina por 48 horas en placas p150. Se utilizaron aproximadamente 3 millones de células por anticuerpo a precipitar. Luego, se ayunaron por 24 horas en medio de cultivo DMEM/F12 con SFB charcolizado 1% (depletado de hormonas). Al día siguiente se retiró el medio y las células se trataron con MFP 10 nM por 45 minutos. Luego, se fijaron las células con formalina 1% a temperatura ambiente por 8 minutos, para luego interrumpir la fijación con glicina 2 M pH 8 por 5 minutos en agitación y temperatura ambiente. Transcurridos los 5 minutos, se lavó inmediatamente 3 veces con PBS 1X frío. Se agregaron 2 ml de *buffer* de lisis iL1b para levantar las células con la ayuda de un *scraper* y se pasaron a un tubo rotulado de 1,5 ml. Las células se incubaron en hielo con agitación por 20 minutos y luego se centrifugaron a 500 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en *buffer* de lisis iL2 para luego incubarlo en hielo y agitación por 10 minutos. Se precipitaron las células por centrifugación a 500 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en *shearing buffer* adicionado con inhibidor de proteasas (provisto por el kit), para luego incubarlo en hielo por 10 minutos. Finalizada la incubación, se procedió a fragmentar la cromatina con 30 ciclos de sonication 15 segundos ON/ 15 segundos OFF (Bioruptor Plus, Diagenode). Se evaluó la calidad de la cromatina sonicada, extrayendo el ADN de una pequeña muestra de cada placa y corriéndola en un gel de agarosa 0,8%. Los geles se corrieron durante 30-40 minutos a 90 V y las muestras se visualizaron en el equipo G:BOX, utilizando un filtro de UV.

♥ *Inmunoprecipitación*

Se prelavaron las *beads* magnéticas 3 veces por 5 minutos en agitación en frío con el *buffer* CHIP iC1b (agua calidad CHIP, *buffer* CHIP iC1b 5x, BSA 5%). Se mezclaron 30 μ l de *beads* por anticuerpo a inmunoprecipitar con 70 μ l del *mix* de reacción de CHIP conteniendo los anticuerpos a precipitar (BSA 5%, inhibidor de proteasas, *buffer* iC1b 5X, agua calidad CHIP). Se utilizaron los anticuerpos descritos en la **Tabla M-4**:

Anticuerpo	Fabricante	μg utilizados
<i>IgG</i>	Diagenode iDeal CHIP-qPCR kit	Indicado por el fabricante
<i>PR</i>	Santa cruz (sc-7208)	5 μ g
<i>AiB1</i>	BD Biosciences (611105)	5 μ g
<i>SMRT</i>	Cell Signaling (D8D2L)	5 μ g

Tabla M-4. Especificaciones de los anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación.

Las *beads* se incubaron en presencia del anticuerpo por 2-4 horas a 4°C en agitación para permitir el pegado. Luego, se agregaron 250 μ l de la cromatina sonicada y se incubó *ON* a 4°C en agitación. Se apartaron 2,5 μ l de cromatina sonicada para utilizarla como *input* y en la relativización final. Al día siguiente, se precipitaron los complejos proteína-ADN con un imán, se descartó el sobrenadante y se lavó con los *buffers* de lavado iW1, iW2, iW3 y iW4.

♥ *Extracción de ADN y decross-linking*

Se precipitaron los complejos proteína-ADN con un imán y se descartó el sobrenadante. Se le agregó *buffer* DIB, que contiene proteinasa K, y se incubó 15 minutos a 55°C, seguidos de 15 minutos a 100°C. Luego, se recuperó el sobrenadante que contiene el ADN para realizar la qPCR específica de la región *enhancer* ubicada en el gen *E2F1*.

ENSAYOS IN VIVO

ANIMALES NSG

Se utilizaron ratones hembra vírgenes de aproximadamente dos meses de edad de la cepa NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null (NSG) obtenida del *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME) y criados en el bioterio del IBYME. Esta cepa combina múltiples defectos funcionales de inmunidad innata y adaptativa (Ito et al., 2002) y, por lo tanto, permite el trasplante y crecimiento de las líneas tumorales humanas T47D-WT (xenotransplantes de células humanas, CDX). Los animales se mantuvieron en condiciones de esterilidad en *racks* ventilados, con una dieta a base de alimento balanceado y agua *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Los animales se manipularon según normas internacionales acordes con la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996). Los procedimientos llevados a cabo en ratones fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (CICUAL), IBYME (010/2021 y 003/2021).

ANIMALES BALB/c

Se utilizaron ratones hembra vírgenes BALB/c de aproximadamente dos meses de edad apareados y criados en nuestro bioterio (IBYME, CONICET). Los ratones se criaron y mantuvieron bajo las mismas condiciones de ciclo luz/oscuridad y temperatura que los ratones NSG, pero en condiciones de cuidado no estériles. Estos animales se utilizaron para la inoculación de tumores generados en ratones BALB/c (transplantes singeneicos).

MODELOS TUMORALES MURINOS

Se utilizaron las familias de tumores murinos denominadas 59 y C4.

♥ *Modelo de carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA*

Este modelo murino fue inducido por la administración continua de acetato de medroxiprogesterona (MPA) en ratones BALB/c. Los tumores se transplantaron en el sc. de ratones receptores, en presencia o ausencia de MPA, y se realizó un seguimiento de la toma y el crecimiento tumoral de cada uno. En los primeros pasajes, el crecimiento

tumoral era totalmente dependiente de la administración de MPA, ya que no crecían en ratones que no estuvieran suplementados con el progestágeno (variantes hormono-dependientes; HD). Sin embargo, con los sucesivos pasajes aparecieron variantes tumorales que prescindían del agregado exógeno de hormona para crecer (variantes hormono-independientes o HI; Lanari et al., 2009). La mayoría de las variantes tumorales, tanto HI como HD, se mostraron sensibles a la administración de terapia endócrina con antiprogestágenos como MFP (Helguero et al., 2003; Wargon et al., 2015). Ocasionalmente surgieron variantes HI resistentes a dicho tratamiento. Este modelo tumoral resulta muy valioso debido a que las variantes recapitulan estadios tumorales encontrados en pacientes (Lanari et al., 2009). Las variantes que son sensibles a los antiprogestágenos expresan una mayor proporción de PRA que PRB, mientras que las variantes resistentes a la terapia endócrina tienen una mayor proporción de PRB que PRA (Helguero et al., 2003; Wargon et al., 2009; Wargon et al., 2011; Wargon et al., 2015; **Figura M-1**).

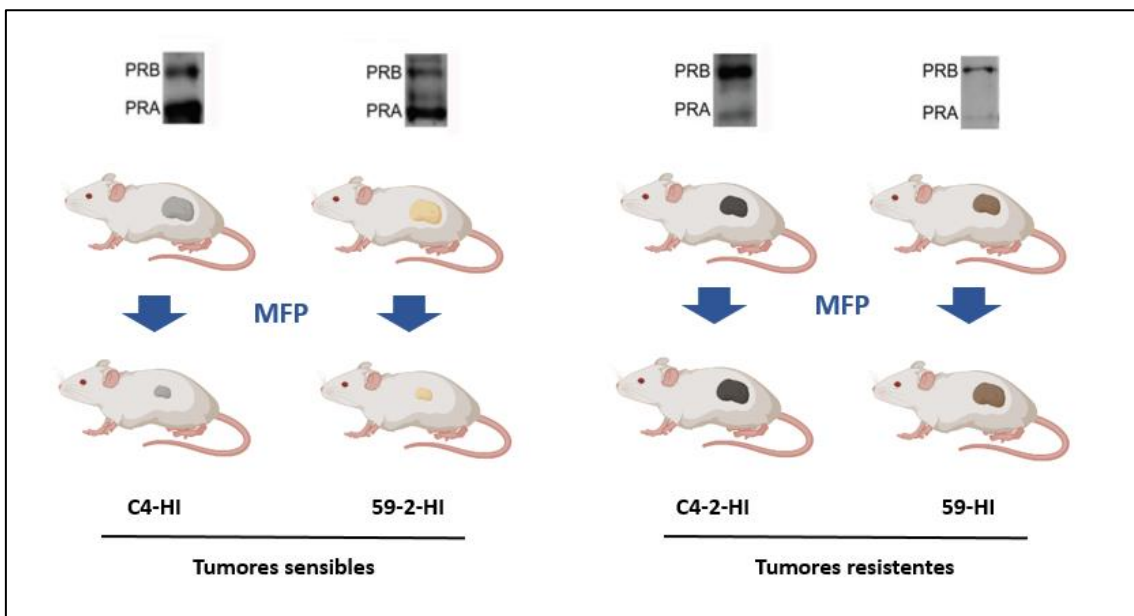


Figura M-1. Carcinomas mamarios murinos provenientes de las familias C4 y 59. Los tumores sensibles que expresan mayores niveles de PRA que PRB regresionan al tratarlos con mifepristona (MFP). Por el contrario, los tumores resistentes tienen la proporción opuesta de isoformas de PR y, en presencia de MFP, crecen igual o con mayor velocidad que los tumores no tratados.

INOCULACIÓN DE LÍNEAS CELULARES Y TUMORES MURINOS

Se inocularon las líneas celulares T47D-WT y T47D-YA en el flanco inguinal derecho de ratones NSG de forma subcutánea (sc.; 5-7 millones de células/ratón) con una aguja 25G en un volumen final de 100 µl en solución fisiológica. A fin de favorecer el crecimiento tumoral, 48 horas antes del inóculo de las células, se colocó un *pellet* de 0,25 mg de E2 en el dorso de los ratones (Sahores et al., 2013). Los tumores murinos se transplantaron de forma subcutánea (sc.) mediante trocar, sin la necesidad de suplementar a los animales con E2.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~30 mm², los ratones se subagruparon de forma tal que la media del tamaño tumoral fuese similar en todos los grupos experimentales al inicio del tratamiento.

TRATAMIENTOS

Tanto para el modelo murino como para el modelo humano se evaluó el efecto de las siguientes drogas:

- Mifepristona: se utilizaron *pellets* de 6 mg, 3 mg, 0,5 mg y 0,1 mg según la sensibilidad del tumor a evaluar. Los *pellets* se elaboraron en el laboratorio y se implantaron mediante trocar de forma sc (Sahores et al., 2013).
- Palbociclib: se inyectaron 10, 20 y 25 mg/kg/día disueltos en solución fisiológica de forma sc. (Rodriguez et al., 2023).

PROCEDIMIENTOS REALIZADOS EN LOS ESTUDIOS *IN VIVO*

♥ *Valoración del crecimiento tumoral*

Se monitoreó el área (largo x ancho) de los tumores sc. día por medio utilizando un calibre Vernier. Con estos datos se elaboraron las curvas de crecimiento tumoral (mm² vs. tiempo) para los diferentes tratamientos. Asimismo, se procedió a pesar los tumores al momento de la necropsia para comparar los pesos tumorales a tiempo final.

♥ *Toma de muestras tumorales*

Una vez finalizados los experimentos *in vivo*, se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical. Se extirparon los tumores, tratando siempre de excluir las zonas

necróticas, que generalmente se encuentran en el centro de la masa tumoral. Las muestras destinadas a estudios de WB se guardaron inmediatamente a -80°C , y las destinadas a estudios de inmunohistoquímica (IHQ) se fijaron en formalina al 10% en PBS 1X para luego ser incluidas en parafina según técnicas de rutina del laboratorio, cortadas en micrótomos y montadas en portaobjetos silanizados.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Las soluciones utilizadas se detallan en la página 135 del apéndice.

Los cortes tumorales se desparafinaron en xileno *ON* y se hidrataron por pasajes sucesivos en alcoholes de graduación decreciente (etanol 100, 96 y 70%). A continuación, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 10 volúmenes al 10% diluido en etanol 70%, durante 30 minutos. Se realizaron 2 lavados de 10 minutos con H_2O y se realizó la recaptura antigénica incubando las muestras en *buffer* Citrato durante 50 minutos a 95°C en baño térmico. Luego, se dejaron enfriar los cortes en el mismo *buffer* por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los cortes realizando un primer lavado de 10 minutos con H_2O y 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos. Luego, se bloqueó con BSA 2,5% en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los cortes histológicos se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS 1X, *ON* a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector) correspondiente 1:400 en PBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de 3 lavados con PBS 1X, se amplificó la reacción antígeno-anticuerpo utilizando el Complejo Avidina Biotina (ABC, Kit Vectastain; Vector) que se incubó durante 30 minutos. La marca se reveló con 3-3 diaminobencidina (DAB, DAKO) bajo microscopio. Se contratiñeron los núcleos con hematoxilina (Biopur) por 20-25 segundos. Los cortes se deshidrataron por incubaciones en alcoholes de graduación creciente y luego xileno, para finalmente montarlos en medio de montaje (DPX, Sigma). Como control de especificidad de la señal del anticuerpo secundario, en algunos cortes se omitió el anticuerpo primario y se lo reemplazó por PBS 1X. Los cortes histológicos se observaron bajo microscopio óptico Nikon Eclipse E800 y las imágenes se obtuvieron con una máquina digital Nikon asociada

al microscopio y el programa ACT-2U. Para cada anticuerpo (**Tabla M-5**) se procesaron las muestras a comparar entre sí en el mismo momento, en iguales condiciones de procedimiento y tiempos de revelado.

Anticuerpo	Fabricante	Dilución
<i>E2F1</i>	Santa Cruz Biotech (sc-251 Santa Cruz, CA)	1:100
<i>pRB</i>	Cell Signaling (8516S; Danvers, MA)	1:200
<i>Anti-IgG de conejo biotinilado</i>	Vector Laboratories	1:400
<i>Anti-IgG de ratón biotinilado</i>	Vector Laboratories	1:400

Tabla M-5. Especificaciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para IHQ.

Preparación de extractos tumorales

Las soluciones utilizadas se detallan en la página 135 del apéndice.

Los tumores se pesaron en balanza y luego se colocaron en tubos polistor (en hielo) para agregar 4 veces su peso de volumen de *buffer A* en presencia de inhibidores de proteasas. Las muestras se incubaron en hielo durante 10 minutos y luego se procesaron con un homogeinizador (Polytron, Teckmar) hasta obtener un homogenato que se dejó reposar en hielo durante 15 minutos. Pasado este tiempo, los homogenatos se sonicaron 3 veces por 10 segundos con intervalos de 10 segundos entre cada vez. Luego, se incubaron por 20 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C (Centrífuga 5415 R, Eppendorf). Los sobrenadantes (fracción proteica), se recuperaron en tubos limpios de 1,5 ml y se almacenaron a -80°C hasta su utilización en ensayos de WB.

DESARROLLO DEL BIOBANCO DE MODELOS DE PDX DE CAM

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Las pacientes con CaM que ingresan al Hospital “Magdalena V de Martínez” de General Pacheco (Estudio aprobado por el CODEI del Hospital y por el CEI del IBYME), son consultadas con un consentimiento informado para participar en el proyecto del Biobanco. Al momento de la cirugía de resección del tumor, se guardaron 3 fragmentos de tumor: **i)** en medio de cultivo DMEM/F12 estéril para su posterior trasplante en ratones, **ii)** en formalina 10% para los estudios histopatológicos, y **iii)** congelado a -80°C para estudios moleculares posteriores.

Inmediatamente llegado al laboratorio, el fragmento **i)** se transplantó en al menos un ratón NSG mediante trócar, con o sin suplementación de E2. En los casos en los que el fragmento era muy pequeño, se priorizó el animal suplementado con E2. En los casos en los que el fragmento era suficientemente grande, el tumor se cortó en pedacitos de ~20 mm² con tijera o bisturí y se transplantó en ratones con y sin suplementación de E2. El fragmento tumoral inicial inoculado en un ratón se denominó pasaje 0 (P0). Cuando este creció, se transplantó en otro(s) ratón(es) denominándose pasaje 1 (P1), pasaje 2 (P2), y así sucesivamente (Pn).

La **Figura M-2** muestra el flujo de trabajo utilizado.

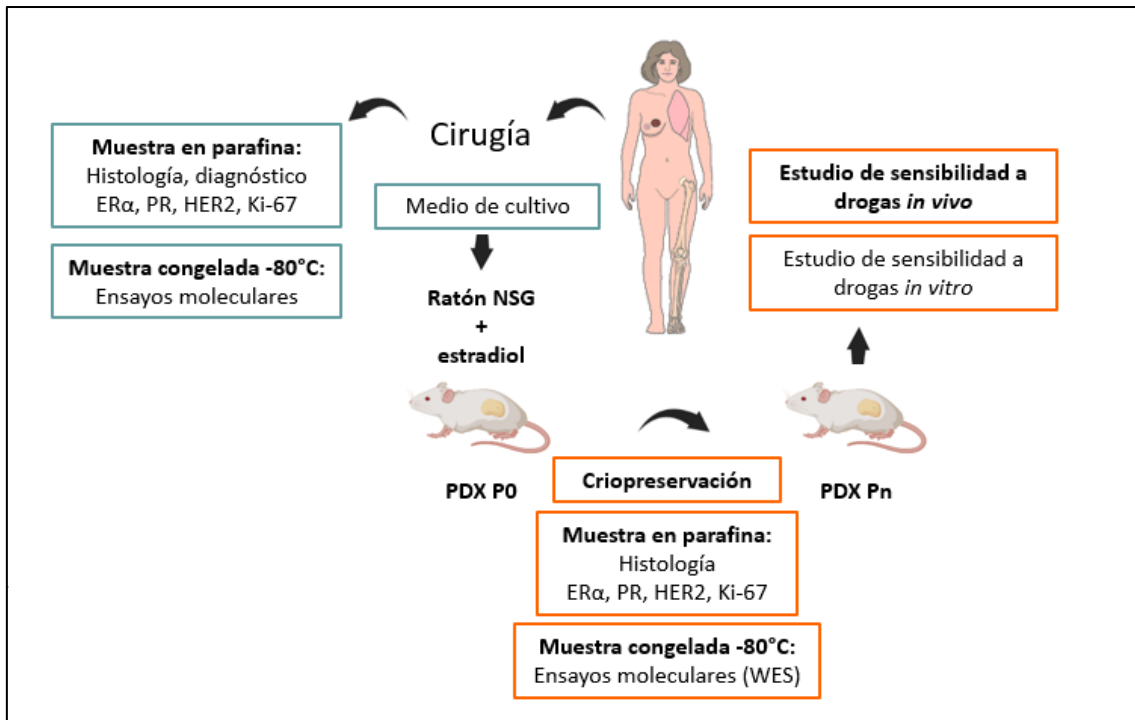


Figura M-2. Esquema de trabajo para las muestras tumorales provenientes de la cirugía de las pacientes. El tumor resecado se dividió en tres fragmentos: uno se colocó en medio de cultivo estéril para su transporte y posterior trasplante en ratones NSG. El segundo fragmento se colocó en formalina 10%, para posteriores estudios histopatológicos. El tercer fragmento se congeló a -80°C para posteriores estudios moleculares. Esta metodología se repitió en cada pasaje. Se realizaron estudios de sensibilidad a drogas en algunos de los PDX establecidos.

SEGUIMIENTO DE LOS RATONES

Los tamaños tumorales (largo x ancho) se registraron una vez por semana utilizando un calibre Vernier. Con estos datos se elaboraron las curvas de crecimiento tumoral (mm² vs. tiempo). Los ratones en los que no se detectó toma tumoral en los primeros 12 meses fueron descartados. Los tumores que mostraron una implantación exitosa se transplantaron en otros ratones receptores, con o sin suplementación de E2. Este procedimiento se realizó al menos 3 veces para cada PDX, es decir hasta el pasaje 3. De cada pasaje se almacenaron muestras tumorales como se describió previamente en i, ii y iii.

CARACTERIZACIÓN DEL PDX

Las soluciones utilizadas se detallan en la página 136 del apéndice.

Una vez establecido el PDX, se realizó la categorización del PDX y del tumor parental que le dio origen:

♥ *Expresión de receptores*

Se cuantificó el nivel de ER α , PR y HER2 por IHQ. Además, los carcinomas luminales se categorizaron según la proporción de isoformas de PR, determinada por WB. En la **Tabla M-5** se detallan los anticuerpos utilizados en los estudios de IHQ:

Anticuerpo	Fabricante	Dilución
PR	Cell signaling (8757S; Danvers, MA)	1:1000
ER α	Leica Biosystems (AB_876939)	Realizado en el Laboratorio San Isidro Patología
HER2	Ventana Medical Systems (AB_2335975)	Realizado en el Laboratorio San Isidro Patología

Tabla M-5. Anticuerpos utilizados por IHQ en cortes de PDX y de tumores primarios de pacientes.

♥ *Tipificación molecular de los PDX*

A partir de muestras de los 8 PDX establecidos, se realizó un análisis de mutaciones por Exome-seq (WES). Brevemente, se tomó un fragmento de los PDX que lograron establecerse durante 2 o más pasajes de forma exitosa. Para realizar la extracción de ADN, los tumores se disgregaron mecánicamente con bisturí y se molieron en un mortero en presencia de hielo seco. Luego, se recuperó el machacado tumoral en un tubo de 1,5 ml y se incubó en *buffer* de digestión por 3 horas a 55°C. Finalizada la incubación, se centrifugó a 13.000 rpm por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico. Se mezcló por inversión varios minutos y luego se dejó en reposo 5 minutos para que se separen las fases acuosa y orgánica. Luego, se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos. Se recuperó el

sobrenadante (fase acuosa) y se le adicionó ½ volumen de acetato de amonio 7,5 M y 2 volúmenes de etanol 100%. Se agitó vigorosamente y se incubó 30 minutos a -20°C. Finalizada la precipitación del ADN, se centrifugó 15 minutos a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó dos veces de sales con etanol 70%. Luego, se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos para descartar el etanol. En el último lavado, se colocó sobre un bloque térmico a 37°C para favorecer la evaporación del alcohol. Una vez completamente seco, se resuspendió el ADN en *buffer* Tris-EDTA.

Una vez extraído el ADN, las muestras se enviaron a MacroGen Inc. (Corea) para su secuenciación. Brevemente, el WES se realizó con el *kit* de la biblioteca Agilent SureSelect V6-Post, y se realizaron 151 secuenciaciones de extremos apareados con la plataforma Illumina HiSeq4000. Las lecturas totales superan los 45 millones y el Q30 supera el 94% por muestra. El flujo de trabajo de PDXnet se completó con éxito con los datos de PDX Argentina en *Cancer Genomic Cloud* (CGC).

ENSAYOS TERAPÉUTICOS *IN VIVO*

Una vez caracterizados los PDX, se realizaron ensayos *in vivo* para evaluar su sensibilidad a las terapias dirigidas disponibles (**Tabla M-6**). Se transplantaron ratones NSG de forma sc. mediante trócar, con la suplementación de E2 si fuera necesario.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~30 mm², los ratones se subagruparon de forma tal que la media del tamaño tumoral sea similar en todos los grupos al iniciar los distintos tratamientos. Luego del ensayo *in vivo* del PDX-485 se evaluó los niveles de Ki67 (Abcam ab 15580) por IHQ como medida del índice proliferativo.

Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

Droga	Concentración	Vía de administración	Fabricante
<i>Fulvestrant</i> (FULVE)	250 mg/kg/semana	sc.	AstraZeneca
<i>Nab-Paclitaxel</i> (PAX)	15 mg/kg/4 días por semana	iv.	Raffo o LKM

<i>PEG-Doxorrubicina (DOXO)</i>	4,5 mg/kg/semana	iv.	Raffo
<i>Citrato de Tamoxifeno (TAM)</i>	5 mg/kg/5 días por semana	sc.	Abcam
<i>Trastuzumab (TZ)</i>	15 mg/kg/3 días por semana	ip.	Raffo
<i>Trastuzumab emtansine (TDM1)</i>	15 mg/kg/3 días por semana	ip.	Roche
<i>Mifepristona (MFP)</i>	6 mg	sc. <i>pellet</i>	Abcam
<i>Palbociclib (PALBO)</i>	20 mg/kg/día	sc.	ECM

Tabla M-6. Agentes terapéuticos utilizados para los ensayos in vivo.

ENSAYOS TERAPÉUTICOS EX VIVO

Se evaluó *ex vivo* (*Breast Cancer Tissue Cultures*; BCTC) la respuesta a terapias simples del PDX-485. La selección de terapias se realizó de acuerdo con el subtipo tumoral del PDX, determinado por la expresión de biomarcadores (ER α , PR y HER2). Brevemente, se extrajo el tumor del ratón y se realizaron cortes de 50-100 μ m de espesor con un vibrátomo (Precisionary Instruments) dentro del flujo laminar. Se colocaron de 3 a 5 cortes elegidos al azar por esponja por pocillo de placa p6 con medio de cultivo completo y las drogas a ensayar (paclitaxel 50 nM o doxorrubicina 1 μ M) por 48 horas. Al cabo de este tiempo, los fragmentos se fijaron en formalina 10% dentro un *cassette* y se los procesó para su inclusión en parafina para realizar cortes histológicos y luego evaluar los niveles de Ki67 (Abcam ab 15580) por IHQ como medida del índice proliferativo.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico se usó el programa GraphPadPrism (Versión 8.3.0 para Windows, GraphPad Software Inc.). En todas las figuras se muestra con asteriscos (*) el grado de significancia estadística según sea la $p < 0,05$; $< 0,01$; $< 0,001$ o $< 0,0001$, respectivamente.

Para comparar las curvas de crecimiento tumoral a tiempo final o en función del tiempo, se utilizó el análisis ANOVA de una vía y de dos vías, respectivamente. Luego del ANOVA se realizaron test de comparaciones múltiples comparando las condiciones experimentales entre sí (Test de Tukey).

Para comparar las diferencias entre medias dos tratamientos se utilizó la prueba *test* de Student. Para comparar las diferencias entre medias de más de dos tratamientos se utilizó ANOVA de una vía, seguido del análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

RESULTADOS

1) GENERACIÓN DEL BIOBANCO PDX

En el año 2016 iniciamos el desarrollo de PDX en el bioterio del IBYME con la asistencia del Dr. Sequeira. Nuestro principal objetivo fue evaluar el efecto de progestágenos y antiprogestágenos, en combinación con otras drogas, en el crecimiento de carcinomas mamarios con distinta proporción de isoformas de PR y armar un Biobanco de PDX para compartir con la comunidad científica. Si bien el proyecto sigue en marcha, para esta tesis utilizamos como punto de corte los PDX transplantados hasta octubre 2019 ya que, con motivo de la pandemia, en marzo 2020 los animales fueron sacrificados y el proyecto se retomó a principios de 2022.

De un total de 79 pacientes con CaM, a quienes se les realizó una cirugía de resección tumoral y metástasis ganglionar, cuando correspondiese, se obtuvieron las muestras biológicas para establecer los PDX. De 90 especímenes transplantados en ratones NSG (en algunos casos se transplantó el tumor primario y la metástasis ganglionar) se logró establecer un total de 8 PDX. Entre ellos, 2 se originaron a partir de tumores parentales ER+ (PDX-707 y PDX-685), 1 provenía de una recidiva TN cuyo tumor primario había sido ER+ (PDX-485), 1 HER2+ (PDX-474) y 4 TN (PDX-546, PDX-553, PDX-631, PDX-687). Luego, evaluamos la expresión de los biomarcadores ER α , PR y HER2 por IHQ. El PDX-707 resultó ser ER+ PR-, mientras que el PDX 685 presentó expresión de ambos receptores. El PDX-485 se desarrolló a partir de una muestra obtenida de una resección ganglionar post-tratamiento, y resultó negativo para dichos marcadores. Sin embargo, el tumor primario de la paciente era originalmente positivo para ER y PR. Por su parte, el PDX-474, reflejó las características del tumor parental, es decir ER-, PR- y HER2+.

Características de las pacientes

A continuación, analizamos las características de las pacientes las cuales: **i)** no se logró establecer el PDX al fracasar el P0; **ii)** se realizaron solamente uno o dos pasajes, pero no se establecieron pasajes sucesivos, o **iii)** se establecieron 3 o más pasajes de PDX. Para esto, dividimos a las pacientes según el subtipo tumoral informado en su historia clínica: TN (n=13), luminales (n=55) y HER2+ (n=6). Excluimos del análisis a 5 pacientes ya que no pudimos recopilar la información respecto del subtipo tumoral.

La **Tabla R-1** muestra las características clínicas e histopatológicas de las pacientes con tumores TN. La tasa de éxito para este subtipo tumoral fue del 38,5% (5/13) siendo el subtipo con mayor número de PDX generados. La mayoría de las pacientes llegó al momento de la cirugía con tamaños tumorales entre 20-50 mm de eje mayor (55%) y con más de tres ganglios positivos (66%), sin mostrar metástasis a distancia en el momento de la cirugía. El 15% de los PDX se hizo a partir de recurrencias y el 54% de las pacientes progresaron luego de la cirugía. Notablemente, el 100% de las pacientes cuyo PDX logró establecerse de manera exitosa, recurrió en la enfermedad, siendo estadísticamente significativa la diferencia si comparamos este porcentaje con respecto al de los grupos i) y ii) ($p < 0,05$). Todos los PDX que se establecieron exitosamente dentro del subtipo TN eran carcinomas infiltrantes de tipo no específico (IC-NST).

		Triple negativos			
		i) No generaron PDX	ii) Hasta P1 o P2	iii) Se establecieron	Total
N		5	3	5	13
Edad (años)	Med (rango)	64 (40-83)	50 (28-80)	44 (39-63)	
Tamaño tumoral	T1	2/4 (50%)	0/3 (0%)	0/4 (0%)	2/11 (18%)
	T2	2/4 (50%)	1/3 (33,3%)	3/4 (75%)	6/11 (55%)
	T3	0/4 (0%)	2/3 (66,7%)	0/4 (0%)	2/11 (18%)
	T4	0/4 (0%)	0/3 (0%)	1/4 (25%)	1/11 (9%)
N	N0	1/5 (20%)	0/3 (0%)	1/4 (25%)	2/12 (17%)
	N1	0/5 (0%)	1/3 (33,3%)	1/4 (25%)	2/12 (17%)
	N2	2/5 (40%)	0/3 (0%)	2/4 (50%)	4/12 (33%)
	N3	2/5 (40%)	2/3 (66.7%)	0/4 (0%)	4/12 (33%)
M		1/5 (20%)	0/3 (0%)	0/5 (0%)	1/13 (8%)
Es Recurrencia		1/5 (20%)	0/3 (0%)	1/5 (20%)	2/13 (15%)
Progresión		2/5 (40%)	0/3 (0%)	5/5 (100%)*	7/13 (54%)
Histología	IC-NST	3/5 (60%)	3/3 (100%)	5/5 (100%)	11/13 (85%)
	CLI	2/5 (40%)	0/3	0/5	2/13 (15%)
Grado Nottingham	1	0/4 (0%)	0/3	0/4	0/11 (0%)
	2	2/4 (50%)	0/3	0/4	2/11 (18%)
	3	2/4 (50%)	3/3 (100%)	4/4 (100%)	9/11 (82%)
Ki67 Mediana (rango)		32 (14-80) n=4	52 (23 -90) n=3	91 (10-95) n=4	

Tabla R-1. Características clínicas de pacientes cuyos tumores triples negativos (TN) se transplantaron en ratones NSG. Med: Mediana. T1: Hasta 20 mm, T2: Entre 20 y 50 mm, T3: Más de 50 mm, T4: Con invasión dérmica. N0: Sin ganglios positivos, N1: Hasta 3 ganglios positivos, N2: 3-10 ganglios positivos, N3: Más de 10 ganglios positivos. M: Metástasis. *: $p < 0,05$ iii) vs. ii) y i) (Test de Fisher). IC-NST: carcinoma infiltrante de tipo no específico. CLI: carcinoma lobulillar infiltrante. n: datos disponibles de Ki67 utilizados para calcular el rango.

La **Tabla R-2** muestra las características de las pacientes con tumores luminales. Consideramos tumores luminales a aquellos que presentaban positividad para ER α . La tasa de éxito para este subtipo fue del 3,6% (2/55). La mayoría de las pacientes (88%) llegó al momento de la cirugía con tumores de menos de 50 mm de eje mayor, y el 57% no había desarrollado metástasis axilares. Como es de esperar para tumores luminales, la mayoría (81%) era de grado histológico intermedio (Nottingham 2). El 15% de los tumores transplantados fueron recurrencias y sólo en el 11% de las pacientes se confirmó progresión tumoral luego de la cirugía. El tipo histológico prevalente dentro

de este subtipo tumoral fue IC-NST. En cuanto a la expresión de receptores hormonales, el 67% presentaba positividad para PR, mientras que el 21% era PR-. Dado que pudimos establecer solamente dos PDX luminales, no realizamos estadísticas para evaluar qué características de las pacientes aumentan la probabilidad de éxito del PDX.

		Luminales			
		i) No generaron PDX	ii) Hasta P1 o P2	iii) Se establecieron	Total
N		48	5	2	55
Edad (años)	Med (rango)	60,5 (26-82)	69 (41-91)	82 y 50	
Tamaño tumoral	T1	18/43 (42%)	3/5 (60%)	0/2 (0%)	21/50 (42%)
	T2	21/43 (49%)	1/5 (20%)	1/2 (50%)	23/50 (46%)
	T3	3/43 (7%)	0/5 (0%)	0/2 (0%)	3/50 (6%)
	T4	1/43 (2%)	1/5 (20%)	1/2 (50%)	3/50 (6%)
N	N0	21/37 (57%)	1/4 (25%)	1/2 (50%)	23/43 (53%)
	N1	12/37 (32%)	0/4 (0%)	0/2 (0%)	12/43 (28%)
	N2	3/37 (8%)	2/4 (50%)	1/2 (50%)	6/43 (14%)
	N3	1/37 (3%)	1/4 (25%)	0/2 (0%)	2/43 (5%)
M		0/48	0/5	0/2	0/55
Es Recurrencia		7/41 (17%)	0/5	0/2	7/48 (15%)
Progresión		4/31 (13%)	0/5	0/2	4/38 (11%)
Histología	IC-NST	33/48 (69%)	3/5 (60%)	2/2 (100%)	38/55 (69%)
	CLI	5/48 (10%)	1/5 (20%)	0/2	6/55 (11%)
	otro	10/48 (21%)	1/5 (20%)	0/2	11/55 (20%)
Grado Nottingham	1	5/41 (12%)	0/4	0/2	5/47 (11%)
	2	32/41 (78%)	4/4 (100%)	2/2 (100%)	38/47 (81%)
	3	4/41 (10%)	0/4	0/2	4/47 (8%)
Ki67	Med (rango)	21 (8-64) n=41	23(18-31) n=3	18 y 40	
Clasificación	PRA-H	16/45 (36%)	1/5 (20%)	0/2	17/52 (33%)
	PRB-H	7/45 (16%)	2/5 (40%)	1/2 (50%)	10/52 (19%)
	ER+ PR-	10/45 (22%)	0/5	1/2 (50%)	11/52 (21%)
	Equi	7/45 (16%)	1/5 (20%)	0/2	8/52 (15%)
	LUM S/C	5/45 (10%)	1/5 (20%)	0/2	6/52 (12%)

Tabla R-2. Características clínicas de pacientes con tumores ER+ cuyos tumores se transplantaron en ratones NSG. Med: Mediana. T1: Hasta 20 mm, T2: Entre 20 y 50 mm, T3: Más de 50 mm, T4 con invasión dérmica. N0: Sin ganglios positivos, N1: Hasta 3 ganglios positivos, N2: 3-10 ganglios positivos, N3: Más de 10 ganglios positivos. M: Metástasis. IC-NST: Carcinoma infiltrante de tipo no específico, CLI: Carcinoma lobulillar infiltrante. PRA-H: Mayor expresión de isoforma A de PR. PRB-H: Mayor expresión de isoforma B de PR. Equi: expresión equimolar de isoformas de PR. LUM S/c: Sin clasificar. n: datos disponibles de Ki67 utilizados para calcular el rango.

La **Tabla R-3** muestra las características de las pacientes con tumores HER2+. La tasa de éxito para este subtipo fue del 16,6% (1/6). La mayoría de las pacientes (66%) llegó al momento de la cirugía con tumores de entre 20-50 mm de eje mayor y el 83%

tenía metástasis ganglionares. Cabe remarcar que la paciente cuyo tumor alcanzó un P1 y la paciente cuyo PDX fue exitoso, presentaban más de 10 ganglios positivos y tenían metástasis a distancia al momento de la cirugía. La mitad de las pacientes HER2+ progresaron luego de la cirugía. Todos los tumores dentro del subtipo HER2+ eran del tipo histológico IC-NST.

		HER2+			
		i) No generaron PDX	ii) Hasta P1 o P2	iii) Se establecieron	Total
N		4	1	1	6
Edad (años)	Med (rango)	65 (57-70)	57	50	
Tamaño tumoral	T1	1/4 (25%)	0/1	0/1	1/6 (17%)
	T2	2/4 (50%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	4/6 (66%)
	T3	1/4 (25%)	0/1	0/1	1/6 (17%)
	T4	0/4 (0%)	0/1	0/1	0/4 (0%)
N	N0	1/4 (25%)	0/1	0/1	1/6 (17%)
	N1	3/4 (75%)	0/1	0/1	3/6 (50%)
	N2	0/4 (0%)	0/1	0/1	0/6 (0%)
	N3	0/4 (0%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	2/6 (33%)
M		0/4 (0%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	2/6 (33%)
Es Recurrencia		0/4 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/6 (0%)
Progresión		1/4 (25%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	3/6 (50%)
Histología	IC-NST	4/4 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	6/6 (100%)
Grado Nottingham	1	0/4	0/1	0/1	0/6
	2	0/4	0/1	0/1	0/6
	3	4/4 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	6/6 (100%)
Ki67 Mediana (rango)		46 (40-67) n=4	42 n=1	49 n=1	

Tabla R-3. Características clínicas de pacientes con tumores HER2+ cuyos tumores se transplantaron en ratones NSG. Med: Mediana. T1: Hasta 20 mm, T2: Entre 20 y 50 mm, T3: Más de 50 mm, T4: Con invasión dérmica. N0: Sin ganglios positivos, N1: Hasta 3 ganglios positivos, N2: 3-10 ganglios positivos, N3: Más de 10 ganglios positivos. M: Metástasis. IC-NST: Carcinoma infiltrante de tipo no específico. CLI: Carcinoma lobulillar infiltrante. n: datos disponibles de Ki67 utilizados para calcular el rango.

La **Tabla R4** resume las características principales de las pacientes cuyos tumores se establecieron exitosamente como PDX.

Paciente	485	546	553	631	687	685	707	474
Edad	56	44	63	40	39	82	50	50
Primario / recurrencia	Recurrencia	Primario	Primario	Primario	Primario	Primario	Primario	Primario
Tipo histológico	IC-NST	IC-NST	IC-NST	IC-NST	IC-NST	IC-NST	IC-NST	IC-NST
Grado histológico	NA	3/3/3 (3)	3/3/3 (3)	3/3/3 (3)	3/3/2 (3)	2/3/1 (2)	3/3/1 (2)	3/3/2 (3)
ER/ PR/ HER2	40-30- 0*	0- 0- 0	0-0-0	0- 0- 0	0- 0	30-10-0	90-<1-0	0-0- 3+
Ki67	90	94,5	10	91	NA	18	40,26	48,98
T,N,M (Estadio)	NA	T2,N2,M1 (IV)	T4b,N2,M0 (IIIb)	T2,N0, M0 (IIA)	T2,N1,M0 (IIb)	T4b,N2,M0 (IIIb)	T2, N0, M0 (IIa)	T2,N3,M1 (IV)
Sitio de metástasis	Hueso	Mediastino	Rec. local y pulmonar	Progr. (ND)	Cerebro	No	No	1)Hueso, 2) Cerebro
Tratamiento previo a Cx	ANT-TAX	-	-	-	-	-	-	-
Tratamiento adyuvante	TAX	DOXO-DOC	1) DOXO-PAX 2) CAP	1) DOXO-PAX 2) CAP	DOXO-CYC-PAX	Anastrozole	1)DOXO-PAX 2)TAM	1)PAX-TZ 2) CAP-LAP
Status	ob	NA	NA	En tratamiento	En tratamiento	En tratamiento	En tratamiento	ob
Subtipo	LUM → TN	TN				LUMINAL		HER2+

Tabla R-4. Características de las pacientes cuyos tumores establecieron los 8 PDX. *: Tumor luminal que se convirtió en TN luego del tratamiento; IC-NST: Carcinoma invasivo de tipo no específico; NA: Información no disponible; ND: No determinado; Cx: Cirugía; PAX: paclitaxel; TZ: trastuzumab; CAP: capecitabina; LAP: Lapatinib; ANT: antraciclinas; TAX: taxanos; DOXO: doxorubicina; DOC: docetaxel; CYC: ciclofosfamida; TAM: tamoxifeno; ob: Óbito. LUM: luminal. TN: tumor triple negativo.

Crecimiento de los PDX

El monitoreo frecuente del tamaño de los PDX nos permitió evaluar su latencia y velocidad de crecimiento. A diferencia de lo que ocurre en los experimentos planificados en los que se usa un número prefijado de ratones por grupo experimental, para el establecimiento de los PDX se utilizó un número variable de animales dependiendo del número de ratones disponibles al momento del trasplante y del tamaño de la muestra obtenida. En pocas oportunidades pudimos inocular los fragmentos tumorales en más de un ratón, con y sin suplemento de E2, y en muchos casos, alguno de los dos animales murió antes de que se estableciese el PDX. Por este motivo no pudimos comparar la tasa de éxito de los PDX con y sin suplemento hormonal. En los casos en los que había muy poco material, se inculó un solo animal y se priorizó tratarlo con E2, aún sin tener la información del subtipo tumoral. Es por esto que, en las curvas de crecimiento que se

muestran a continuación, aparece indistintamente el suplemento de E2, a menos que se indique lo contrario. A medida que se establecieron los PDX recopilamos los datos de los 4 marcadores (ER, PR, HER2 y Ki67) de la paciente, lo cual permitió categorizar al tumor parental.

La **Figura R-1** muestra el crecimiento tumoral en el pasaje inicial (P0) de los PDX establecidos y se detalla si el ratón tenía o no suplemento de E2. Los tumores TN se injertaron fácilmente y presentaron un tiempo de latencia menor que los demás subtipos tumorales. Al cabo de 50 días mostraban una pendiente pronunciada de crecimiento tumoral con áreas tumorales que oscilaron entre los 30 mm² (PDX-553) y los 300 mm² (PDX-485). Estos PDX mostraron tasas de crecimiento similares en los pasajes sucesivos (datos no mostrados). Por el contrario, los PDX-685 (ER+ PR+) y PDX-474 (HER2+) permanecieron estáticos en el pasaje 0. Si bien el PDX-707 (ER+ PR-) se estableció exitosamente y formó una masa tumoral de 100 mm² en 100 días aproximadamente, mostró menor velocidad de crecimiento que los TN.

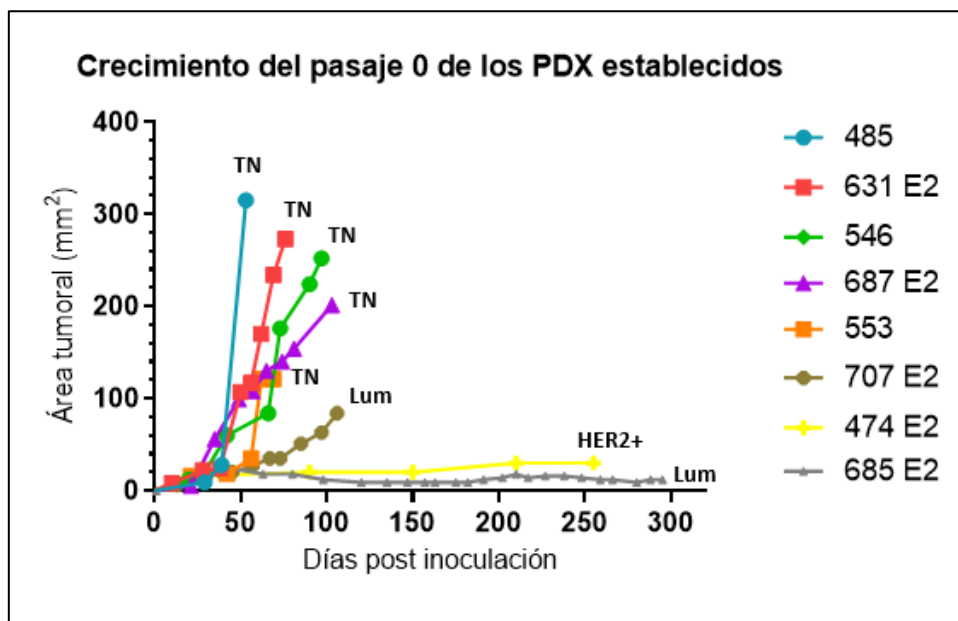


Figura R-1. Curvas de crecimiento de los PDX en el pasaje cero (P0). Se muestran curvas representativas de cada PDX. Se detallan los ratones a los que se suplementó E2 y el subtipo tumoral de cada PDX.

♥ *PDX Luminales*

La **Figura R-2** muestra el crecimiento tumoral de los PDX luminales en los sucesivos pasajes (P0-4).

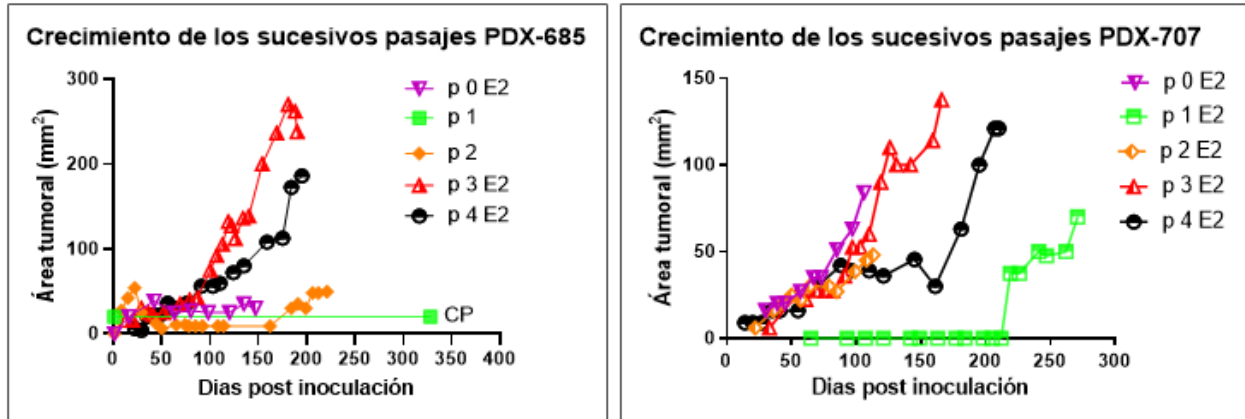


Figura R-2. Curvas de crecimiento de los PDX luminales 685 y 707. Se detallan los pasajes en donde el ratón tenía suplemento de E2. CP: pasaje realizado con cilindro de plástico.

El PDX-685 (ER+ PR+) se inoculó de forma sc. en un ratón NSG y permaneció estático por varios meses (P0). Para el P1, esa pequeña masa se transplantó dentro de un cilindro de plástico (CP) teniendo en cuenta los trabajos previos de la Dra. Pasqualini, quien sugirió que el trasplante de un tumor alogénico, que habitualmente no crece en otro animal, podía crecer siguiendo esta metodología (Saal et al., 1972). Luego de 328 días, se realizó un pasaje del contenido del CP en el sc. de otro animal (P2), siendo a partir del P3 donde se alcanzó un crecimiento tumoral más acelerado. Hipotetizamos que esto puede deberse a que en los sucesivos pasajes ocurra una selección de las células tumorales que mejor están adaptadas a crecer en el hospedador murino.

Por su parte, el PDX-707 (ER+ PR-) creció con una pendiente pronunciada en el P0 y en el P1 tuvo 200 días de latencia antes de repuntar el crecimiento tumoral. Los posteriores pasajes mostraron una pendiente de crecimiento similar a la del P0.

♥ PDX HER2+

La **Figura R-3A** ilustra el crecimiento tumoral del PDX-474 en los sucesivos pasajes (P0-5). En el P0, el tumor HER2+ tardó 255 días en llegar a un tamaño de 30 mm² en un ratón suplementado con E2. El análisis histológico de un corte del PDX P0 teñido con hematoxilina y eosina (H&E) mostró que efectivamente había células tumorales quiescentes (**Figura R-3B**). El crecimiento del P1 fue muy similar al del pasaje anterior, y aún después de 200 días, el tumor seguía siendo muy pequeño (~ 40 mm²). Recién en el P2 obtuvimos material suficiente como para transplantar cuatro ratones: dos suplementados con E2 y dos sin suplemento. Fue en este pasaje (P3) que evidenciamos que el suplemento estrogénico favoreció el crecimiento tumoral (**Figura R-3C**).

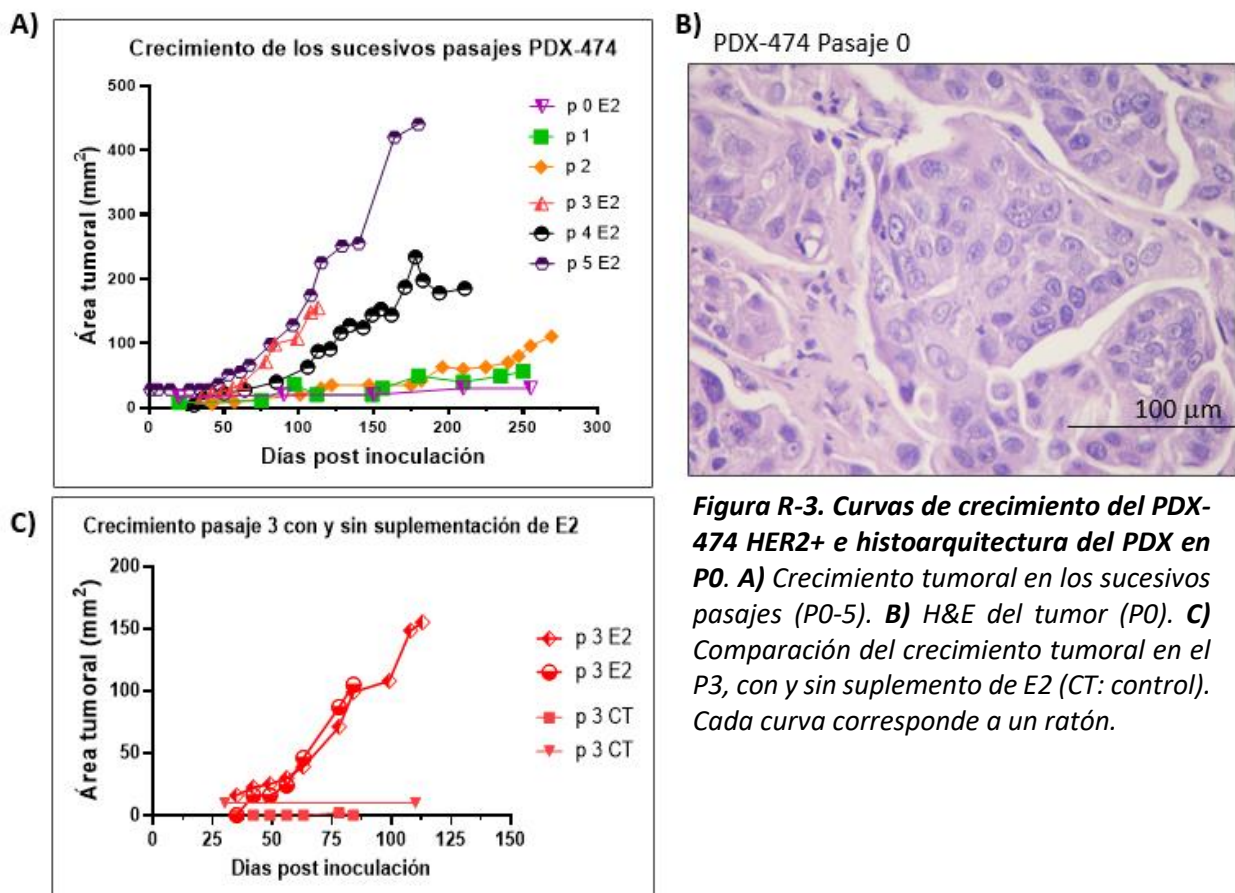


Figura R-3. Curvas de crecimiento del PDX-474 HER2+ e histoarquitectura del PDX en P0. A) Crecimiento tumoral en los sucesivos pasajes (P0-5). B) H&E del tumor (P0). C) Comparación del crecimiento tumoral en el P3, con y sin suplemento de E2 (CT: control). Cada curva corresponde a un ratón.

Características morfológicas: PDX vs. tumor parental

A continuación, evaluamos la histología del tumor parental y de su respectivo PDX en un pasaje determinado. Los estudios histopatológicos de los cortes de tumores con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) se hicieron en colaboración con la patóloga Dra. Vanzulli.

♥ PDX-485 TN

El fragmento tumoral que originó a este PDX se obtuvo de una metástasis ganglionar. Esta metástasis presentaba células claras con extensos focos necróticos (**Figura R-4**). Por su parte, el PDX (P2) presentó un patrón sólido, sin signos de diferenciación glandular, lo que concuerda con la histología del tumor parental.

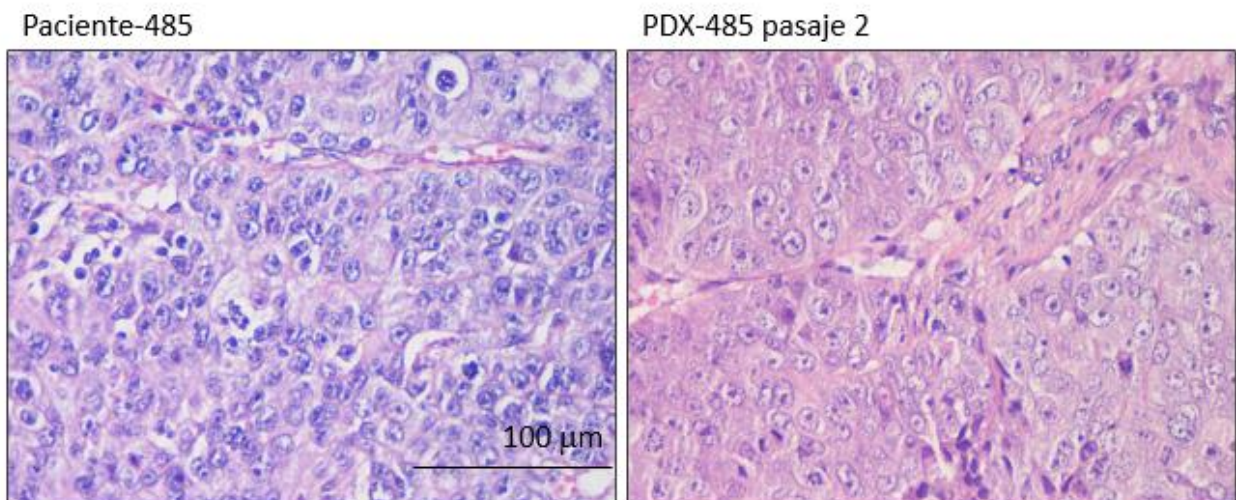


Figura R-4. Comparación de la histología de la metástasis ganglionar del paciente 485 y su respectivo PDX (P2). En ambos casos se observan imágenes de tumores indiferenciados.

♥ PDX-546 TN

El fragmento tumoral que originó este PDX era un carcinoma IC-NST indiferenciado de alto grado (**Figura R-5**). A nivel histológico, las células tumorales de la paciente eran anaplásicas con anisocariosis, grandes y presentaban mucho citoplasma. Además, se observaron algunas células binucleadas y mitosis atípicas (**flecha**). Las

células tumorales se ordenaban en cordones anastomóticos. El PDX (P2) conservó la morfología del tumor primario y los ratones presentaron células tumorales circulantes en el pulmón (**Figura R-5 abajo**).

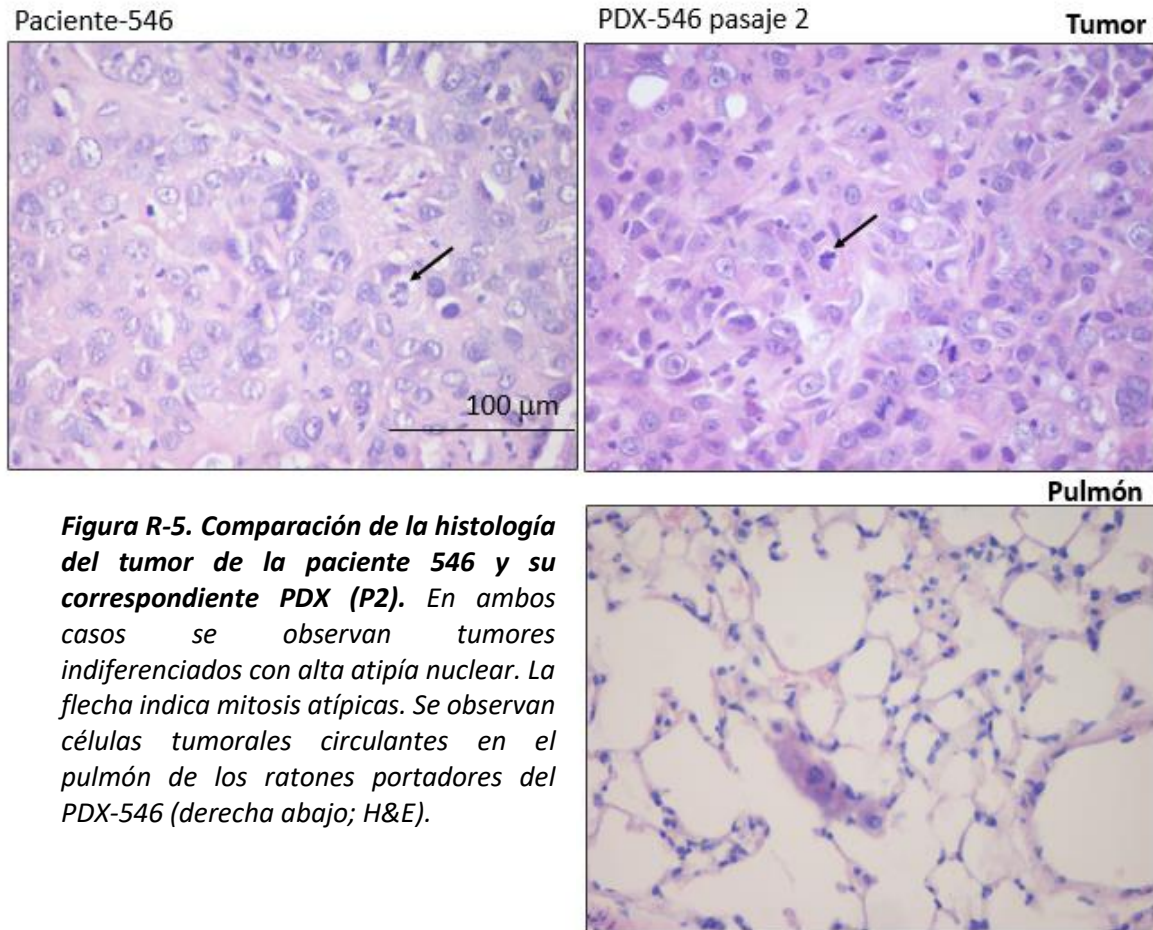


Figura R-5. Comparación de la histología del tumor de la paciente 546 y su correspondiente PDX (P2). En ambos casos se observan tumores indiferenciados con alta atipía nuclear. La flecha indica mitosis atípicas. Se observan células tumorales circulantes en el pulmón de los ratones portadores del PDX-546 (derecha abajo; H&E).

♥ PDX-553

El tumor primario de la paciente 553 era un carcinoma poco diferenciado con nidos neoplásicos irregulares separados por abundante estroma (**Figura R-6 izquierda, flecha**), en sectores fibroso y en otros con predominio de matriz. Se observaron mitosis atípicas y células apoptóticas aisladas. Los nidos neoplásicos mostraron necrosis extensas, ya sea en el centro de los nidos, tipo “comedo”, y también en su periférica. El PDX (P1) mantuvo este tipo de crecimiento.

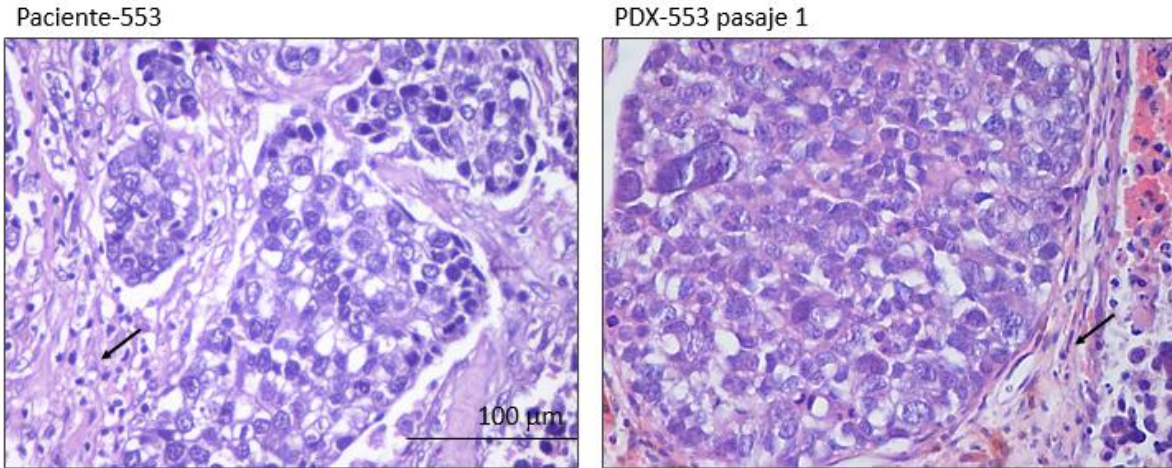


Figura R-6. Comparación de la histología del tumor de la paciente 553 y su correspondiente PDX (P1). Las flechas indican los tabiques estromales que rodean los nidos neoplásicos.

♥ PDX-631

El fragmento tumoral que originó este PDX era un carcinoma con patrón de crecimiento sólido en playas celulares extensas surcadas por tractos fibrosos gruesos que contienen infiltrado linfocitario, al igual que su PDX (**Figura R-7**). Los núcleos grandes de las células tumorales exhiben cromatina laxa, algunos polilobulados (**flecha**). Se destaca la presencia frecuente de figuras mitóticas típicas y atípicas con algunas imágenes apoptóticas o necrosis unicelular.

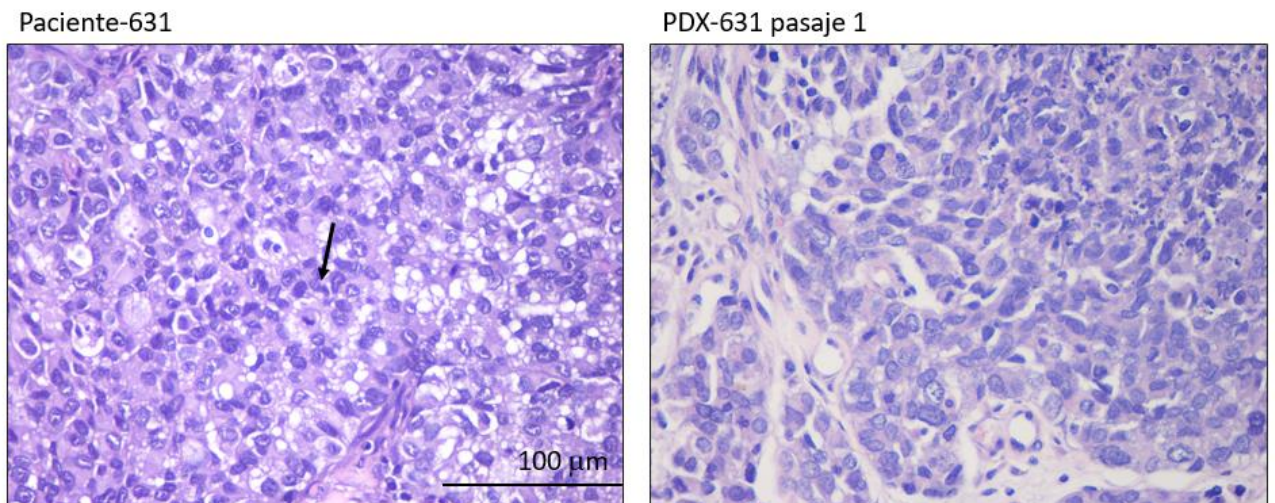


Figura R-7. Comparación de la histología del tumor de la paciente 631 y su correspondiente PDX (P1). La flecha indica el núcleo polilobulado de una célula neoplásica.

♥ PDX-687

El tumor de la paciente 687 era pobremente diferenciado, con células claras agrupadas en nidos separados por tabiques fibrosos. Estas características se mantuvieron en el PDX (**Figura R-8**).

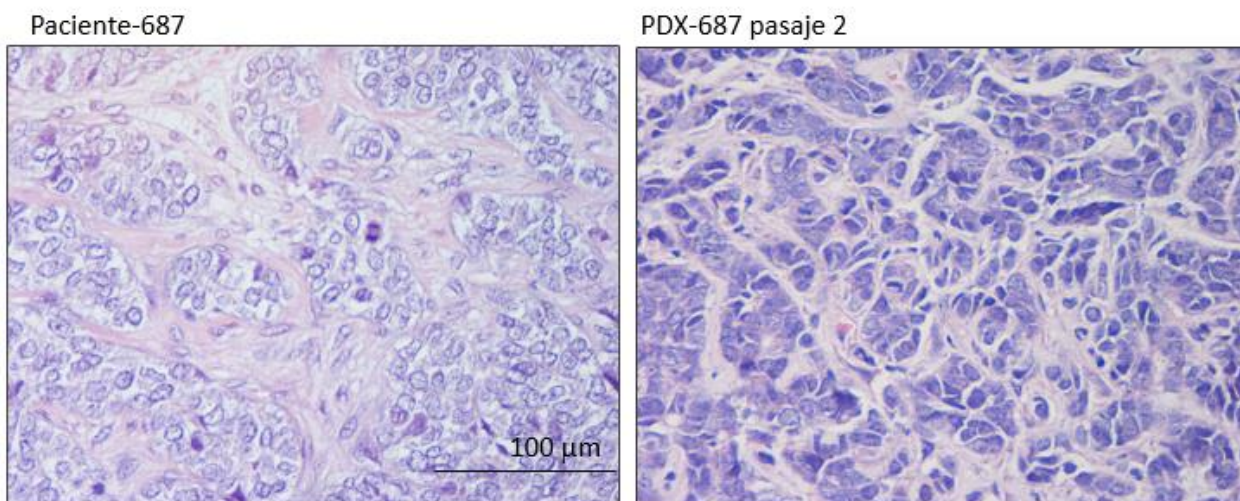
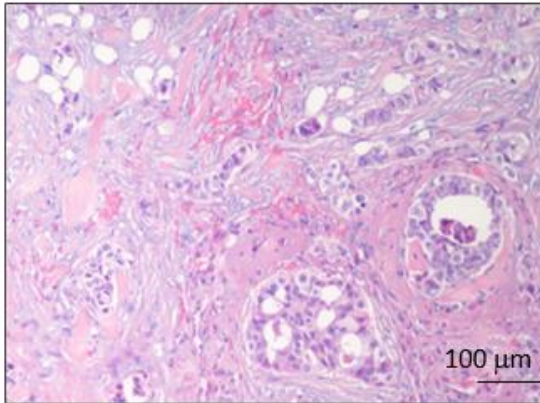


Figura R-8. Comparación de la histología del tumor de la paciente 687 y su correspondiente PDX (P2). En ambos casos se observan imágenes de tumores indiferenciados.

♥ PDX-685

Como se describió anteriormente, este PDX surgió dentro del cilindro de plástico que se implantó en el sc. de un ratón NSG. Al pasarlo al sc. de otro ratón, adquirió un tropismo que le permitió crecer dentro de los conductos de la glándula mamaria murina y mostró un crecimiento tipo “comedo” (**Figura R-9**). El tumor de la paciente 685 era un IC-NST de grado intermedio y, al analizar su histología, observamos zonas de crecimiento en cordones con esbozos de diferenciación glandular y áreas de crecimiento intraductal.

Paciente-685



PDX-685 pasaje 2

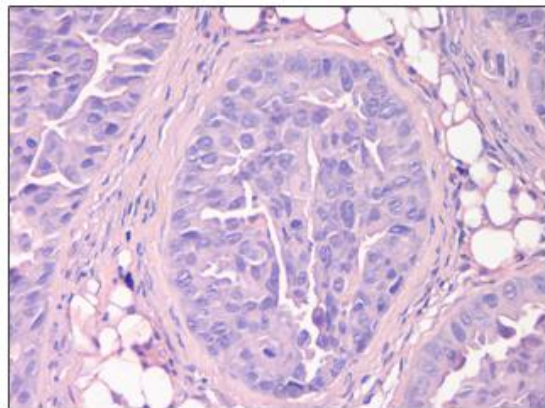
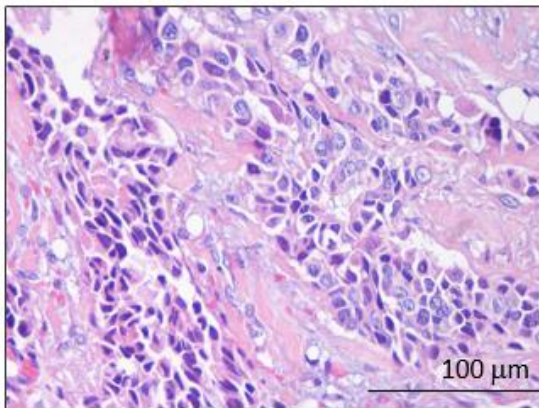
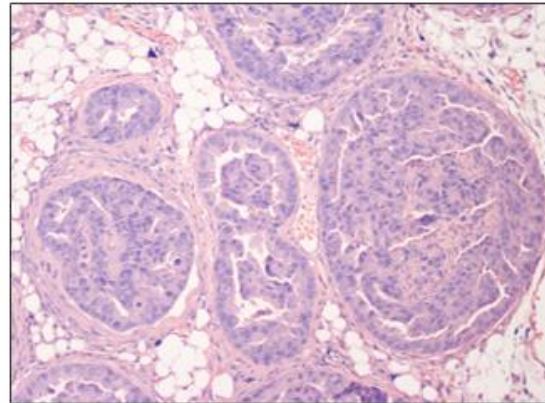


Figura R-9. Comparación de la histología del tumor de la paciente 685 y su correspondiente PDX (P2). Arriba: Imágenes de menor y mayor aumento del tumor primario (izquierda) y del PDX (derecha; H&E). En el tumor primario se observan zonas de crecimiento en cordones con esbozos de diferenciación glandular y crecimiento intraductal. En el PDX (P2) se ilustra el crecimiento intraductal. Abajo: Fotografía obtenida del PDX antes de ser extirpado. Se aprecia el crecimiento remedando la disposición de conductos mamarios.



♥ PDX-707

El tumor humano que originó el PDX-707 era moderadamente diferenciado, con mitosis frecuentes y poco estroma (**Figura R-10**). Se observan signos de muerte celular y cambios degenerativos en grupos celulares en la periferia de los nidos epiteliales. El PDX posee un grado de diferenciación mayor que el humano y se observa necrosis central, mitosis frecuentes y apoptosis aisladas.

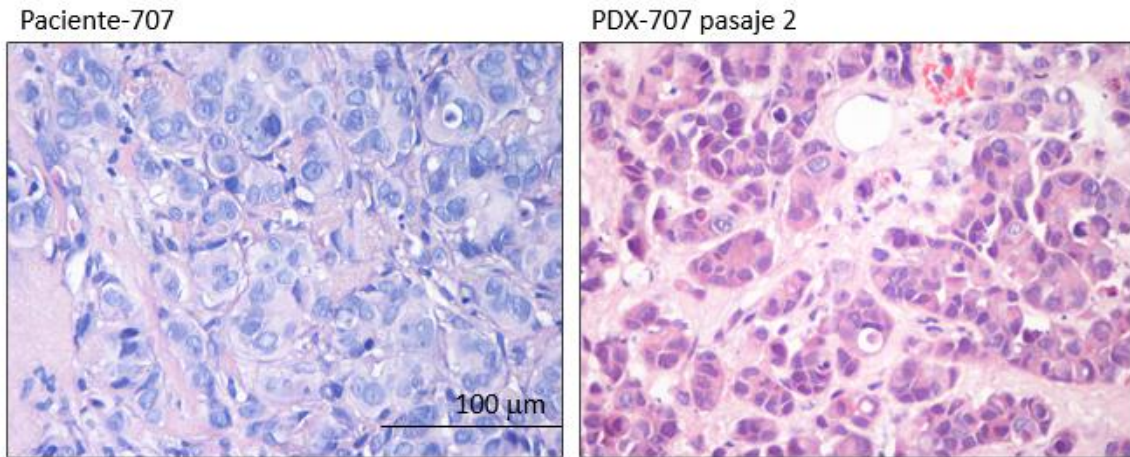
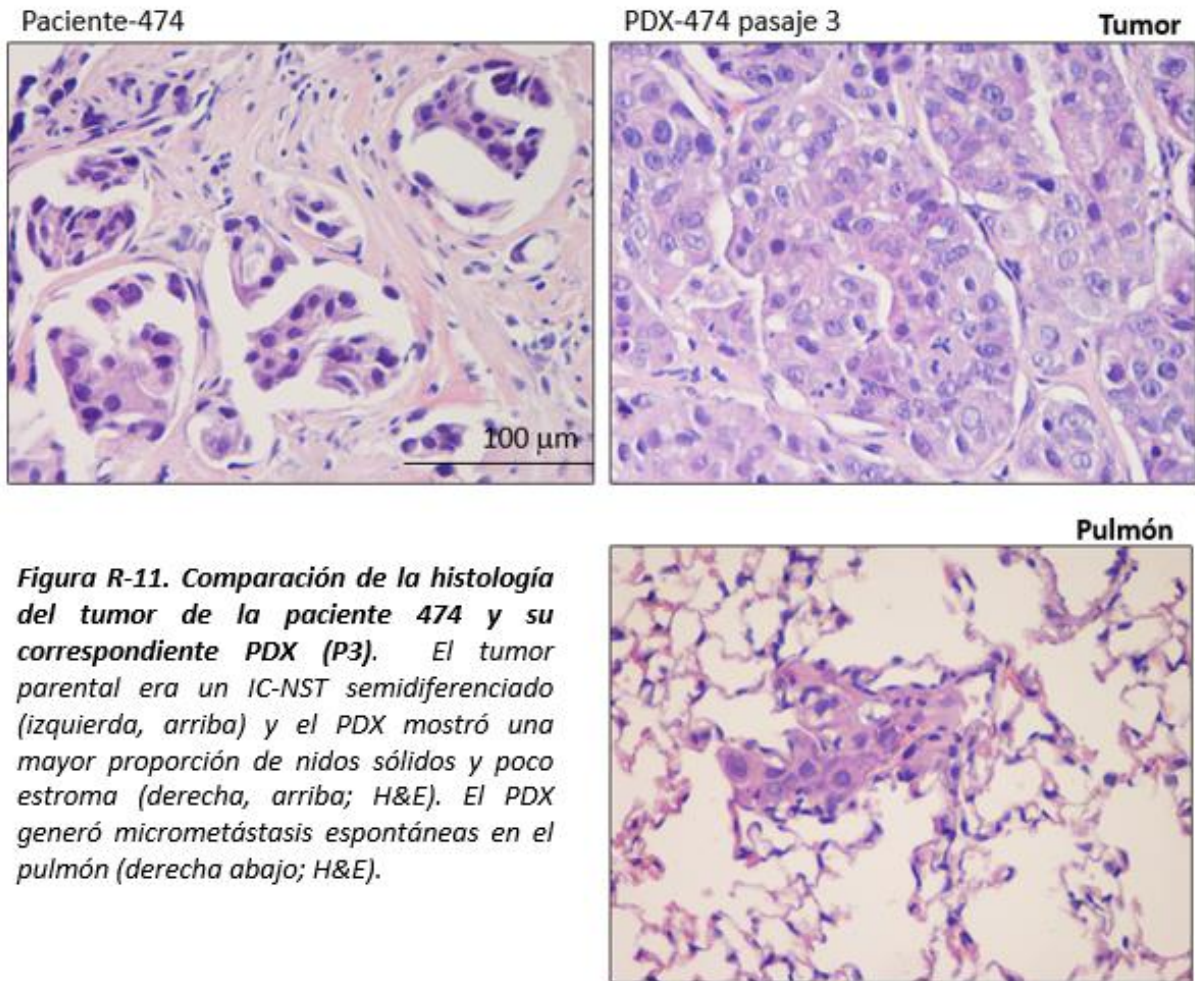


Figura R-10. Comparación de la histología del tumor de la paciente 707 y su correspondiente PDX (P2). El tumor primario era un IC-NST indiferenciado (izquierda) y el PDX muestra un patrón de nidos epiteliales sólidos (derecha; H&E).

♥ PDX-474

El tumor de la paciente 474 era un IC-NST semidiferenciado, con aproximadamente un 50% de áreas con conductos y un 50% de nidos epiteliales sólidos. Por su parte, el PDX (P3) presentó áreas diferenciadas, pero con una mayor proporción de nidos epiteliales sólidos. Además, se observó una mayor proporción de parénquima tumoral respecto al estroma y los ratones portadores del PDX-474 presentaron pequeñas metástasis pulmonares (**Figura R-11**).



Expresión de biomarcadores: PDX vs. tumor parental

Luego de establecer que los 8 PDX mantuvieron la histología del tumor parental (**Figuras R4-R11**), analizamos la expresión de los marcadores ER α , PR y HER2 en los tumores luminales (PDX-685 y PDX-707) y HER2+ (PDX-474). Las **Figuras R-12 y R-13** muestran fotos representativas de las IHQ para los tres marcadores en los tumores parentales y en sus correspondientes PDX. Los tres PDX mostraron un patrón similar de expresión que los tumores que les dieron origen. No realizamos el análisis de expresión de estos biomarcadores en los PDX del subtipo TN.

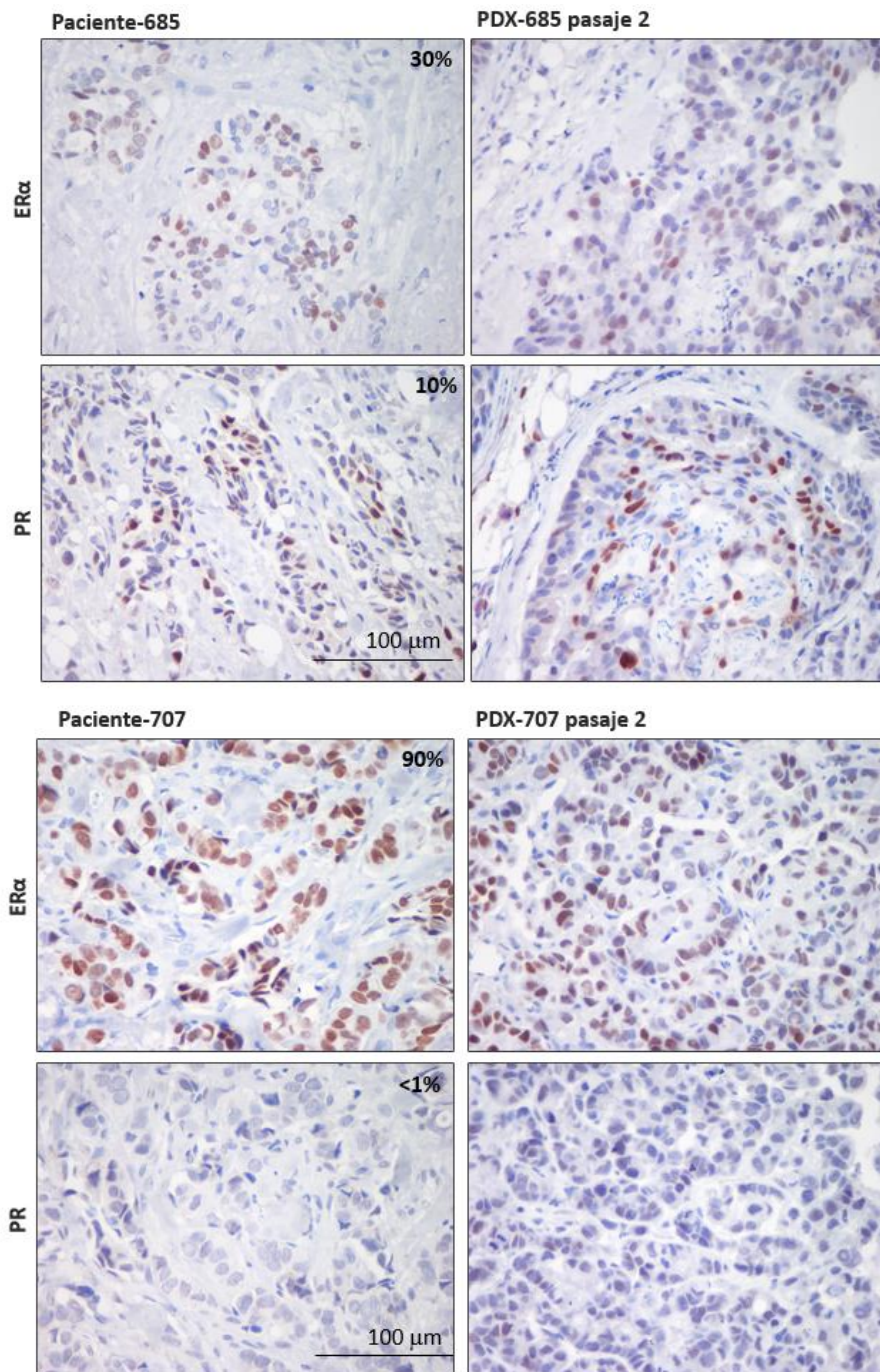


Figura R-12. Expresión de ER α y PR en el tumor de las pacientes 685, 707 y en sus correspondientes PDX (P2). Los PDX luminales conservaron los niveles de ER α y PR que tenían los tumores parentales (se indica el porcentaje de células positivas para cada receptor hormonal).

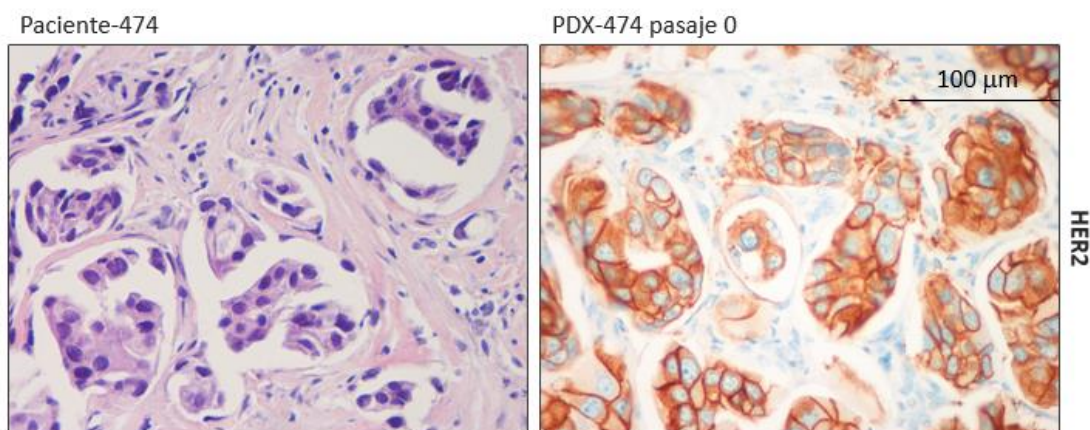
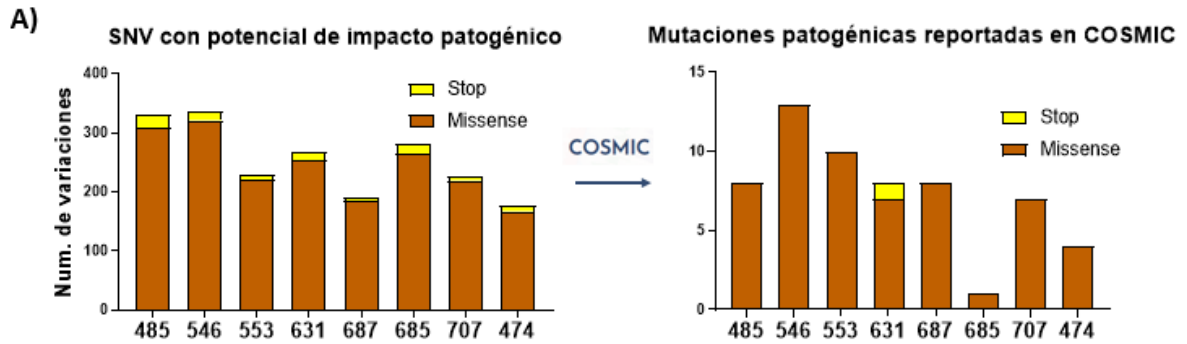


Figura R-13. Expresión de HER2 en el PDX-474 (P0). Se ilustra la H&E del tumor de la paciente 474 que es HER2+ (izquierda). El PDX muestra una histología similar a la del tumor parental y una alta expresión de HER2 en la membrana de las células neoplásicas (clasificación 3+).

Análisis de alteraciones genómicas: *Whole exome sequencing* (WES)

♥ *Mutaciones patogénicas reportadas en cáncer en general*

Con el objetivo de ahondar en la caracterización de los 8 PDX establecidos en nuestro Biobanco, se secuenció el exoma (Exome-Seq) y analizamos su perfil mutacional. La **Figura R-14 A izquierda**, muestra el número de variaciones de nucleótido único (SNV) con potencial impacto patogénico detectados en el análisis. Para ello, se analizaron y filtraron todas las SNV usando un algoritmo de predicción de impacto, y se muestran sólo aquellas con un impacto “moderado a alto” de la sustitución aminoacídica sobre la estructura proteica. Luego, utilizamos la base de datos COSMIC (que contiene un catálogo de mutaciones somáticas presentes en cánceres humanos), y evaluamos cuáles de las SNV habían sido previamente reportadas como patogénicas en cáncer en general (**Figura R-14 A derecha**). En la tabla de la **Figura R-14 B**, se detallan los genes con dichas mutaciones.



B)

Subtipo	PDX	P	Mutaciones patológicas reportadas en COSMIC
TNBC	485	P1	CDH7, EEFSEC, FOXD4L1, HELZ2, KBTBD13, PRDM16, SEC31B, TENM4
TNBC	546	P2	ADAMTSL4, CNGA3, G6PC, ITGB3, KMT2C, LVRN, MOB1B, NHS, NUSAP1, PDIA2, TP53, TRPM8, TYRO3
TNBC	553	P0	ARMCX3, C17orf53, CNGA3, DNALI1, GRM3, KMT2C, PABPC1, PSD2, RREB1, ZFHX3
TNBC	631	P1	DVL2, KIAA1462, NRCAM, NTM, SYT3, TTBK1, TP53
TNBC	687	P2	CAND2, MYO1C, OR4D2, PABPC1, PIK3CA, RNASEH2A, SLC30A8
Luminal	685	P1	ALDH1L1
Luminal	707	P0	DAAM2, IARS2, LIN9, MYO5C, TENM4, TNC, VAV3
HER2+	474	P1	ADCY5, ARHGAP31, GLI1, KMT2C

Figura R-14. SNV detectadas en los PDX. A) Se analizó el exoma de los 8 PDX por WES. El flujo de trabajo de PDXnet se completó con éxito con los datos de PDX Argentina en Cancer Genomics Cloud. **Izquierda:** Número de SNV con potencial de impacto “moderado a alto” de la sustitución aminoacídica. **Derecha:** Mutaciones patológicas filtradas con COSMIC. **B)** Se detallan los genes afectados por dichas mutaciones patológicas en cada uno de los PDX.

♥ *SNV en genes driver de CaM*

Luego, nos interesó identificar cuáles de las SNV detectadas por el WES impactaban sobre genes *driver* de cáncer de mama. Para ello, utilizamos la herramienta IntOGen (Integrative Onco Genomics). En la **Figura R-15**, se ilustran las mutaciones en genes *driver* de CaM identificadas en cada PDX.

El gen con mayor frecuencia de mutación fue *ZFHX3*, cuya proteína tiene actividad de regulador transcripcional. En CaM se sugiere que *ZFHX3* es un gen supresor de tumores ER+ al inhibir la transcripción mediada por dicho receptor y la proliferación (Dong et al., 2010). Llamativamente, todos los PDX mostraron la misma sustitución

V777A en dicho gen. Además, los PDX-546 y PDX-553 tenían la sustitución D270Y y A2749V, respectivamente.

El segundo gen más frecuentemente mutado fue *KMT2C*, el cual posee actividad de H3K4 metiltransferasa. La sustitución R380L se encontró en 3 PDX (PDX-546, PDX-553 y PDX-685). Mientras que los PDX-474 y PDX-631, poseían la mutación K339N y C362F, respectivamente.

Cabe destacar que todos los PDX presentaron mutaciones en genes *driver*. Sin embargo, solo aquellas encontradas en los genes *TP53* y *PIK3CA*, habían sido reportadas previamente como patogénicas en CaM.

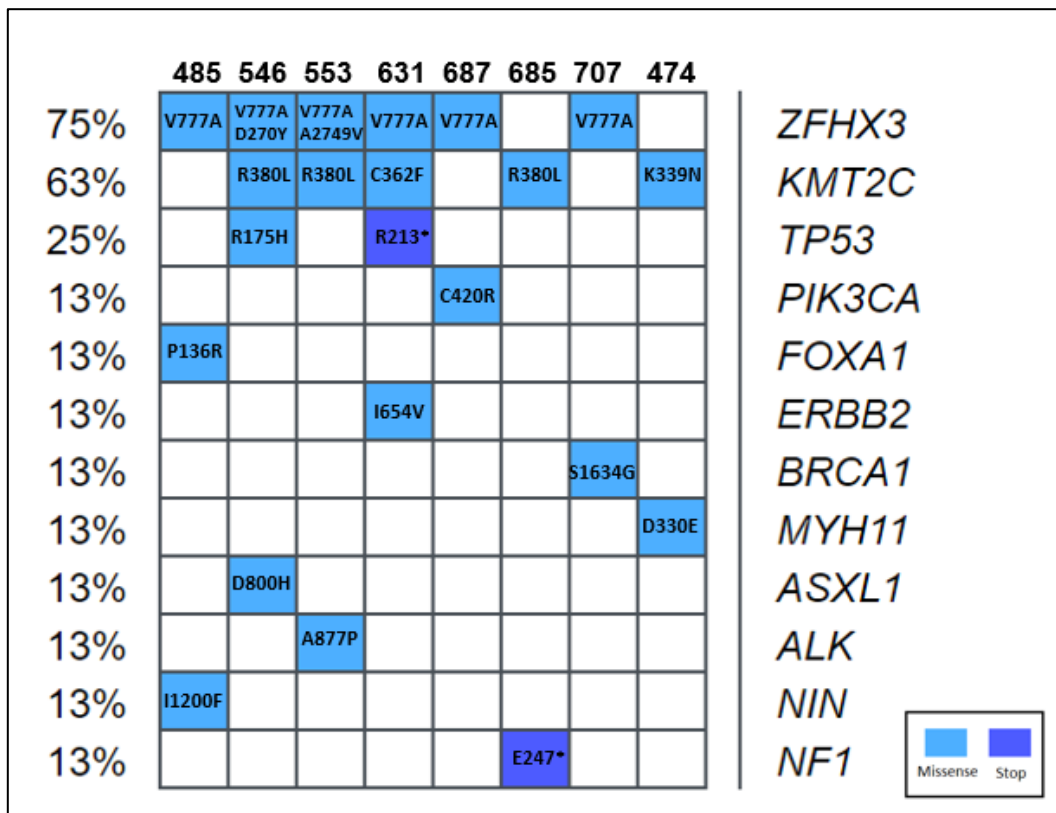


Figura R-15. Mutaciones en genes driver de los 8 PDX. Izquierda: Frecuencia de mutaciones missense (celestes) y stop (azules) encontrados en genes driver de CaM en los PDX. **Derecha:** Mutaciones de genes driver encontradas en cada PDX.

El gráfico de la **Figura R-16** muestra la frecuencia mutacional de genes *driver* de CaM (extraído de IntOGen). Al cotejarlo con nuestras muestras, encontramos que los 3 genes más frecuentemente mutados en CaM, *PIK3CA*, *TP53* y *KMT2C* están

representados en nuestros modelos PDX. De esta forma, los PDX del Biobanco reflejan las mutaciones frecuentes que se encuentran en pacientes.

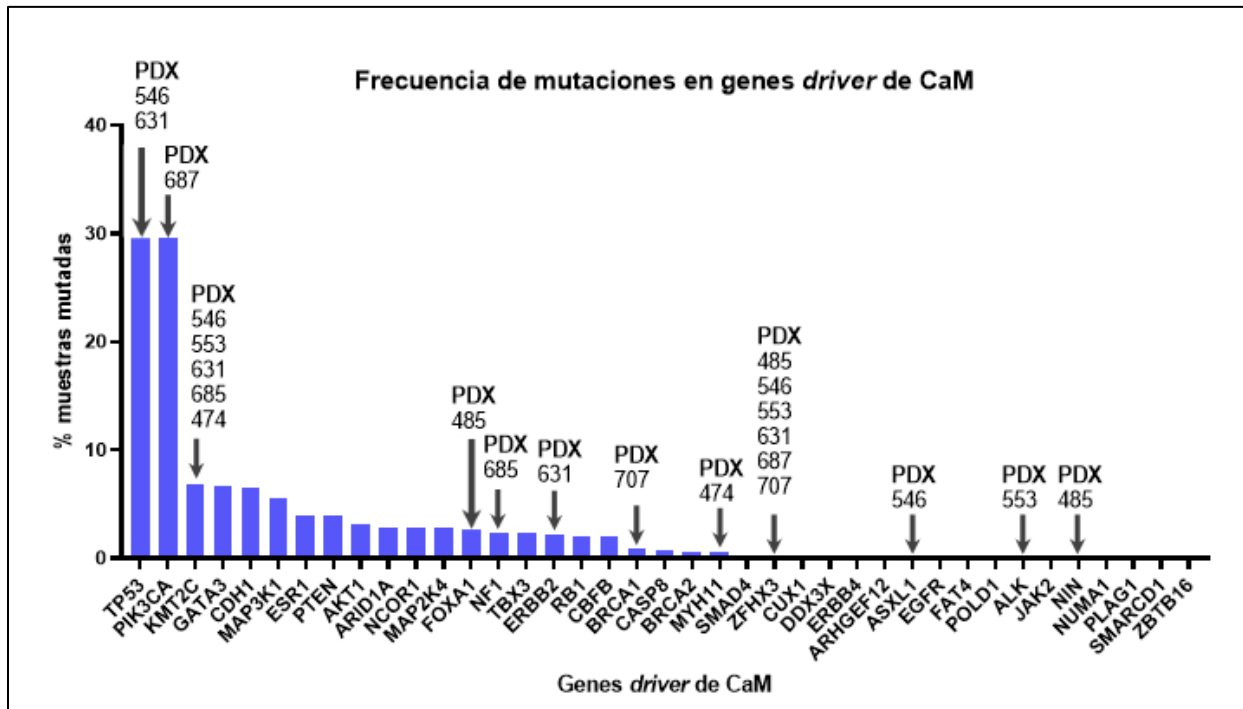


Figura R-16. Porcentaje de mutaciones en genes driver de CaM. La base de datos IntOGen recopila la información de 12 cohortes de CaM en donde se estudian mutaciones de genes driver. El gráfico muestra el porcentaje de muestras mutadas en cada uno de los genes driver en dichas cohortes. Con flechas se indican las mutaciones detectadas en los PDX establecidos en nuestro Biobanco.

♥ *Otras mutaciones relevantes en la carcinogénesis de CaM*

Para continuar con la caracterización de los PDX, evaluamos qué sucedía con aquellos genes que no son clasificados como genes *driver*, pero que son relevantes en la carcinogénesis de CaM. La **Tabla R-5** muestra los genes que se asocian al desarrollo y/o progresión de la carcinogénesis mamaria, pero cuyas mutaciones encontradas en nuestros PDX no han sido, hasta el momento, reportadas como patogénicas.

Subtipo	PDX	SNV no patogénicas en vías relacionadas con CaM (sustitución)
TNBC	485	IRS1 (R457G), ADAMTS19 (R868T)
TNBC	546	FGFR1 (A23V)
TNBC	553	BIRC6 (R2890*, R3926C)
TNBC	631	STAT5A (H588Y), TGFBR3 (P777S)
TNBC	687	WNT4 (R83Q)
Luminal	707	ADRA1A (C347R)
Luminal	685	NOTCH1 (D1698N)
HER2+	474	CDK12 (E985K)

Tabla R-5. SNV detectadas en los PDX y que se asocian a vías relevantes para el desarrollo y/o progresión de la carcinogénesis mamaria.

Sensibilidad a tratamientos estándares

Una de las principales utilidades de los modelos PDX es que tienen la capacidad de reflejar la sensibilidad a drogas del tumor parental. Para corroborar que esta característica se mantenía en los PDX que establecimos, evaluamos la respuesta a distintas drogas *in vivo* en 4 PDX, y lo cotejamos con la información disponible de la paciente. Brevemente, inoculamos los tumores de cada PDX en ratones NSG y tratamos a los animales con las terapias estándares según el subtipo tumoral. En cada una de las figuras que aparecen a continuación, incluimos un cuadro que muestra la línea temporal resumiendo la historia clínica cada paciente; incluyendo el diagnóstico, tratamiento, cirugía, seguimiento y obtención de la muestra para la generación del PDX.

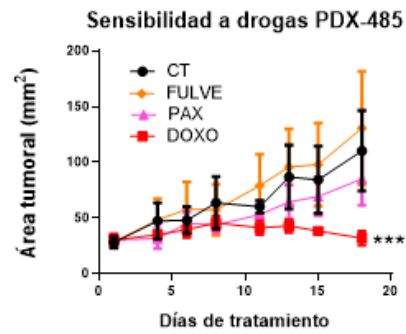
♥ PDX-485

El tumor primario de la paciente 485 era ER+ PR+ HER2-, pero la recurrencia se convirtió en ER-PR-HER2-. Por esto, elegimos la terapia estándar para tumores luminales, un degradador del ER (Fulvestrant, FULVE), y quimioterápicos (Paclitaxel, PAX y Doxorubicina, DOXO) para los ensayos *in vivo*. El panel de la izquierda de la **Figura R-17 A** muestra la curva de crecimiento del PDX luego de 18 días de tratamiento con las respectivas drogas. Se evidencia que DOXO fue la única terapia que inhibió significativamente el crecimiento tumoral ($p < 0,001$). Sin embargo, a tiempo final no observamos una reducción significativa de los niveles del índice proliferativo Ki67, determinados por IHQ (**Figura R-17 A derecha**). Posiblemente, esto se debe a que el tratamiento con DOXO indujo necrosis extendidas (**Figura R-17 B, flecha**), pero que las células tumorales remanentes, resistentes al tratamiento, mantuvieron su capacidad proliferativa. Si bien PAX no inhibió significativamente el crecimiento tumoral, ni redujo los niveles de Ki67, se observa una tendencia a la reducción. Esto coincide con las imágenes histológicas de los tumores al finalizar el ensayo (H&E) que mostraron características típicas del tratamiento con PAX, como por ejemplo la presencia de células con macronúcleos (**Figura R-17 B flecha**).

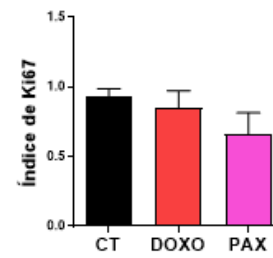
A)

Paciente-485
Tumor primario: luminal
Recurrencia: TN

- 1º: antraciclina y taxanos
- Recidiva: TN
- Cx → PDX-485
- 2º: taxanos
- Óbito



Expresión de Ki67 luego del tratamiento *in vivo*



B)

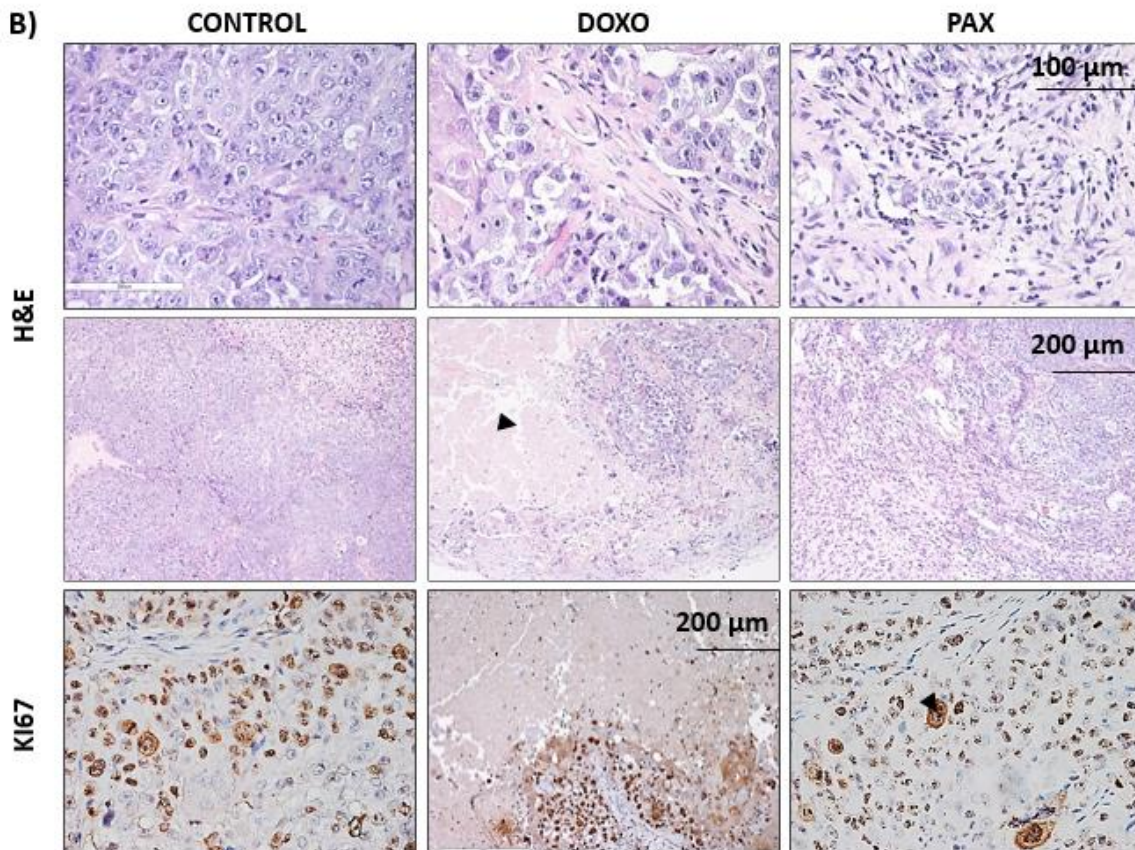


Figura R-17. Efecto de FULVE, DOXO y PAX sobre el crecimiento del PDX-485 y la expresión de Ki67. A) Izquierda: Historia clínica. Derecha: Curva de crecimiento tumoral del PDX-485 (P2). Se transplantó el tumor en ratones hembra NSG. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~30 mm² comenzó la administración de Fulvestrant (FULVE; 250 mg/kg/semana sc.), Paclitaxel (PAX; 15 mg/kg/4 días por semana iv.), Doxorubicina (DOXO; 4,5 mg/kg/semana iv.) durante 18 días. Se utilizaron 4 ratones hembra por grupo experimental. Al finalizar el experimento, evaluamos los niveles del marcador proliferativo Ki67. Se muestra $\bar{X} \pm DE$ de 10 campos tomados al azar. B) Histopatología de los tumores (H&E). El tratamiento con DOXO indujo extensas áreas de necrosis (flecha). Se observaron macronúcleos típicos del tratamiento con PAX (flecha). *** $p < 0,001$. Cx: Cirugía de la paciente y obtención del fragmento tumoral para generar el PDX.

Posteriormente, evaluamos la sensibilidad a estos mismos quimioterápicos, pero en ensayos *ex vivo*. Para ello, cortamos finas secciones del PDX en un vibrátomo y las expusimos por 48 horas a los diferentes tratamientos en cultivo. Al cabo de este tiempo, realizamos la inmunomarcación para Ki67 como una medida del índice proliferativo en respuesta a los quimioterápicos. Observamos que solamente el tratamiento con DOXO disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la proliferación celular (**Figura R-18**), mostrando una concordancia entre los resultados *in vivo* y *ex vivo*.

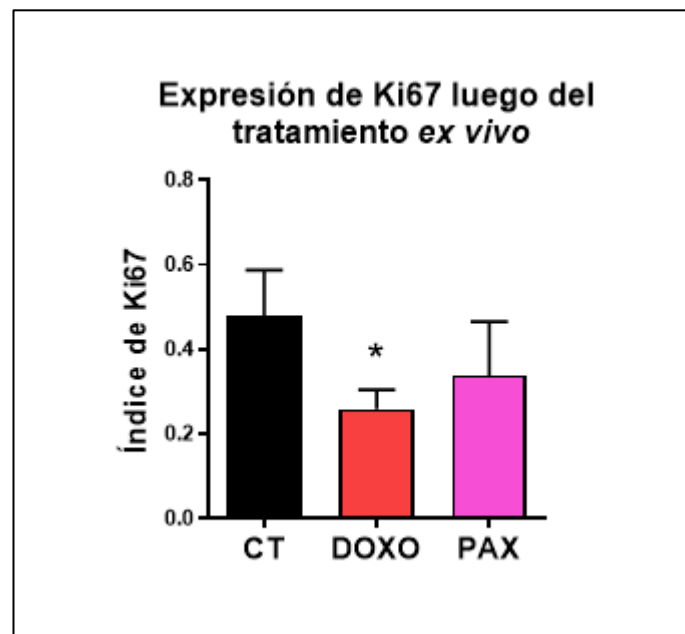


Figura R-18. Tratamiento *ex vivo* con DOXO y PAX del PDX-485. Índice de Ki67 luego de 48 horas de tratamiento con Doxorubicina (DOXO; 1 μ M) y Paclitaxel (PAX; 50 nM). *: $p < 0,05$. Se muestra $\bar{X} \pm DE$ de 6-8 campos tomados al azar. Se utilizaron de 3 a 5 secciones por tratamiento. El experimento se realizó dos veces. CT: control.

♥ PDX-685

La terapia seleccionada para el PDX-685 fue tamoxifeno ya que se trataba de un tumor ER+. Se observó que, el tratamiento por 24 días indujo una inhibición significativa del crecimiento tumoral (**Figura R-19, izquierda**). El panel de la derecha de la **Figura R-19** muestra una fotografía de los tumores y su peso al finalizar el ensayo. Si bien no detectamos una diferencia significativa en el peso tumoral final entre tratamientos, se observa que TAM tiende a disminuir el peso. A la paciente 685 le resecaron el tumor primario hace 4 años. Desde entonces, recibe tratamiento con Anastrozole, un inhibidor de aromatasa no esteroide y no ha mostrado evidencias de progresión de la enfermedad. Esto indica que la terapia antiestrogénica es efectiva tanto en la paciente como en el modelo PDX.

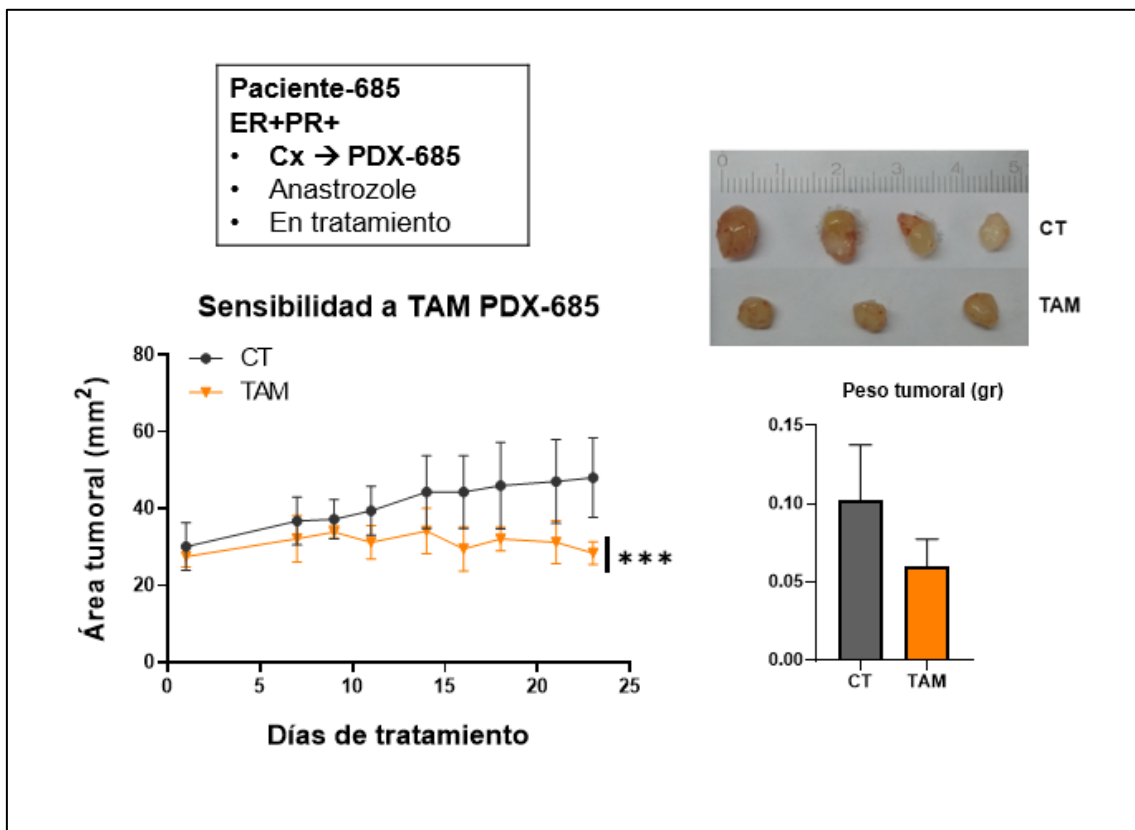


Figura R-19. Efecto del tamoxifeno (TAM) sobre el crecimiento del PDX-685 y su peso tumoral. El PDX-685 (P4) se transplantó en ratones hembra NSG. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~ 25 mm² comenzó la administración de tamoxifeno (TAM; 5 mg/kg/día sc.) durante 24 días. Al finalizar el ensayo, los tumores se extrajeron, fotografiaron y pesaron. Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Se utilizaron 3-4 ratones por grupo experimental. En la imagen se muestran fotografías de los tumores a tiempo final; ****: $p < 0,0001$. CT: Control; Cx: Cirugía de la paciente y obtención del fragmento tumoral para generar el PDX.

♥ PDX-707

El tumor de la paciente 707 y su correspondiente PDX expresaban ER α por lo que se evaluó la sensibilidad del PDX a TAM. Observamos que luego de 51 días de tratamiento, los PDX regresionaron casi totalmente (**Figura R-20**). La paciente lleva 4 años de tratamiento con TAM luego de la cirugía de resección del tumor primario, sin evidencias de progresión de la enfermedad. Estos resultados demuestran que el PDX-707 refleja la sensibilidad del tumor original, y que es un buen modelo para evaluar terapias contra ER.

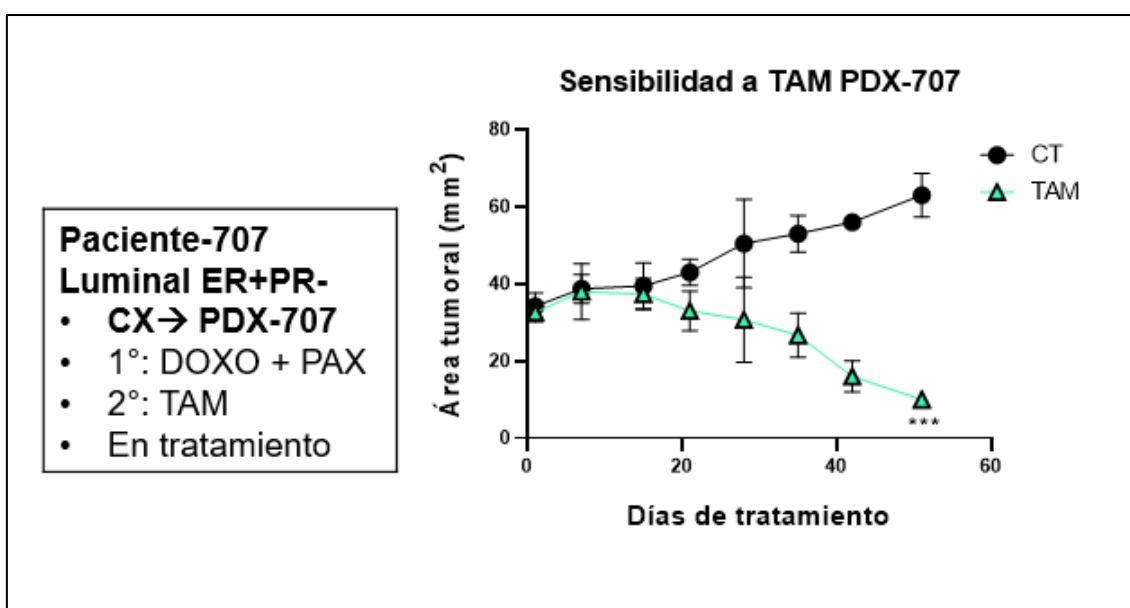


Figura R-20. Efecto del tamoxifeno (TAM) sobre el crecimiento del PDX-707. El PDX-707 (P3) se transplantó en ratones hembra NSG. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~ 30 mm² comenzó la administración de tamoxifeno (TAM; 5 mg/kg/día sc.) durante 51 días. Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Se utilizaron 4 ratones por grupo experimental. ***: $p < 0,001$. CT: Control; Cx: Cirugía de la paciente y obtención del fragmento para generar el PDX. Experimento realizado en colaboración con la Dra. Lamb.

♥ PDX-474

El tumor de la paciente 474 y su correspondiente PDX (P0) sobreexpresaban HER2, por lo que evaluamos la sensibilidad del PDX a anticuerpos contra esta proteína: trastuzumab (TZ) y trastuzumab emtansina (TDM1) (**Figura R-21**). Observamos que ambos anticuerpos inhibieron el crecimiento tumoral de forma significativa ($p < 0,001$), siendo TDM1 la terapia más efectiva. La paciente no respondió al tratamiento con TZ, ya que posteriormente recurrió a la enfermedad. Posiblemente esto se deba a que la paciente tenía una enfermedad avanzada al momento del inicio de la terapia combinada PAX+TZ.

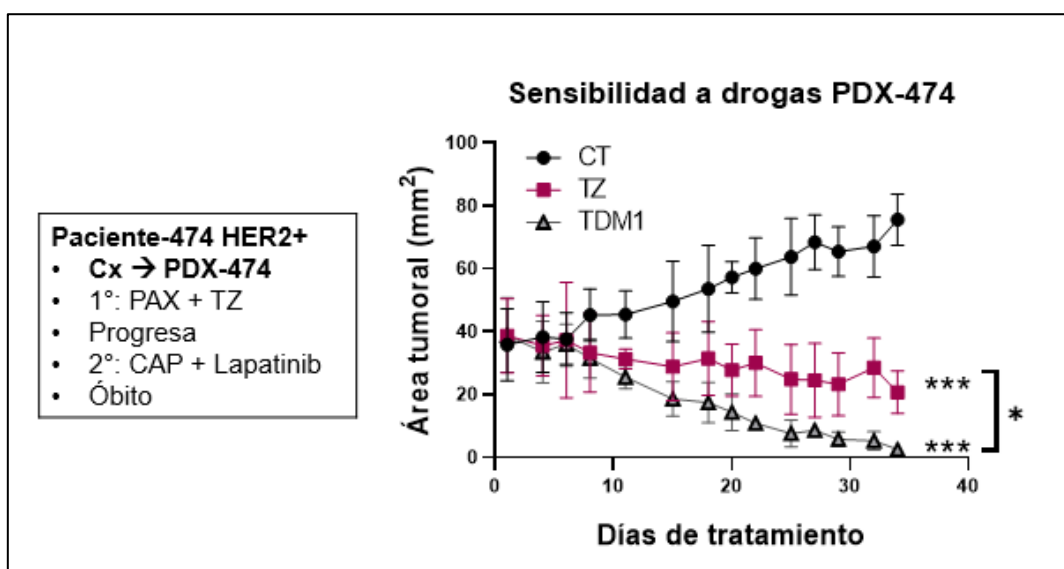


Figura R-21. Efecto de los anticuerpos anti-HER2 sobre el crecimiento del PDX-474. El PDX-474 (P5) se transplantó en ratones hembra NSG. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de $\sim 38 \text{ mm}^2$ comenzó la administración de trastuzumab (TZ; 15 mg/kg/3 días por semana ip.) y trastuzumab emtansina (TDM1; 15 mg/kg/3 días por semana ip.) durante 34 días. Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Se utilizaron 4 ratones por grupo experimental. ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$. CT: Control; PAX: Paclitaxel. CAP: Capecitabina; Cx: Cirugía de la paciente y obtención del fragmento para generar el PDX.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO DE PDX

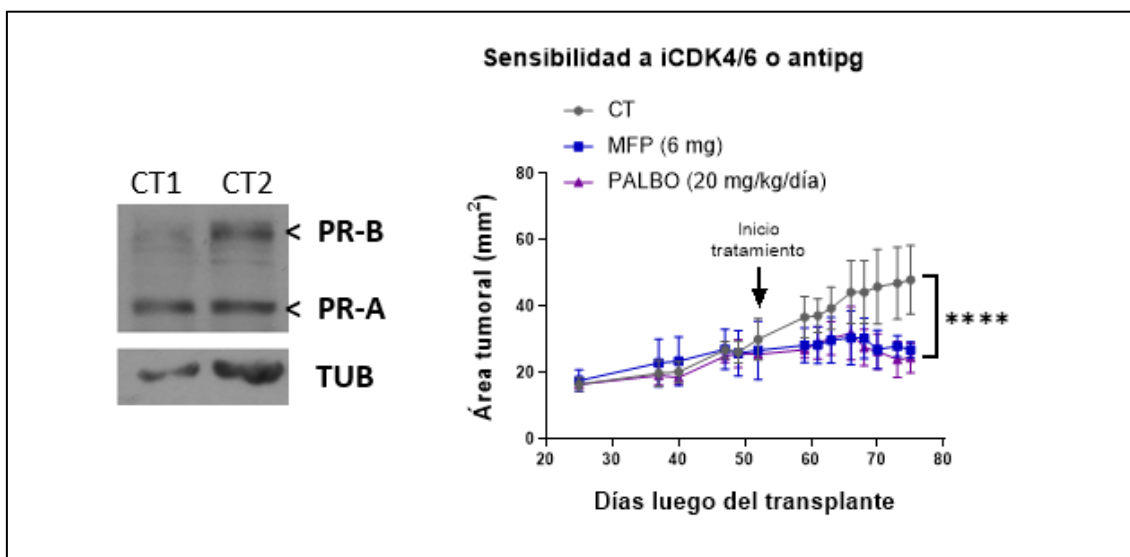
- Establecimos un total de 8 PDX de los subtipos TN, HER2+ y luminal a partir de tumores de pacientes con CaM que asistieron a un Hospital del conurbano bonaerense.
- Los PDX mantienen el patrón histológico y niveles de ER α , PR y HER2 del tumor parental.
- Tres de los PDX TN mostraron mutaciones patogénicas conocidas en dos de los genes más frecuentemente mutados en CaM: *PIK3CA* y *TP53*. Estos PDX podrían utilizarse para evaluar el efecto de inhibidores específicos de estas vías en ensayos *in vivo*.
- Cinco de los 8 PDX establecidos mostraron mutaciones en el gen *driver ZFH3*. Todas las mutaciones afectaron el mismo *hotspot*. Además, 3 de las 5 mutaciones presentes en el gen *driver KMT2C* afectaron a la misma posición nucleotídica, lo que sugiere la necesidad de estudiar con más rigurosidad la relevancia de estos sitios.
- Los dos PDX luminales y el HER2+ establecidos podrían utilizarse como modelos para estudiar nuevas terapias endócrinas o dirigidas a HER2, respectivamente. De hecho, seleccionamos al PDX-685 luminal para llevar a cabo parte del segundo objetivo de este trabajo de tesis: **Evaluar el efecto de la terapia combinada de iCDK4/6 con antiprogestágenos.**

2) SENSIBILIDAD A LA TERAPIA COMBINADA CON IC DK4/6 Y ANTIPROGESTÁGENOS EN MODELOS DE CAM DEL SUBTIPO LUMINAL

Se evaluó el efecto terapéutico del iCDK4/6 PALBO y el antiprogéstágeno (antipg) MFP en diferentes modelos de CaM luminal.

Modelo PDX-685

Si bien sabíamos que el tumor de la paciente 685 y su respectivo PDX eran del subtipo luminal, no conocíamos la relación de isoformas de PR, clave en la sensibilidad a la terapia con antiprogéstágenos. Cuando evaluamos la proporción de isoformas del receptor presentes en el PDX por WB, lo clasificamos como PRA-H. Posteriormente, ensayamos las respuestas *in vivo* a las terapias simples con MFP o PALBO. Observamos que ambas drogas inhibieron significativamente el crecimiento del PDX, mostrando respuestas muy similares (**Figura R-22 arriba**; $p < 0,0001$). Este resultado concuerda con los pesos tumorales registrados al finalizar el experimento (**Figura R-22 abajo**; $p < 0,05$).



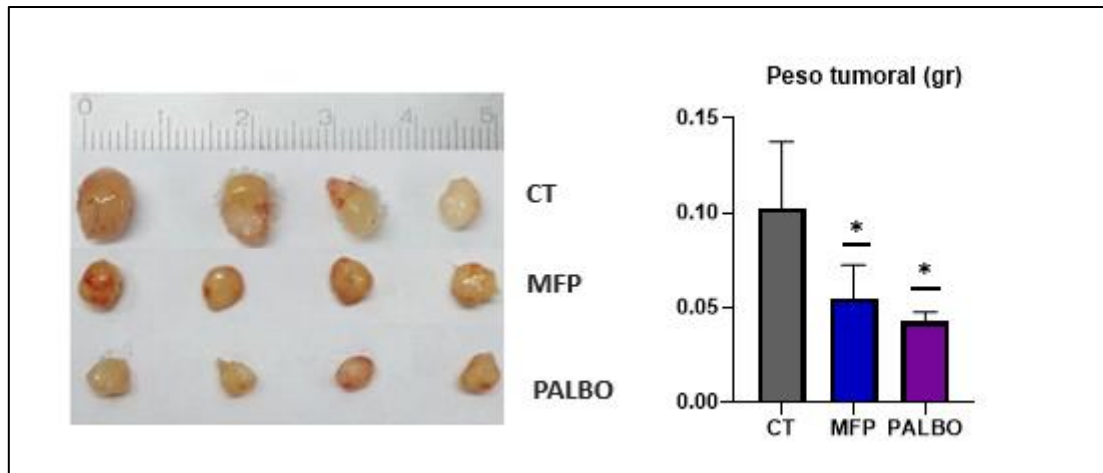


Figura R-22. Efecto de las terapias simples MFP y PALBO sobre el crecimiento del PDX luminal 685. El PDX-685 (P5) se transplantó en ratones hembra NSG. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de $\sim 30 \text{ mm}^2$ comenzó la administración de mifepristona (MFP; 6 mg/pellet) o palbociclib (PALBO; 20 mg/kg/día sc.) durante 23 días. **Arriba:** WB (izquierda) para PR de dos tumores. Se utilizó tubulina (TUB) como control de carga. Curva de crecimiento tumoral (derecha). Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Este experimento se realizó una sola vez. **Abajo:** Fotografías (izquierda) y peso de los tumores al finalizar el tratamiento con MFP o PALBO (derecha). CT: Control. ****: $p < 0,0001$; * $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta que una de las funciones de los iCDK4/6 es reducir la fosforilación de RB a continuación, evaluamos si MFP y PALBO afectaban el estado de fosforilación de RB en este modelo. Para ello, analizamos por IHQ los niveles de pRB luego de los tratamientos. Como era de esperar, PALBO redujo significativamente ($p < 0,01$) los niveles de pRB (**Figura R-23**). Interesantemente, MFP también disminuyó la fosforilación de dicha proteína ($p < 0,05$). Para los estudios posteriores estudiamos los niveles de pRB sin evaluar los niveles de la proteína total RB dado que el anticuerpo con el que contamos no funciona para la técnica de IHQ.

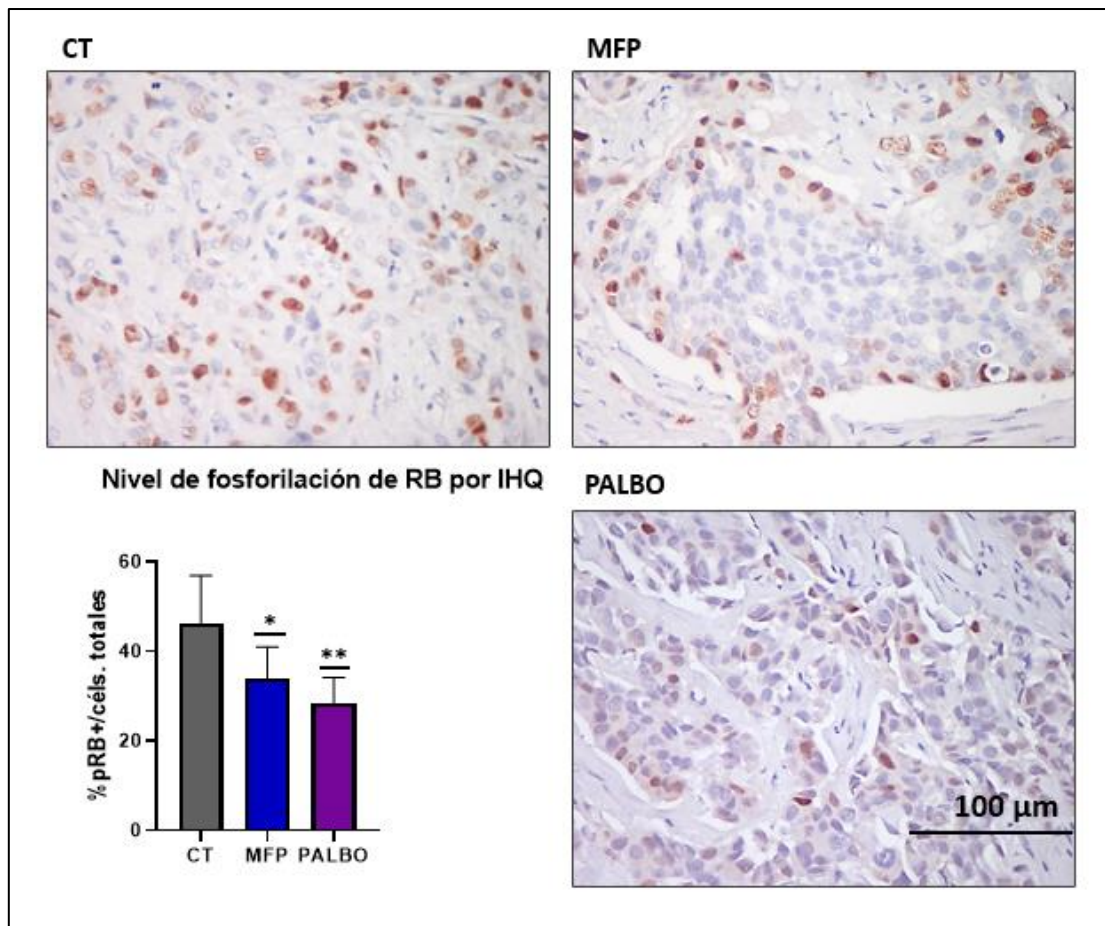


Figura R-23. Efecto de las terapias simples MFP y PALBO sobre los niveles de pRB del PDX-685. Imágenes representativas de las IHQ para pRB de los tumores tratados por 23 días. Contraintinción: Hematoxilina. Se cuantificaron las células tumorales positivas para la marca en función del total de células tumorales por campo. Se muestra $\bar{X} \pm DE$ de 10 campos tomados al azar (abajo izquierda). CT: Control. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Estos hallazgos indican que las terapias simples con MFP y PALBO inhiben el crecimiento tumoral en el modelo luminal PDX-685 y que el efecto está acompañado de una disminución en los niveles de pRB en las células neoplásicas. A continuación, nos interesó evaluar el efecto del tratamiento combinado, para lo cual utilizamos el modelo murino establecido hace años en el laboratorio.

Modelo murino

Se utilizaron dos familias de carcinomas mamarios inducidos por MPA: la familia 59 y la familia C4. Todos los tumores son del subtipo luminal, ya que expresan ER α y PR. Ambas familias cuentan con variantes sensibles y resistentes al tratamiento con MFP,

de acuerdo con la prevalencia de la isoforma de PR. En la **Tabla R-2** recordamos sus principales características:

Familia	59		C4	
<i>Variante</i>	59-HI	59-2-HI	C4-2-HI	C4-HI
<i>Respuesta a MFP</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible
<i>Isoformas PR</i>	PRB>PRA	PRB<PRA	PRB>PRA	PRB<PRA

Tabla R-2. Características de las familias del modelo murino utilizadas para evaluar la sensibilidad a la terapia combinada MFP+PALBO.

♥ *Familia 59*

Variante 59-2-HI

La variante 59-2-HI es un tumor extremadamente sensible a la terapia con MFP. Como muestra el panel izquierdo de la **Figura R-24 A**, los tumores regresionaron completamente cuando a los ratones se les implantó un *pellet* sc. de 0,5 mg de MFP, en lugar de la dosis habitual de 6 mg. Por su parte, el tratamiento con PALBO indujo una inhibición, pero no regresión del crecimiento tumoral, aún en la dosis máxima que se puede inocular sin tener efectos adversos en el ratón. Respecto al tratamiento combinado MFP+PALBO, este parece inducir una regresión tumoral más eficiente que MFP solo, al menos durante los primeros 4 días de tratamiento. Sin embargo, al día 11 ambos grupos mostraron regresión completa (**Figura R-24 A, izquierda**). A partir de estos hallazgos, decidimos reducir aún más la dosis de MFP y utilizamos *pellets* sc. de 0,1 mg para poder evaluar si la combinación MFP+PALBO es más efectiva que MFP sola (**Figura R-24 A, derecha**). En este ensayo tratamos a los animales por 7 días y no observamos inhibición del tamaño tumoral con PALBO, mientras que MFP redujo significativamente la tasa de crecimiento. Por su parte, la terapia combinada MFP+PALBO tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento tumoral más temprano (día 5) en comparación a los tratamientos individuales.

Teniendo en cuenta que, en el modelo de PDX-685 MFP mostró una disminución de los niveles de fosforilación de RB, aunque en menor medida que PALBO (**Figura R-**

23), a continuación, evaluamos si el antiprogéstágeno potencia el efecto de PALBO en los tumores 59-2-HI. Como era de esperar, PALBO disminuyó significativamente los niveles de pRB. Además, observamos que MFP redujo los niveles de pRB en un modelo sensible al antiprogéstágeno, aún de forma más eficiente que PALBO. Sin embargo, como el efecto de MFP fue tan robusto, no se pudo observar un efecto aditivo de ambas drogas (Figura R-24 B).

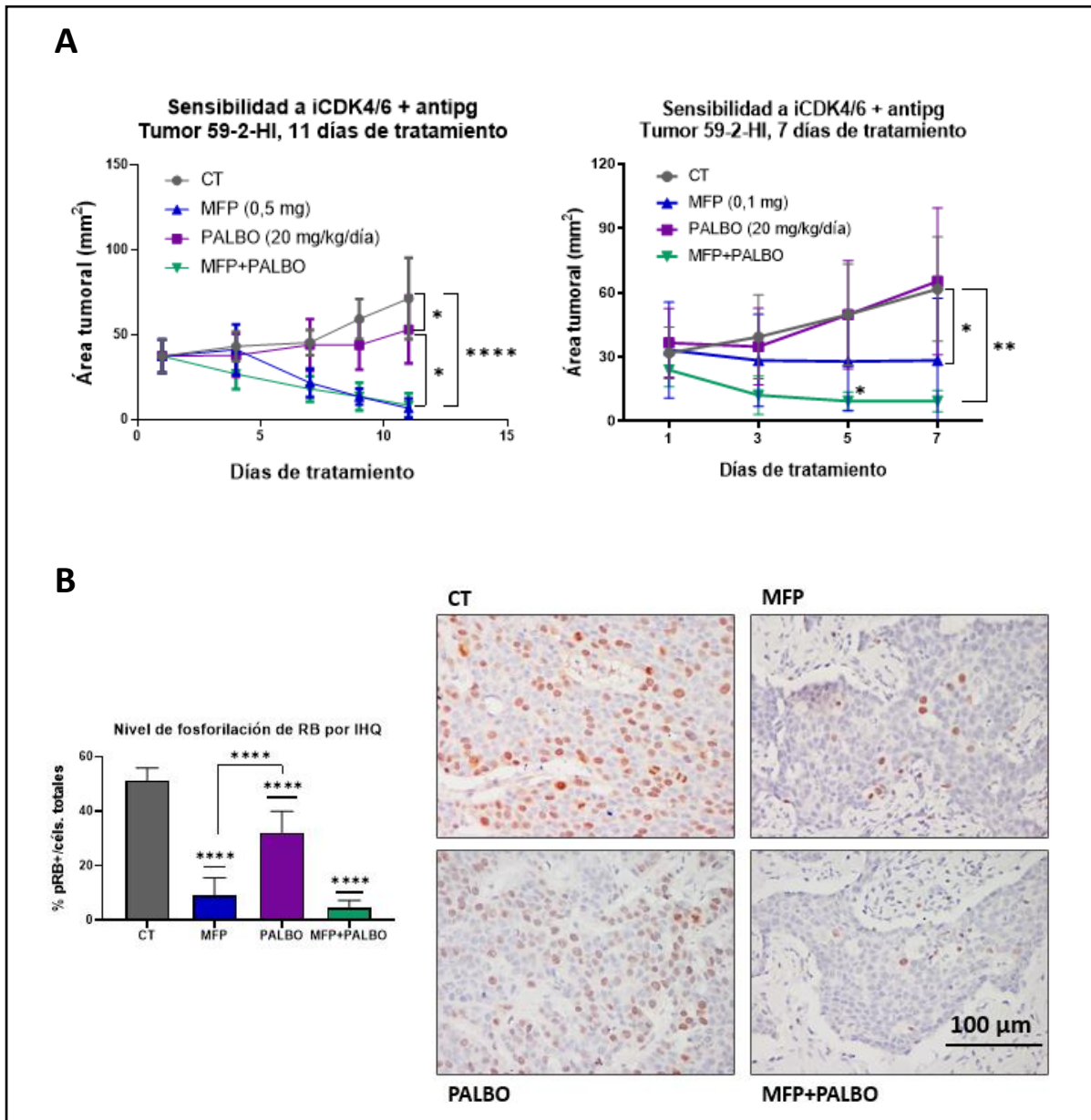


Figura R-24. Efecto de las terapias simples y combinada con MFP y PALBO sobre el crecimiento del tumor luminal 59-2-HI y los niveles de pRB. A) El tumor 59-2-HI se transplantó en ratones hembra BALB/C. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~ 35 mm² comenzó la administración de palbociclib (PALBO; 20 mg/kg/día sc.), mifepristona (MFP; 0,5 mg/pellet ó 0,1 mg/pellet sc.) o la combinación durante 11 o 7 días. Se muestra

$\bar{X} \pm DE$. Experimentos realizados por duplicado. Se utilizaron 4 ratones por grupo experimental. **B)** Derecha: Imágenes representativas de las IHQ para pRB de los tumores tratados por 7 días. Contraintinción: Hematoxilina. Se cuantificaron las células tumorales positivas para la marca en función del total de células tumorales por campo (Izquierda). Se muestra la $\bar{X} \pm DE$ de 10 campos tomados al azar. CT: Control. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Asimismo, evaluamos por WB los niveles de PR luego del tratamiento por 11 días con PALBO para observar si el tratamiento tenía un efecto sobre este receptor. Observamos que los tumores tratados con dicho inhibidor presentaban mayores niveles de ambas isoformas de PR comparado con los tumores control (**Figura R-25**). Más repeticiones de experimentos independientes son necesarias para confirmar este aumento.

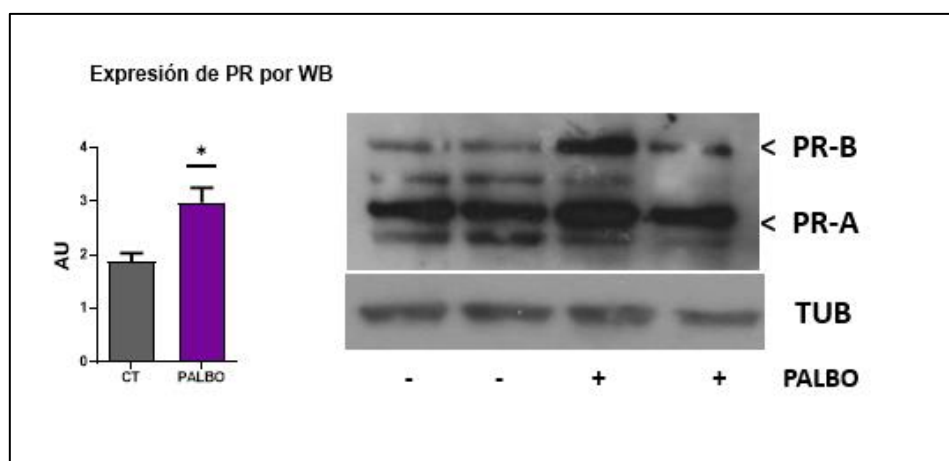


Figura R-25. Niveles de PR por WB luego del tratamiento con PALBO. WB (derecha) y densitometría (izquierda) para PR de los tumores tratados con palbociclib (PALBO; 20 mg/kg/día sc.) o control extirpados luego de 11 días de tratamiento. Se utilizó tubulina (TUB) como control de carga. CT: Control. Se muestra $\bar{X} \pm DE$ de dos tumores para cada condición; *: $p < 0,05$.

Variante 59-HI

Con la idea de investigar si la resistencia a MFP se asocia con la resistencia a PALBO, evaluamos la sensibilidad de la variante 59-HI al tratamiento con iCDK4/6. Sabemos que el crecimiento de este tumor no se inhibe con MFP. El tumor 59-HI resultó ser sensible a PALBO, lo que convierte a las dos variantes de la familia 59 (59-2-HI y 59-HI) en respondedoras a PALBO, independientemente de la sensibilidad a MFP de cada variante (**Figura R-26**). Evaluamos los niveles de activación de RB por IHQ en los tumores

59-HI luego de 21 días de tratamiento y observamos que el inhibidor redujo de forma significativa la fosforilación de esta proteína.

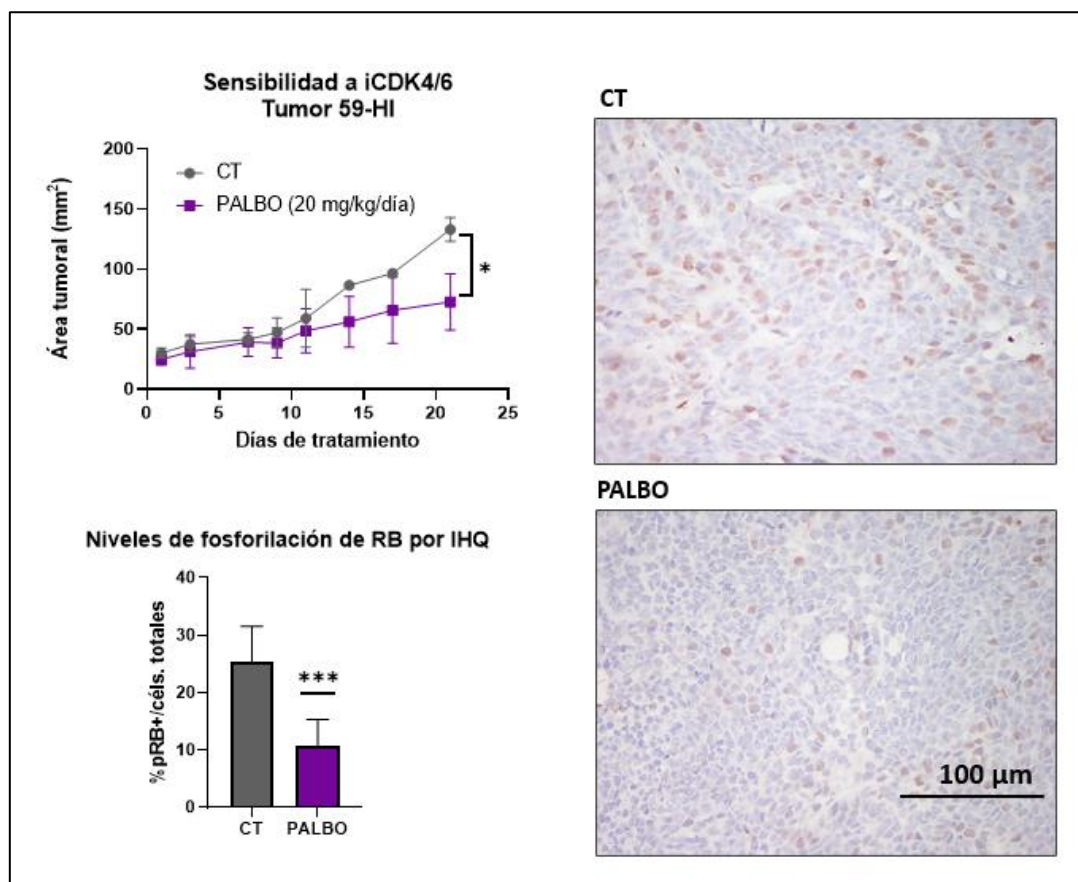


Figura R-26. Efecto de la terapia simple de PALBO sobre el crecimiento del tumor luminal 59-HI. Izquierda arriba: El tumor 59-HI se transplantó en ratones hembra BALB/C. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~30 mm² comenzó la administración de palbociclib (PALBO; 20 mg/kg/día sc.) por 21 días. Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Se utilizaron 4 ratones por grupo experimental. Este ensayo se realizó dos veces. Derecha: Imágenes representativas de las IHQ para pRB. Contraintinción: Hematoxilina. Se cuantificaron las células tumorales positivas para la marca en función del total de células tumorales por campo (Izquierda abajo). Se muestra la $\bar{X} \pm DE$ de 10 campos tomados al azar. CT: Control. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

♥ Familia C4

Variante C4-HI

A continuación, evaluamos la sensibilidad a PALBO y a la terapia combinada en la familia C4. La variante C4-HI es sensible al tratamiento con MFP. El antiprogéstágeno inhibe el crecimiento tumoral mediante un proceso de diferenciación tumoral, pero sin inducir regresión completa (Vanzulli et al., 2005). Como muestra la **Figura R-27**, y como era de esperar, el *pellet* de 0,3 mg de MFP redujo significativamente el tamaño y peso de los tumores C4-HI. Por su parte, PALBO (10 mg/kg/día) no modificó la tasa de

crecimiento de los tumores, y tampoco moduló el efecto antitumoral de MFP. Decidimos entonces repetir el ensayo, pero esta vez utilizamos dosis mayores de PALBO (25 mg/kg/día). Nuevamente, observamos que los tumores C4-HI son resistentes a la terapia con iCDK4/6 (no se muestra).

Respecto a los niveles de pRB, las inmunomarcaciones indican que MFP reduce significativamente los niveles de fosforilación de esta proteína, al igual que el tratamiento combinado MFP+PALBO. Llamativamente, la terapia simple con PALBO (10 mg/kg/día) parece aumentar pRB, aunque es necesario confirmar este resultado porque los campos analizados fueron heterogéneos y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura R-27 B i y B ii**). Esto sugiere que la resistencia a PALBO observada en el tumor C4-HI estaría asociada a la incapacidad de disminuir los niveles de fosforilación de RB.

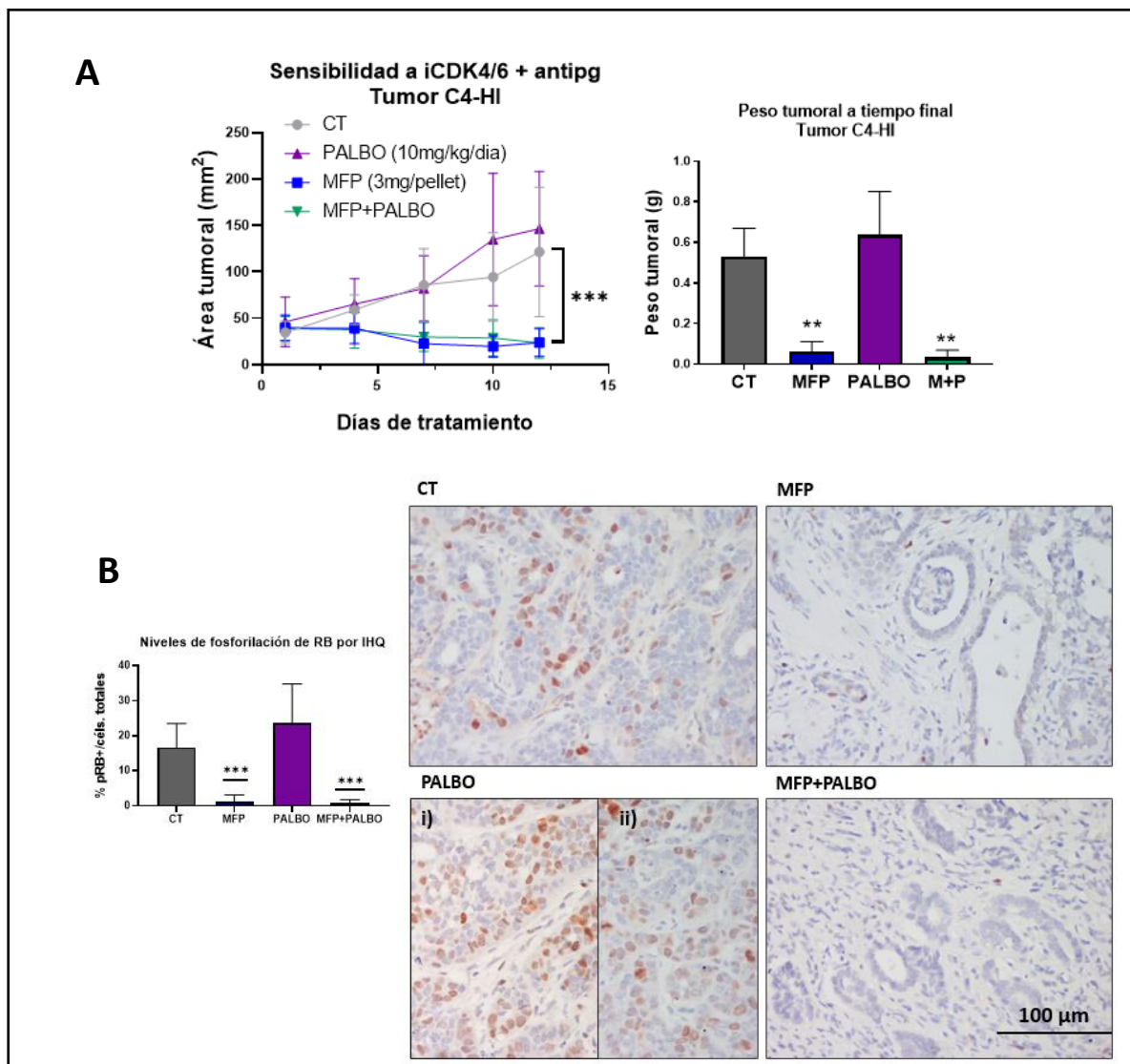
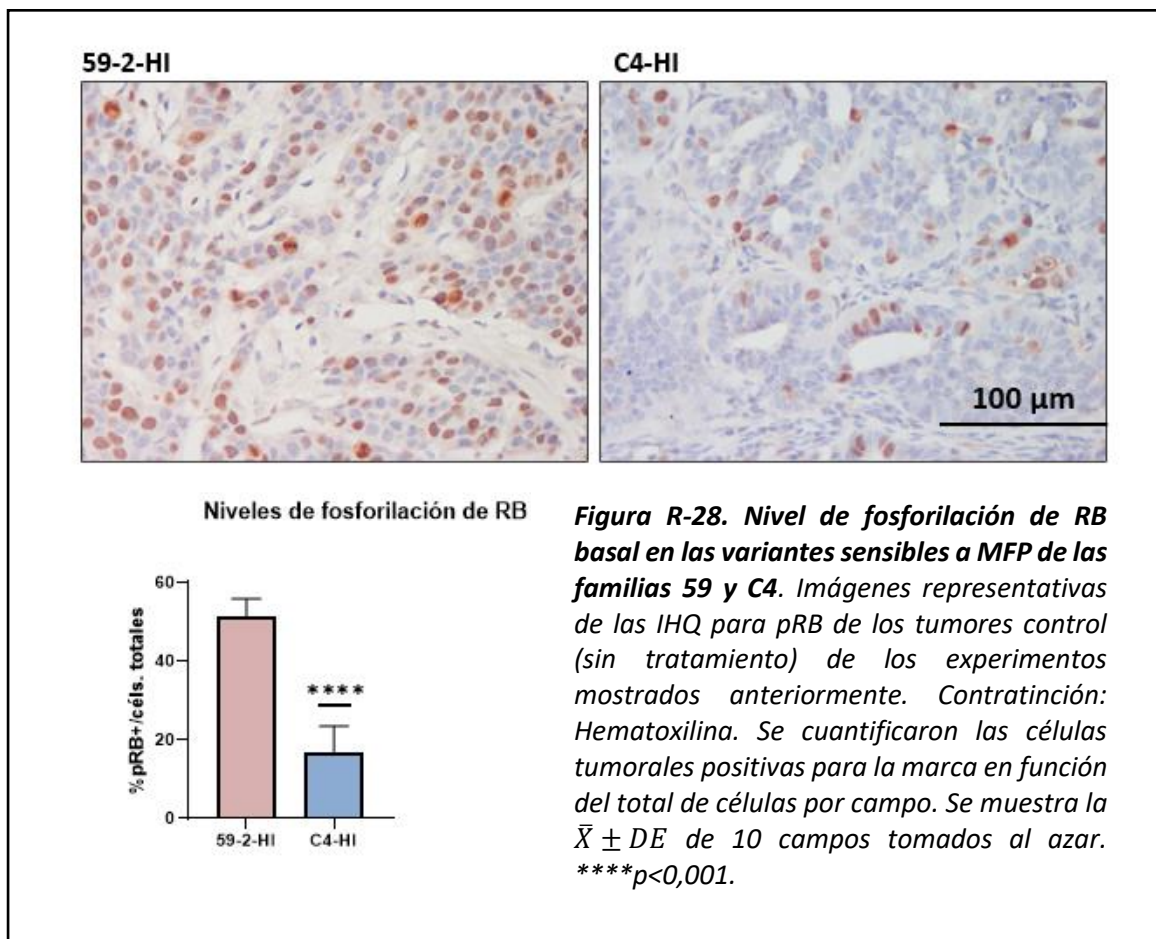


Figura R-27. Efecto de las terapias simples y combinadas con MFP y PALBO sobre el crecimiento del tumor luminal C4-HI y los niveles de pRB. A) El tumor C4-HI se transplantó en ratones hembra BALB/C. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de $\sim 35 \text{ mm}^2$ comenzó la administración de palbociclib (PALBO; 10 mg/kg/día sc.), mifepristona (MFP; 3 mg/pellet sc.) o la combinación por 12 días. Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Se utilizaron 4 ratones por grupo experimental. El experimento se realizó 3 veces. Se midió el peso tumoral al finalizar el experimento. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. B) Derecha: Imágenes representativas de las IHQ para pRB de los tumores al finalizar el experimento. Contratinción: Hematoxilina. Izquierda: Se cuantificaron las células tumorales positivas para la marca en función del total de células por campo. Se muestra la $\bar{X} \pm DE$ de 10 campos tomados al azar. CT: Control; *** $p < 0,001$.

Es importante remarcar que al comparar los niveles basales de fosforilación de RB de las variantes sensibles a MFP, observamos que los tumores control C4-HI mostraron menores niveles de pRB en comparación al de los tumores control 59-2-HI (Figura R-28). Esto sugiere que en el tumor C4-HI la vía de RB no sería la preponderante en la proliferación celular y, tal vez, esta sea la razón de por qué PALBO no tiene un efecto antitumoral.



Variante C4-2-HI

El tumor C4-2-HI es resistente a MFP y, al igual que lo observado en la variante C4-HI, PALBO (25 mg/kg/día) no inhibió el crecimiento tumoral (**Figura R-29 A, izquierda**). Más aún, los tumores tratados con PALBO mostraron una tendencia a aumentar el peso final (**Figura R-29 A, derecha**). Planeamos repetir este ensayo para tener rigor estadístico. Cuando evaluamos pRB, el tratamiento con PALBO aumentó significativamente los niveles de fosforilación de dicha proteína (**Figura R-29 B**).

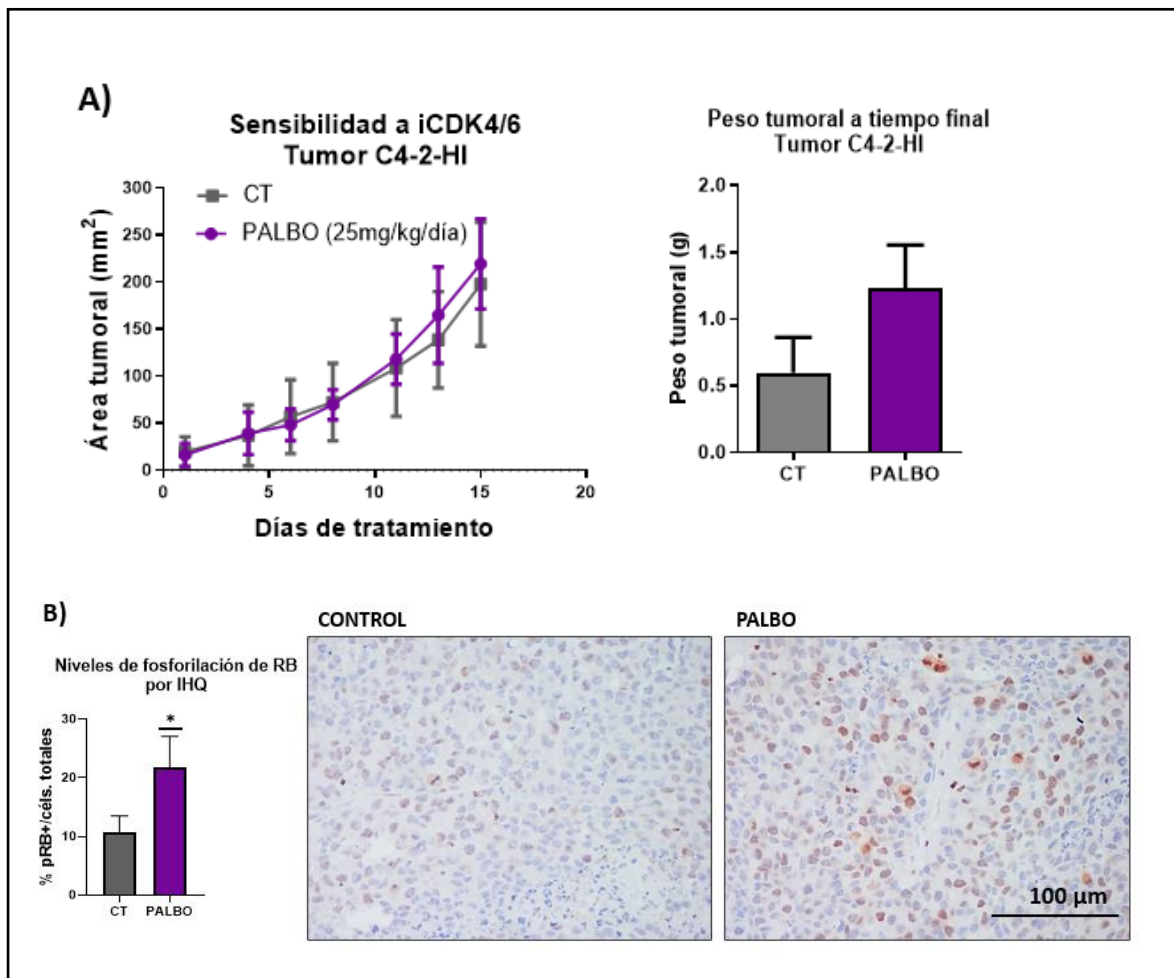


Figura R-29. Efecto de la terapia simple con PALBO sobre el crecimiento del tumor luminal C4-2-HI y los niveles de pRB. A) El tumor C4-2-HI se transplantó en ratones hembra BALB/C. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~ 25 mm² comenzó la administración de palbociclib (PALBO; 25 mg/kg/día sc.) por 15 días. Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Se utilizaron 3 ratones por grupo experimental. El experimento se realizó una sola vez. Se midió el peso tumoral al finalizar el experimento. **B)** Imágenes representativas de las IHQ para pRB de los tumores al finalizar el experimento. Contraintinción: Hematoxilina. Izquierda: Se cuantificaron las células tumorales positivas para la marca en función del total de células por campo. Se muestra la $\bar{X} \pm DE$ de 10 campos tomados al azar. CT: Control. *: $p < 0,05$.

Resumiendo, encontramos que la familia 59 es sensible al tratamiento con PALBO, mientras que la familia C4 es resistente. Este comportamiento es independiente de la sensibilidad a MFP y, por lo tanto, también es independiente de la proporción de isoformas de PR. Interesantemente, al evaluar el efecto de ambos tratamientos simples, observamos que PALBO y MFP disminuyen pRB. Esto sugiere que ambos agentes terapéuticos tienen acción sobre el eje RB-E2F.

Modelo CDX

♥ T47D-WT

Utilizamos la línea celular humana T47D-WT para evaluar el efecto terapéutico de la combinación de MFP y PALBO sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Las terapias simples indujeron una pequeña disminución del crecimiento tumoral, aunque no significativa, mientras que la terapia combinada redujo de forma significativa el tamaño tumoral comparado con el grupo control (**Figura R-30 A**). Este resultado se reflejó también en el peso tumoral al final del experimento (**Figura R-30 B**).

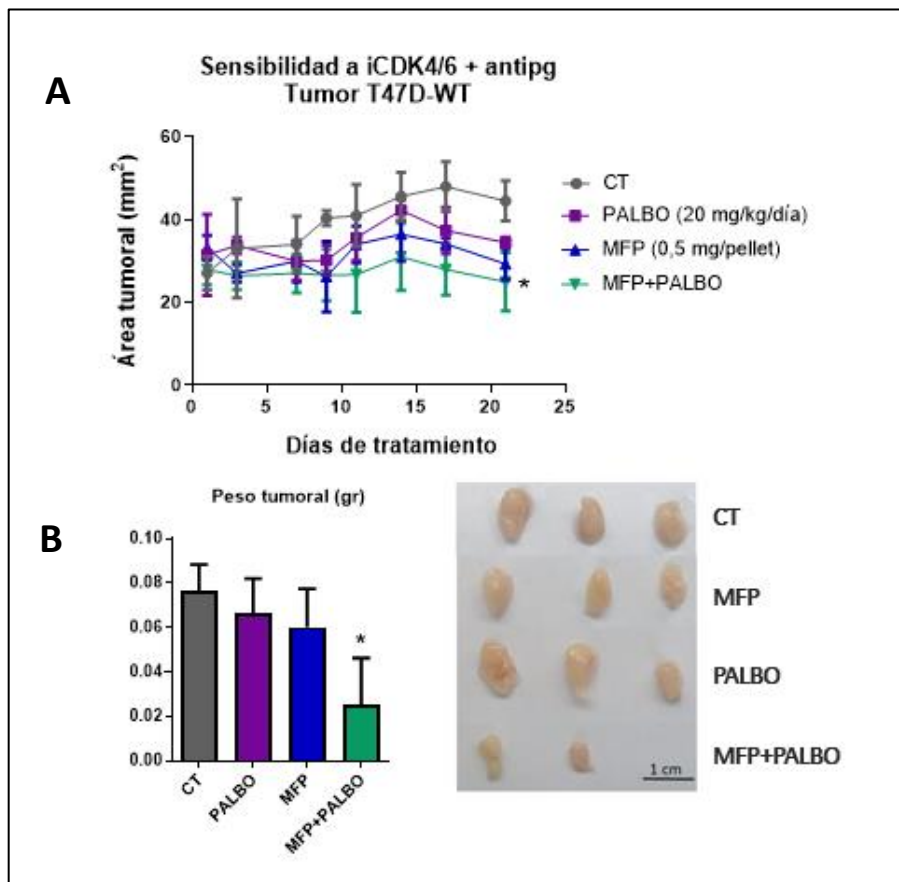
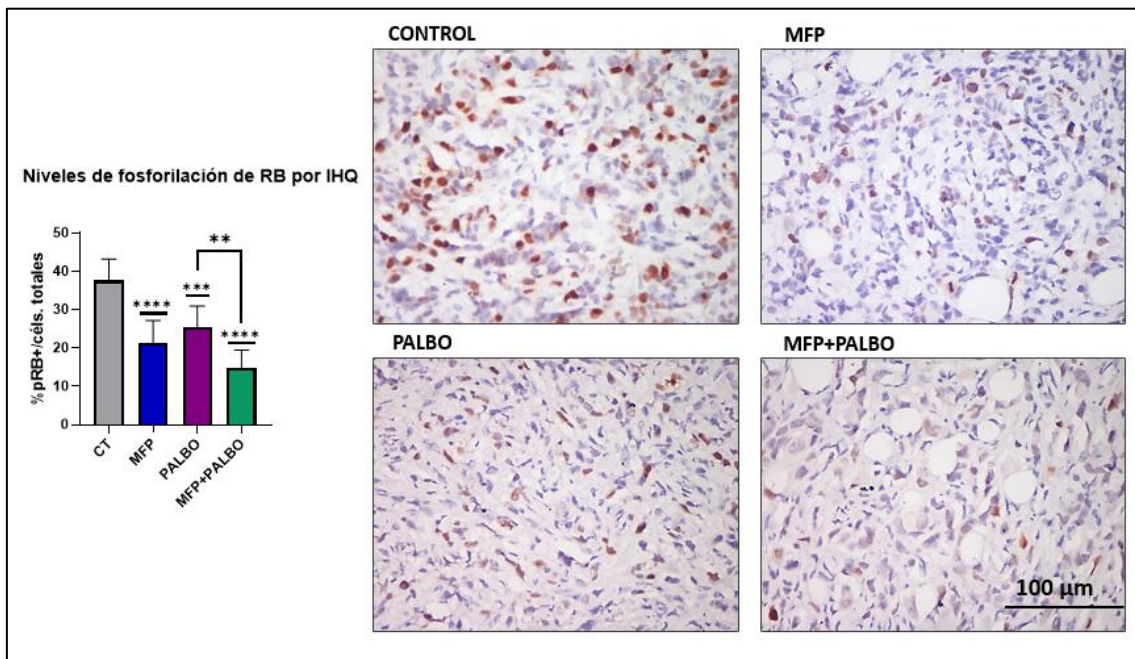


Figura R-30. Efecto de las terapias simples y combinadas con MFP y PALBO sobre el crecimiento de tumores T47D-WT en ratones NSG. Se inocularon 5-7 millones de células/ratón sc. en el flanco inguinal de ratones hembras NSG suplementadas con E2 (0,25 mg/pellet sc.). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~30 mm² comenzó la administración de palbociclib (PALBO; 20 mg/kg/día sc.), mifepristona (MFP; 0,5 mg/pellet sc.) o la combinación. Se muestra $\bar{X} \pm DE$. Se utilizaron 3 ratones por grupo experimental. El ensayo se realizó dos veces. **A)** Curva de crecimiento tumoral. **B)** Peso de los tumores al final del experimento. Un ratón del grupo MFP+PALBO murió antes de finalizar el experimento. Se muestra la $\bar{X} \pm DE$. CT: Control; *: $p < 0,05$.

Los niveles de pRB y E2F1 se determinaron por IHQ en cortes de los tumores al finalizar el ensayo. Como se observa en la **Figura R-31**, las terapias simples y la combinación disminuyeron los niveles de ambas marcas. Estos resultados validan lo observado con pRB en el modelo murino, donde la inhibición del crecimiento tumoral correlaciona con una disminución en los niveles de pRB. En el modelo murino no evaluamos a E2F1 porque el anticuerpo es de origen ratón, y estamos a la espera de un anticuerpo de origen conejo. En el modelo humano, donde el anticuerpo si funciona, observamos que E2F1 tiene un patrón de inhibición similar al pRB, donde las terapias simples y la combinación redujeron la activación de la proteína.



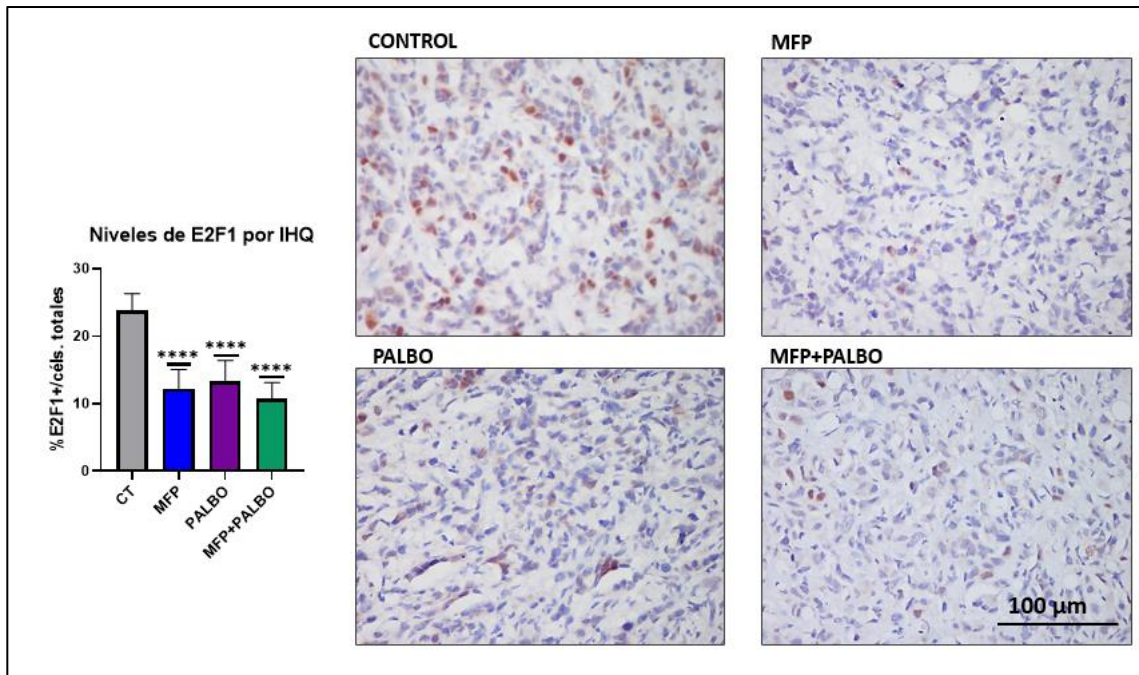


Figura R-31. Efecto de las terapias simples o combinada con MFP y PALBO sobre los niveles de E2F1 y la fosforilación de RB en tumores T47D-WT. Imágenes representativas de las IHQ para pRB (arriba) y E2F1 (abajo) de los tumores tratados con palbociclib (PALBO; 20 mg/kg/día sc.), mifepristona (MFP; 0,5 mg/pellet sc.) o la combinación por 21 días. Contratación: Hematoxilina. Izquierda: Se cuantificaron las células tumorales positivas para la marca en función del total de células por campo. Se muestra la $\bar{X} \pm DE$ de 10 campos tomados al azar. CT: Control. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

En resumen, el modelo humano T47D-WT con expresión equimolar de PR, mostró sensibilidad a la terapia combinada. Aunque no se detectaron cambios significativos en el tamaño tumoral luego de los tratamientos simples, ambas monoterapias redujeron los niveles de pRB y de E2F1.

3) ESTUDIO DEL MECANISMO ASOCIADO AL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA TERAPIA COMBINADA DE MFP Y PALBO: ESTUDIOS *IN VITRO*

Se utilizó el modelo humano T47D que cuenta con tres variantes con expresión diferencial de PR. La variante T47D-WT, expresa de forma equimolar ambas isoformas de PR. La variante T47D-YA, solo expresa la isoforma A. Estas variantes son sensibles al tratamiento con MFP. Por último, la variante T47D-YB solo expresa la isoforma B de PR, por lo que es resistente al tratamiento con MFP.

Efecto de la terapia combinada sobre la proliferación celular

Evaluamos el efecto de MFP y PALBO sobre la proliferación celular de las tres variantes T47D, determinado por recuento celular. Utilizamos dos condiciones de crecimiento: sin agregado de suero al medio de cultivo (DMEM; **Figura R-32 arriba**) y con agregado del 7% de suero (7% SFB; **Figura R-32 abajo**). En los ensayos en DMEM, se suplementó con un factor de crecimiento (FGF2, F) para poder evidenciar el efecto inhibitorio de los agentes terapéuticos estudiados. En los ensayos en presencia de suero, este indujo proliferación celular y observamos el efecto inhibitorio de los tratamientos. En publicaciones anteriores de nuestro laboratorio demostramos que las variantes T47D-WT y T47D-YA son sensibles a MFP y la variante T47D-YB es resistente (Wargon et al., 2015). En cuanto a PALBO, las células T47D son sensibles (Trape et al., 2016), pero no se había determinado la sensibilidad en las variantes -YA e -YB.

Como era de esperar, el tratamiento con MFP o PALBO inhibió la proliferación celular de la variante T47D-WT en ambas condiciones. Solo en presencia de FGF2 se observó un mayor efecto inhibitorio del tratamiento combinado respecto del tratamiento simple de MFP o PALBO. Las células T47D-YA se comportaron de forma similar a las T47D-WT, siendo inhibidas por ambos tratamientos simples, pero se observó superioridad del tratamiento combinado en ambas condiciones. Por otro lado, en las células T47D-YB observamos un efecto inhibitorio únicamente en presencia de PALBO. Es interesante destacar que MFP aumenta el recuento celular de la variante

T47D-YB, lo cual está en línea con lo publicado previamente por nuestro grupo (Helguero et al., 2003; Wargon et al., 2011; Wargon et al., 2009; Wargon et al., 2015). Este efecto no se observa al suplementar el medio de cultivo con FGF2, posiblemente porque las células ya alcanzaron un máximo de proliferación en presencia de dicho factor de crecimiento.

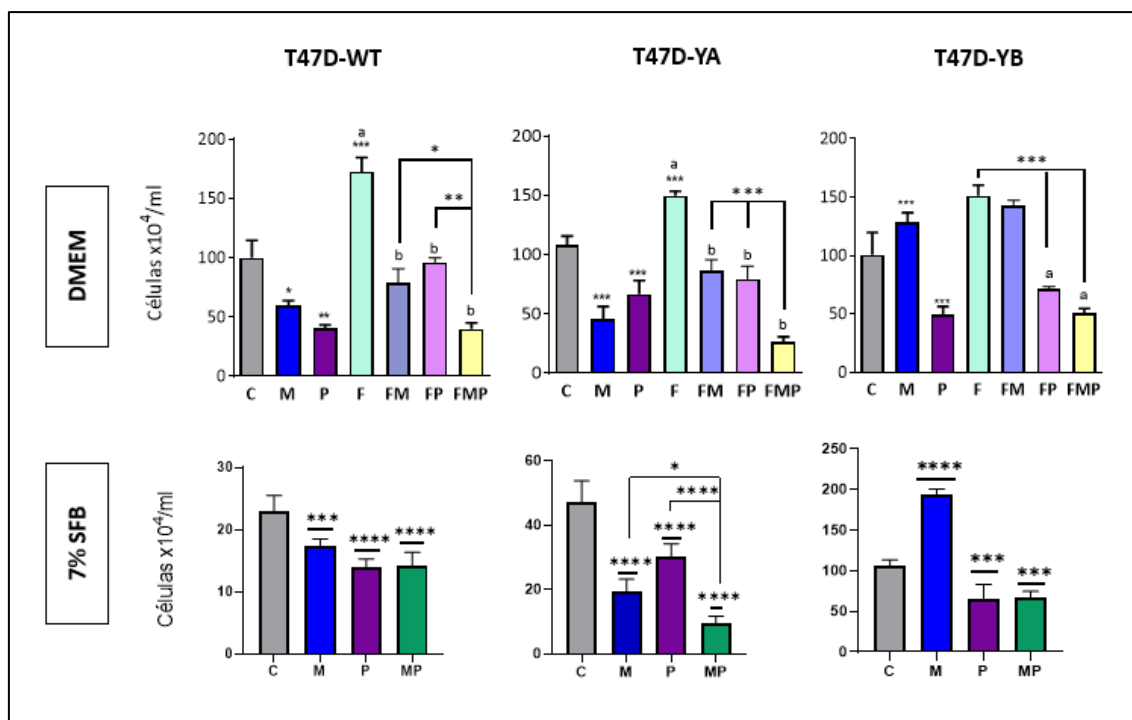


Figura R-32. Efecto del tratamiento de MFP, PALBO y su combinación sobre la proliferación celular de las tres variantes de T47D. Las células fueron tratadas por 5 días con los siguientes tratamientos, C: control; M: MFP (10 nM); P: PALBO (100 nM); F: FGF2 (50 ng/ml); FM: FGF2+MFP; FP: FGF2+PALBO; FMP: FGF2+MFP+PALBO; MP: MFP+PALBO. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; a vs b: $p < 0,001$. a significativo contra C, b significativo contra F. Se muestra la $\bar{X} \pm DE$ de 5 réplicas de un experimento representativo. DMEM: experimentos realizados 3 veces. 7% SFB: experimento realizado 2 veces.

Efecto de la terapia combinada sobre los niveles de pRB y E2F1

En esta instancia, nos propusimos investigar el mecanismo asociado a la acción de cada isoforma de PR sobre proteínas claves del ciclo celular. Tanto pRB como E2F1 juegan un rol fundamental en la transición de G1 a S, donde un aumento significa que la célula se compromete a proliferar. Primero, evaluamos los niveles de pRB en la línea T47D-WT en presencia de DMEM suplementado con FGF2 y los diferentes inhibidores. La **Figura R-33** muestra cómo el tratamiento combinado disminuye significativamente la

fosforilación de RB (**izquierda**), mientras los niveles de la proteína total RB no cambian (**derecha**).

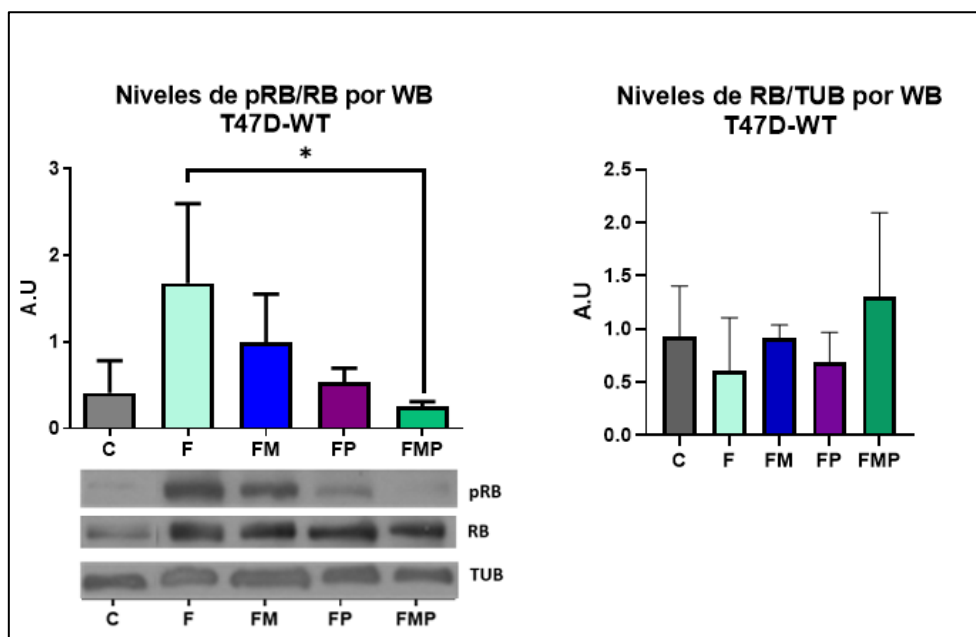


Figura R-33. Efecto del tratamiento de MFP, PALBO y su combinación sobre los niveles relativos de la proteína RB y su fosforilación en células T47D-WT, determinados por WB. Densitometría para pRB (izquierda) y RB (derecha) de las células tratadas por 24 horas en presencia de FGF2 (50 ng/ml) con MFP (10 nM), PALBO (100 nM) y su combinación. Se utilizó tubulina (TUB) como control de carga. (Abajo) Se muestra un gel representativo. *: $p < 0,05$. C: Control; F: FGF2; FM: FGF2+MFP; FP: FGF2+PALBO; FMP: FGF2+ MFP+PALBO. Se muestra $\bar{X} \pm DE$ de 3 experimentos independientes.

Luego, evaluamos los niveles de E2F1 y la fosforilación de RB luego del tratamiento con MFP, PALBO y su combinación en presencia de 7% SFB en las variantes T47D-YA e -YB. En estos ensayos no se evaluaron los niveles de la proteína total RB. Observamos que, en las células T47D-YA, los tratamientos simples y la combinación disminuyeron la fosforilación de RB y los niveles de E2F1 (**Figura R-34, arriba**). Esto sugiere que la disminución en el recuento celular observado anteriormente, está relacionado con el descenso de dichas proteínas pro-proliferativas.

En las células T47D-YB (**Figura R-34, abajo**), PALBO redujo significativamente pRB, aún en presencia de MFP y no detectamos cambios en los niveles de E2F1 luego de los tratamientos. Dado que este ensayo fue realizado solamente dos veces, planeamos aumentar el n y así determinar robustamente los efectos observados. El tratamiento con

MFP mostró una tendencia al aumento de pRB y de E2F1, lo cual resultaría coherente con los resultados de proliferación celular (Figura R-32).

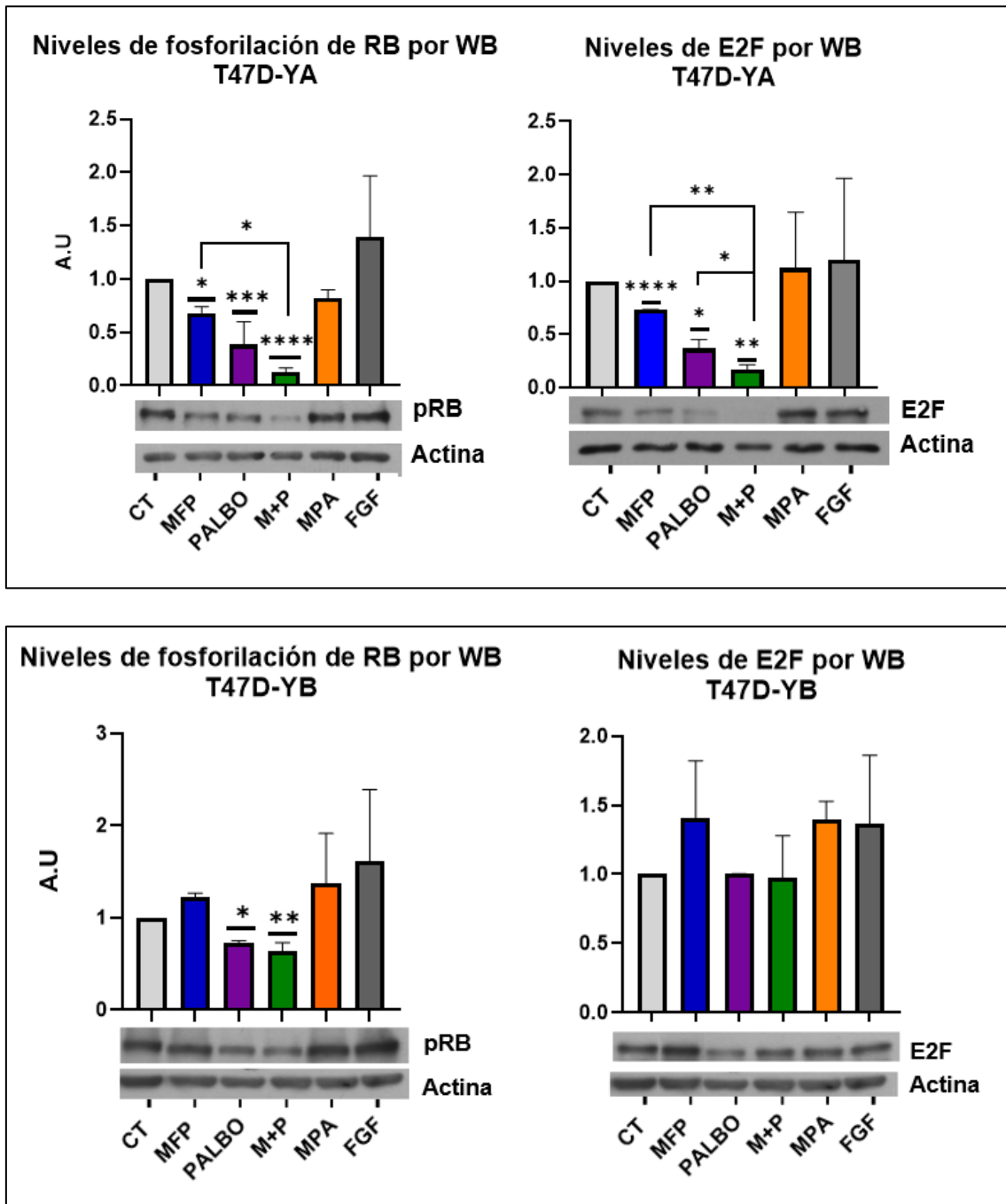


Figura R-34. Efecto del tratamiento de MFP, PALBO y su combinación sobre los niveles relativos de la fosforilación de pRB y la proteína E2F1 en células T47D-YA e -YB, determinados por WB. Densitometría para pRB y E2F1 de las células T47D-YA (arriba) y T47D-YB (abajo) tratadas por 24 horas con MFP (10 nM), PALBO (100 nM) y su combinación en presencia de 7%SFB. Se muestra un gel representativo y se utilizó Actina como control de carga. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. CT: Control; M+P: MFP+PALBO. MPA (10 nM) y FGF2 (50 ng/ml) se agregaron como controles positivos. Se muestra la $\bar{X} \pm DE$ de experimentos independientes con T47D-YA ($n=3$) y con T47D-YB ($n=2$). El análisis estadístico

(ANOVA de un factor) se realizó sin incluir los tratamientos FGF2 y MPA, los cuales fueron utilizados como un control externo.

Para confirmar el efecto del tratamiento con MFP sobre el eje RB-E2F1, evaluamos por inmunofluorescencia los niveles de ambas proteínas en células T47D-YA en presencia de 7% SFB. Como ilustra la **Figura R-35**, el antiprogéstágeno induce una clara reducción en la marca de pRB. Con respecto al E2F1, se observa un puntillado nuclear en las células control que se encuentra muy atenuado en las células tratadas. Estas imágenes están en línea con los resultados mostrados anteriormente.

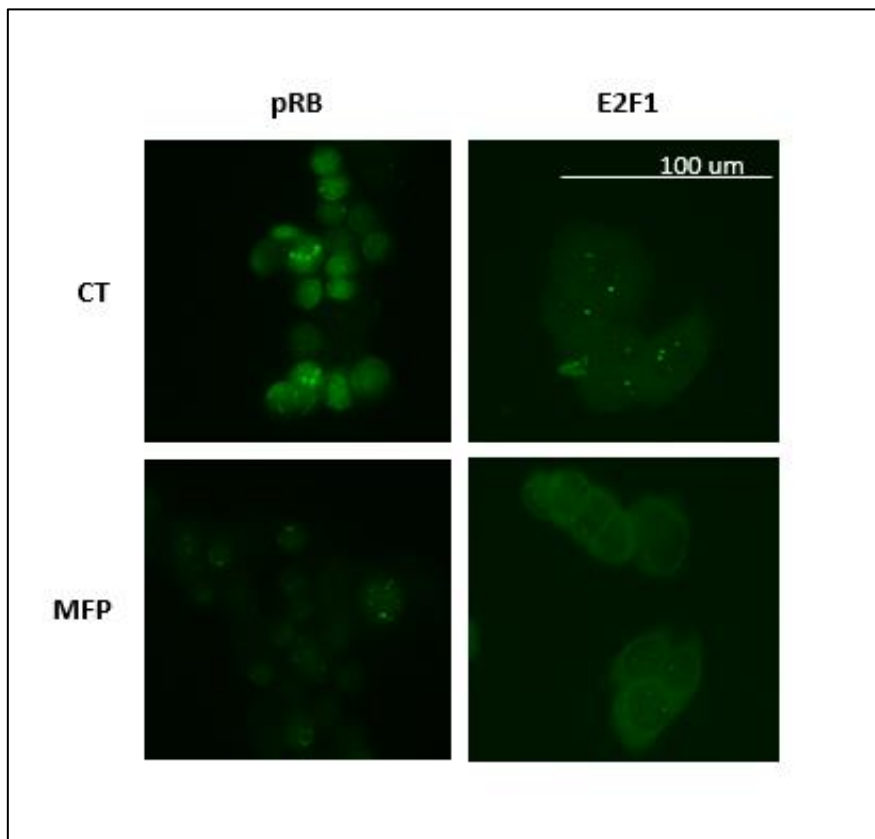


Figura R-35. Inmunomarcación de las proteínas pRB y E2F1 luego de 24 horas de tratamiento con MFP (10 nM) en 7% SFB. Se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con FITC (verde). CT: Control.

Efecto de la terapia combinada sobre la expresión génica de *E2F1*

Posteriormente, quisimos evaluar si el efecto de los tratamientos con MFP y/o PALBO sobre los niveles de la proteína E2F1, se veían también a nivel transcripcional. Para ello, tratamos a las células T47D-YA e -YB con los inhibidores y medimos los niveles del transcrito por RT-qPCR. En la variante T47D-YA observamos que todos los tratamientos disminuyeron significativamente la expresión de dicho gen (**Figura R-36, izquierda**). En cambio, en la variante T47D-YB, MFP no indujo cambios en los niveles de *E2F1*, observando una reducción solo en presencia de PALBO. Cabe destacar que esta es la primera vez que se evalúa la regulación de MFP sobre *E2F1* en células T47D que expresan solo una de las isoformas de PR, sugiriendo una regulación diferencial.

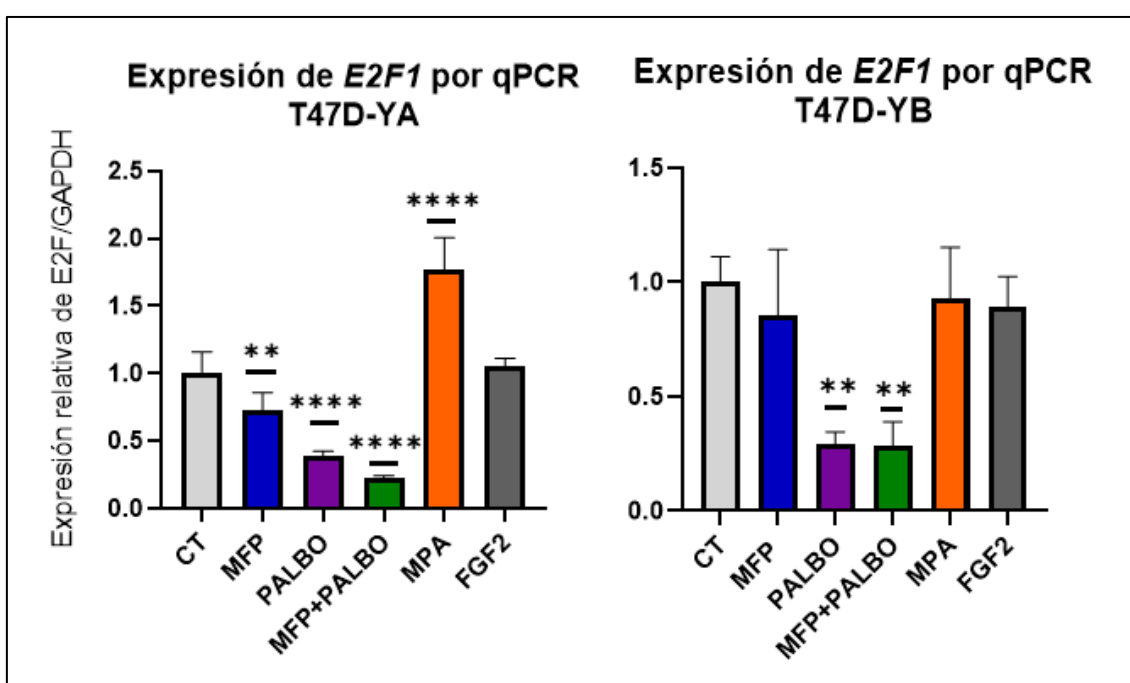


Figura R-36. Efecto del tratamiento de MFP, PALBO y su combinación sobre los niveles relativos del transcrito *E2F1* en células T47D-YA e -YB, determinados por RT-qPCR. Las células se trataron por 18 horas con mifepristona (MFP; 10 nM), palbociclib (100 nM) o su combinación en medio de cultivo DMEM conteniendo 7% SFB. Como control interno para la RT-qPCR se utilizó el gen GAPDH. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$. Se muestra $X \pm DE$ de experimentos independientes en T47D-YA ($n=3$) e -YB ($n=3$). Se utilizó MPA (10 nM) y FGF2 (50 ng/ml) como controles externos. CT: Control.

Efecto de la terapia con MFP sobre el reclutamiento de PR, AIB1 y SMRT en una región regulatoria del gen *E2F1*

Con el fin de estudiar el reclutamiento de PR sobre regiones regulatorias de *E2F1*, utilizamos dos estrategias: por un lado, una búsqueda bibliográfica, y por otro, un análisis de datos disponibles de CHIP-seq. La expresión de *E2F1* está regulada por progestágenos vía el PR, el cual es capaz de interactuar con una región *enhancer* para *E2F1* descrita previamente (**Figura R-37**; Wade et al., 2010).

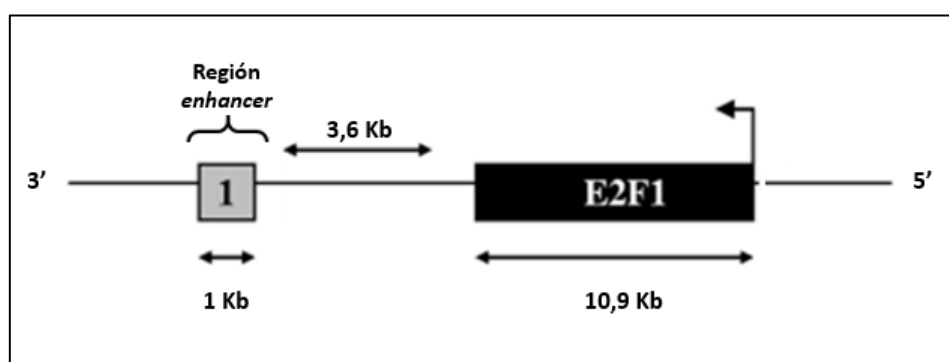


Figura R-37. Esquema de la región regulatoria de la transcripción del gen *E2F1*. Se muestra la posición relativa del sitio de respuesta a progestágenos (región *enhancer*) descrito por Wade y colaboradores (tomado de Wade et al., 2010).

Para validar dicha región regulatoria en el gen *E2F1*, analizamos datos disponibles de CHIP-seq en células T47D-WT para PR activado por Pg, por R5020 o por MFP (Yin et al., 2012; Mohammed et al., 2015). La **Figura R-38** muestra que, tanto en presencia del ligando natural (Pg), como de ligandos sintéticos (R5020 y MFP), el PR es reclutado a la región regulatoria de *E2F1* descrita previamente (recuadro rojo).

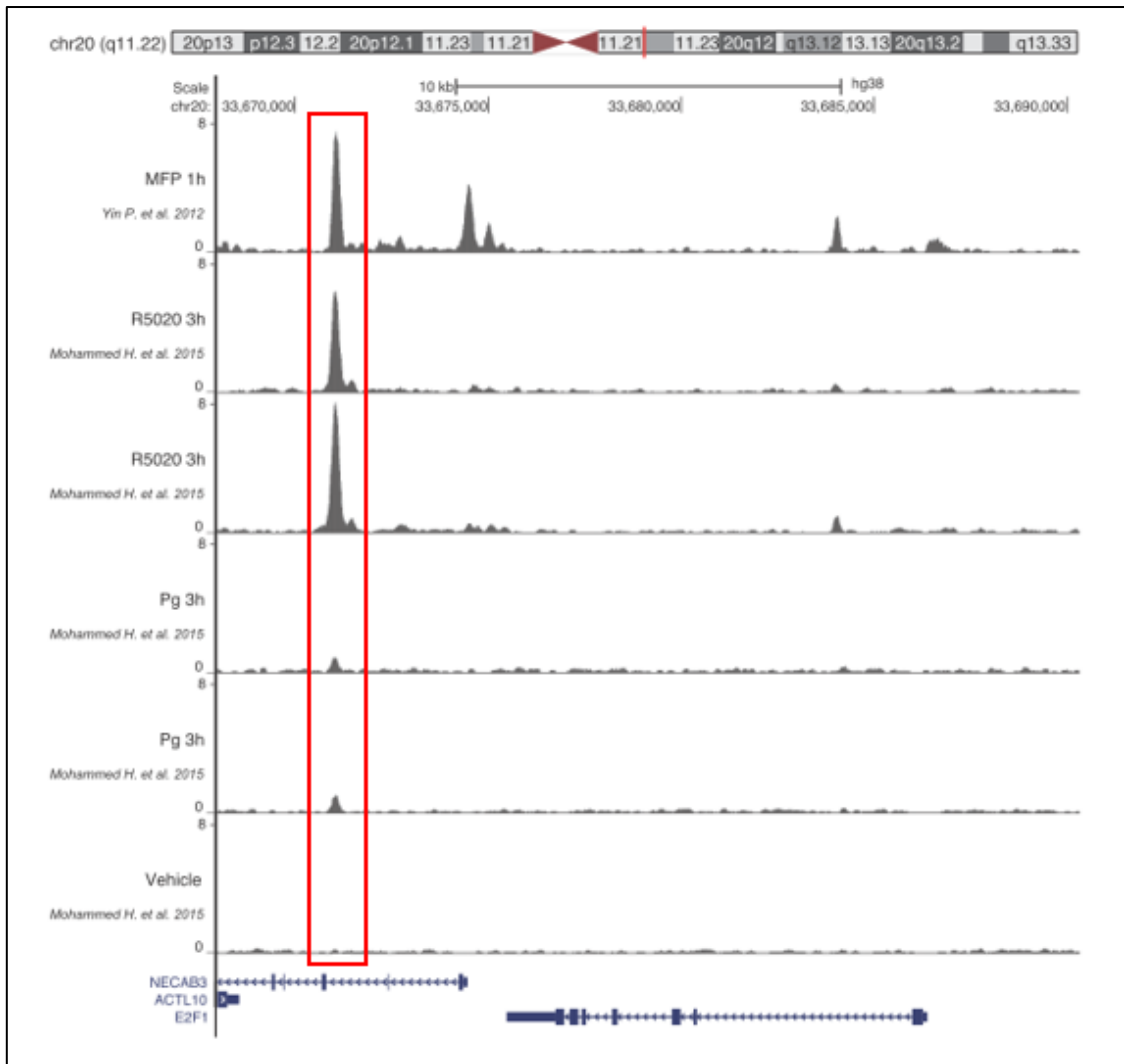


Figura R-38. PR es reclutado a sitios regulatorios de E2F1. Datos públicos de ChIP-seq para PR en células T47D-WT utilizando la herramienta Cistrome Project (10.1186/gb-2011-12-8-r83). Se muestran los picos correspondientes al reclutamiento de PR en regiones cercanas al gen E2F1 en condiciones control (Vehicle) o tratado con MFP, R5020 o Pg. El recuadro rojo, representa la posición relativa del sitio PRE descrito por Wade y colaboradores.

Teniendo en cuenta esta referencia, nos propusimos entonces investigar el efecto de MFP sobre el reclutamiento de PRA y de cofactores de la transcripción, sobre dicha región regulatoria de E2F1.

En presencia de MFP, el correpresor SMRT está asociado a la actividad inhibitoria de PRA, mientras que el coactivador AIB1 está asociado a la actividad pro-proliferativa de PRB (Wargon et al., 2015). Por lo tanto, la presencia neta de uno sobre el otro resultará en la represión o activación de la transcripción génica (Wargon et al., 2015).

A continuación, realizamos ensayos de CHIP en células T47D-YA tratadas con MFP. Observamos que el tratamiento con el antiprogéstano favorece el reclutamiento de PRA sobre dicha región regulatoria de *E2F1*. Este efecto está asociado a una tendencia en el aumento del correpresor SMRT (**Figura R-39**). El coactivador AIB1 pareciera tender a disminuir su pegado cuando MFP se une a PRA. Se podría interpretar que MFP favorece la interacción de PRA y SMRT, inhibiendo la expresión de *E2F1*, observado a nivel del transcrito y de la proteína.

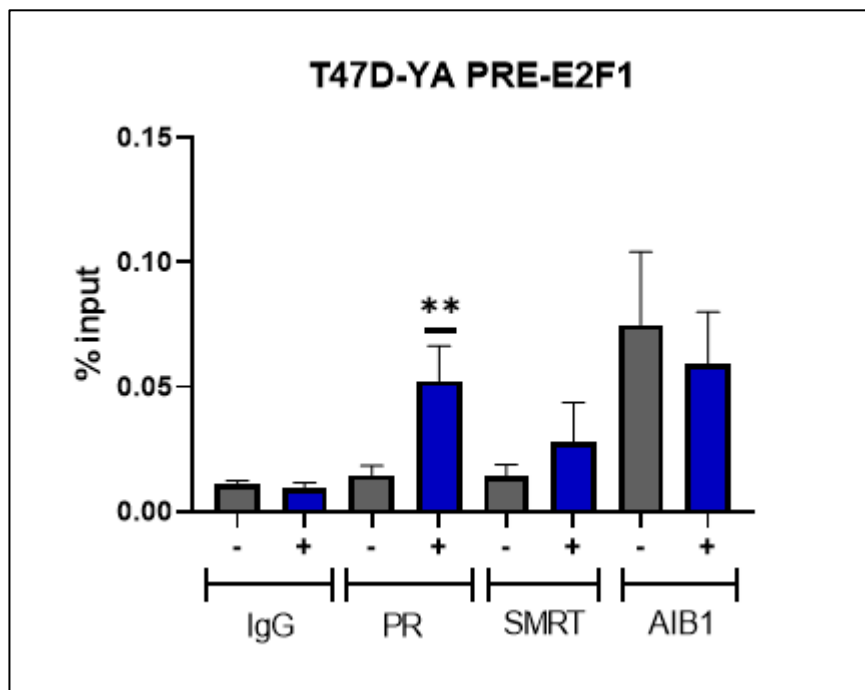


Figura R-39. Interacción de PRA y sus cofactores SMRT y AIB1 sobre la región regulatoria de *E2F1*. Las células T47D-YA se trataron con MFP (10 nM) por 45 minutos y se procesaron para ensayos de CHIP. Se inmunoprecipitó con anticuerpos específicos contra PR, SMRT y AIB1, y se amplificó por RT-qPCR la región PRE-*E2F1*. Se muestra $X \pm DE$ de 3 experimentos independientes. **: $p < 0,01$.

Efecto de PALBO sobre los niveles de PR

Teniendo en cuenta que PALBO indujo un aumento en los niveles proteicos de PR en el modelo murino PRA-H, nos preguntamos si el tratamiento con dicho iCDK4/6 tendría un efecto similar en los modelos humanos en cultivo. Para estos ensayos utilizamos la línea T47D-WT, donde, a diferencia de las líneas con transfección estable T47D-YA e -YB, la regulación de PR es fisiológica. Como se muestra en el panel izquierdo

de la **Figura R-40**, PALBO aumentó los niveles de PR de forma similar a lo descrito para el tumor 59-2-HI (**Figura R-25**). Para investigar si este efecto está relacionado con su acción antiproliferativa, utilizamos células T47D resistentes a PALBO (T47D-PALBOR) generadas por la Dra. Rodríguez (Rodríguez et al., 2023). En esta línea, la expresión basal de PR es baja, y luego del tratamiento por 24 horas con PALBO se observó aumento significativo en la expresión de ambas isoformas (**Figura R-40, derecha**). Estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de PR es independiente del efecto antiproliferativo de PALBO.

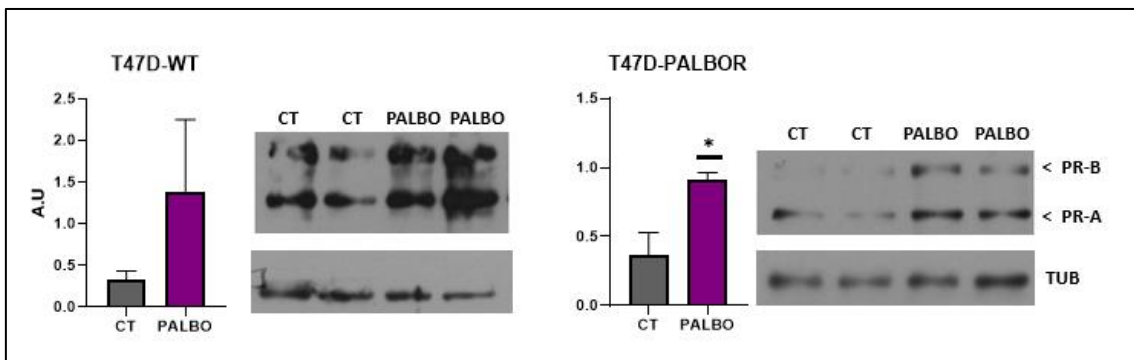


Figura R-40. Efecto de PALBO sobre los niveles de PR en las líneas T47D-WT y T47D-PALBOR. Densitometría para PR de las células T47D-WT y T47D-PALBOR tratadas con PALBO (100 nM) por 24 horas. Se muestra un gel representativo. Se utilizó Tubulina (TUB) como control de carga. CT: Control. *: $p < 0,05$. Se muestra $\bar{X} \pm DE$ de dos replicas por condición.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO DE TERAPIA COMBINADA

- El modelo luminal PDX-685 generado en el laboratorio, mostró ser sensible a las terapias simples con MFP y PALBO. Aún queda por evaluar el efecto de la terapia combinada.
- Los tumores del modelo murino de la familia 59 resultaron ser sensibles a PALBO, independientemente de su sensibilidad a MFP. Los tumores de la familia C4 son resistentes a PALBO. En forma similar, en el modelo T47D se demostró que las tres variantes son sensibles a PALBO, independientemente de su sensibilidad a MFP. **Por todo esto, concluimos que la respuesta a MFP es independiente de la respuesta a PALBO.**
- La respuesta antiproliferativa a MFP en los modelos *in vivo* es más robusta que la respuesta a PALBO en todos los modelos MFP-sensibles ensayados, lo que hace difícil la demostración de la superioridad de la terapia combinada con respecto a las simples. Sin embargo, en los estudios en cultivo en el modelo T47D-WT y sus variantes queda clara la superioridad del efecto de la terapia combinada.
- Los efectos inhibitorios de MFP y PALBO tienen en común que ambos inhiben los niveles de E2F1 y de fosforilación de RB. Además, ambos mensajeros/proteínas se ven más afectadas en las terapias combinadas.
- Si bien el mecanismo por el cual PALBO inhibe la fosforilación de RB está muy bien descrito, aún falta dilucidar el mecanismo por el cual MFP hace lo mismo. Es necesario investigar si este es un mecanismo que afecta a la fosforilación de RB de forma directa o si es un mecanismo indirecto por disminución de los niveles de CCND1, por ejemplo.
- Con respecto a E2F1, nuestros resultados sugieren que MFP aumenta la interacción de PRA con el ADN en la zona del promotor de *E2F1*, lo cual favorece el reclutamiento del correpressor SMRT. Esto disminuye la transcripción del gen *E2F1* y, por lo tanto, los niveles de la proteína.
- El hecho de que PALBO aumente los niveles proteicos de PR sugiere que, en un régimen de terapia combinada junto a MFP, convendría administrar primero al iCDK4/6 y luego al antiprogéstágeno.

DISCUSIÓN

Sección “Biobanco de PDX”

Establecimos exitosamente un Biobanco de tumores mamarios de pacientes con CaM que asistieron a un Hospital ubicado en el nordeste del gran Buenos Aires. Las pacientes residían en la Provincia de Buenos Aires y eran de nacionalidad argentina, a excepción del PDX-687 que derivó de un tumor de una paciente oriunda de Paraguay.

Logramos establecer PDX de los tres subtipos histológicos más frecuentes de CaM: ER+, TN y HER2+. Como era de esperar, las características histopatológicas, la expresión de marcadores y, en algunos PDX la capacidad metastásica, se mantuvieron entre el paciente y su respectivo PDX. La distribución de los subtipos generados fue en línea con lo que se observa en otros biobancos, donde los TN son los tumores con mayor representación. Sin embargo, el porcentaje de éxito de nuestros PDX está en el límite inferior del rango descrito por otros autores. Esto nos indica que debemos mejorar la metodología utilizada en el laboratorio. Sabemos que el tiempo que transcurre desde la resección de la muestra hasta que es inoculada en el ratón es crítico para el éxito del PDX. Sin embargo, creemos que será muy difícil reducir este tiempo, dado que el Hospital se encuentra a 25 km del IBYME, y, muchas veces, la misma dinámica del Hospital hace complicado que la entrega de la muestra sea inmediatamente luego de la resección. Por otra parte, la mayoría de los fragmentos tumorales que recibimos suelen ser menores a 1 cm de eje mayor, por lo que podemos inocular como máximo a 3 ratones. En línea con este punto, la disponibilidad de ratones NSG es también un factor limitante para el éxito de los PDX. Si bien contamos con nuestra propia colonia de animales inmunosuprimidos, esta es una cepa muy delicada y no siempre contamos con la cantidad suficiente de ratones hembra al momento del trasplante. Por último, el método de inoculación utilizado (sc.) favorece el crecimiento de tumores TN, pero no así de tumores luminales (Sflomos et al., 2016). Una posible explicación es que el microambiente del sc. recapitula mejor el origen del tumor humano TN. Para favorecer el crecimiento de PDX de origen luminal se ha descrito que la inoculación intraductal eleva considerablemente el porcentaje de éxito, igualándolo al de tumores TN (Sflomos et al., 2016; Fiche et al., 2019) . Estos autores reportan que el microambiente intraductal le provee a las células tumorales luminales un contexto de crecimiento similar al del sitio donde se originaron. Sin embargo, la inyección intraductal de células neoplásicas es una

metodología que requiere de entrenamiento y equipamiento adecuado. Como el crecimiento tumoral de estos PDX no se puede medir con calibre, el seguimiento del tumor se realiza con bioluminiscencia *in vivo*, por lo que es necesario transfectar las células para que expresen luciferasa. Como contrapropuesta, en este trabajo de tesis realizamos la inoculación del tumor dentro un CP. Esta metodología propone que la presencia de un cuerpo extraño en el sc. del ratón genera una reacción inflamatoria que beneficia la implantación del tumor. Dicha reacción no es más que la respuesta de reparación de la herida, que desencadena la adsorción de proteínas en la superficie del implante, el reclutamiento de macrófagos y formación de células gigantes, activación de fibroblastos y encapsulación fibrosa del cuerpo extraño (Kastellorizios et al., 2015). Como consecuencia, se genera un ambiente privilegiado que favorece el crecimiento tumoral. Es notorio que el único PDX ER+ PR+ que logramos establecer haya sido con dicha metodología.

La suplementación con E2 puede favorecer la implantación de tumores ER+ y de tumores ER- al impactar sobre el microambiente tumoral, y modular por ejemplo la angiogénesis. En nuestro caso, el PDX-474 ER- aumentó la tasa de crecimiento al suplementar al ratón con E2.

Las pacientes que originaron a los PDX TN y HER2+, recayeron en la enfermedad posterior a la cirugía de resección tumoral. Dichos resultados avalan los datos bibliográficos que sugieren que el injerto exitoso de un PDX, es en sí mismo un factor pronóstico. Se ha observado una correlación positiva entre el establecimiento de un PDX y la progresión de la enfermedad en la paciente (Park et al., 2019). Por lo tanto, pacientes que tienen estadios avanzados, tumores grandes y pobremente diferenciados son candidatas a establecer modelos exitosos de PDX. Este fenómeno no se evidenció en los dos PDX luminales generados, ya que las pacientes que originaron a dichos PDX no han reportado progresión de la enfermedad luego de la cirugía. Por último, el PDX-474 HER2+ y PDX-546 TN mostraron ser capaces de generar micrometástasis, correlacionando con su contraparte humana.

Luego de establecer los PDX, caracterizar su histopatología y su crecimiento, decidimos estudiar su exoma. Se estima que el 85% de las mutaciones causantes de enfermedades se encuentran en la región codificante del genoma (exoma). Además, el

análisis de WES permite conocer si existen mutaciones clínicamente relevantes o accionables, así como identificar sustituciones nucleotídicas con diferente grado de impacto sobre la estructura de la proteína.

Encontramos que el gen más frecuentemente mutado en los 8 PDX establecidos fue *ZFHX3*. Este gen codifica para un factor de transcripción que regula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales mamarias a través de la interacción con ER y PR. Esta proteína promueve el crecimiento tumoral en CaM, y una expresión elevada en pacientes correlaciona con un peor pronóstico (Dong et al., 2020). Interesantemente, la SNV V777A se encontró en todos los PDX que presentaron una mutación en dicho gen. Encontramos a la mutación reportada en COSMIC en leucemia, carcinoma de intestino y próstata. Sin embargo, aún no se conoce su implicancia biológica. Como perspectiva futura, pretendemos secuenciar los tumores de las pacientes que originaron a los PDX. De esta forma, se podrán contrastar las SNV encontradas en el PDX con las de los tumores parentales. Por ejemplo, sería interesante conocer si la mutación V777A en *ZFHX3* se encuentra también en las pacientes. De no ser así, tal vez se trate de una mutación que provee una ventaja para la implantación exitosa del PDX.

El segundo gen más frecuentemente mutado fue *KMT2C*, que codifica para la metiltransferasa H3K4, y está usualmente mutado en distintos tipos de cáncer. Su baja expresión en CaM podría estar relacionada con sensibilidad a la quimioterapia y a una mayor PFS para pacientes tratadas con quimioterapia (Liu et al., 2021). La mutación R380L de dicho gen se encontró en 3 de 5 PDX. Dado que es una SNV recurrente, sería interesante ahondar en el estudio de si aporta una ventaja sobre la implantación o si es una mutación parental.

El análisis WES también nos permitió encontrar mutaciones con interés clínico. Por ejemplo, el PDX-687 posee la mutación C420R que afecta a la subunidad catalítica de la proteína PI3K, otorgándole una ganancia de función y sobreactivando la vía de señalización correspondiente. En particular, en el 2019 la FDA aprobó el uso del alpelisib, inhibidor de PI3K, para pacientes con CaM avanzado RH+ HER2- que presentan dicha mutación (Andre et al., 2019). Aún más, se está ensayando la utilización de alpelisib en combinación con olaparib (inhibidor de PARP) en pacientes con tumores TN, con

resultados favorables (Batalini et al., 2022). Por lo tanto, nuestro PDX-687 podría ser un buen modelo para continuar los ensayos de inhibidores de PI3K en tumores TN.

Para continuar con la caracterización de los PDX, evaluamos la sensibilidad a distintas terapias. En particular, elegimos la terapia estándar de cada subtipo tumoral. Esto nos permitió conocer si existía una correlación entre el tumor parental y el PDX, al compararlo con los datos clínicos de la progresión de la enfermedad en cada paciente. El PDX-485 TN respondió significativamente al tratamiento con antraciclinas (DOXO), mientras que no se observó una disminución del crecimiento tumoral con taxanos (PAX). Según la historia clínica, esta paciente recibió un tratamiento adyuvante con taxanos luego de la cirugía. Posiblemente las antraciclinas hubieran sido un tratamiento más efectivo para esta paciente. Por su parte, el PDX-685 luminal resultó sensible a TAM. Si bien la paciente fue tratada con AI como tratamiento adyuvante y hasta los últimos registros la paciente no mostraba signos de progresión tumoral, el TAM también sería una terapia adecuada. El restante PDX luminal 707, mostró una regresión casi total con el tratamiento de TAM y la paciente 707 no muestra evidencia de progresión a dicha terapia. Teniendo en cuenta que el establecimiento de un PDX es en sí mismo una característica de mal pronóstico, esta información podría ser útil para el oncólogo. Por último, si bien el PDX-474 respondió a ambos tratamientos contra HER2, mostró una regresión total con TDM1. El TDM1 es un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por TZ y el inhibidor de microtúbulos emtansina (DM1). El ensayo clínico KATHERINE evaluó la progresión libre de enfermedad en pacientes con los tratamientos adyuvantes TDM1 o TZ, siendo el TDM1 un 50% más efectivo (Von Minckwitz et al., 2019). Lamentablemente esta paciente no fue tratada con dichos anticuerpos contra HER2, sino que se optó por quimioterapia y lapatinib, probablemente porque tendría trastornos cardíacos que la harían no apta para otros tratamientos. En su conjunto, estos resultados muestran que los PDX se comportan de forma similar a los tumores parentales y nos proveen información sobre el beneficio de ciertas terapias.

Los ensayos co-clínicos evalúan la evolución de la paciente y de su PDX asociado. De esta forma se puede ensayar combinaciones terapéuticas en un PDX avatar, para tomar decisiones sobre qué tratamiento podría ser mejor para cada paciente. En particular para CaM no existen ensayos co-clínicos en curso, ya que recién se está

evaluando la factibilidad de dichos ensayos (NCT04608357). En otros carcinomas como sarcomas, de cabeza y cuello, ovario y páncreas sí existen ensayos vigentes (Byrne et al., 2017). En el caso de nuestro Biobanco, la realización de experimentos en paralelo con los PDX presenta dificultades, ya que tardan entre 300 días (PDX TN) a 600 días (PDX luminales y HER2+) en obtenerse resultados. En la última década, se establecieron modelos de organoides que crecen a partir de células *stem* y que tienen la capacidad de auto-organizarse en estructuras 3D que recapitulan, de cierta manera, el tejido de origen. Son alternativas más económicas de desarrollar que un PDX, y que actualmente están ganando popularidad como modelos preclínicos relevantes para el desarrollo de fármacos antineoplásicos. Sin embargo, los organoides no pueden imitar la vasculatura y las interacciones tumor-estroma (Bleijs et al., 2019; Rodrigues et al., 2021). Un modelo alternativo es el cultivo de tejido *ex vivo* o BTC que, si bien mantiene la arquitectura del tumor del paciente, no puede expandirse ni criopreservarse. Dicha técnica se puso a prueba utilizando el PDX-485 y nos permitió obtener resultados más rápidos, ya que con un solo ratón portador del PDX, pudimos evaluar la sensibilidad a varios agentes terapéuticos simultáneamente. Con este ensayo piloto pudimos observar que existe una correlación con la sensibilidad a la DOXO *in vivo* y *ex vivo*.

Los ensayos con PDX han aportado gran cantidad de resultados novedosos y clínicamente relevantes, y permiten un enfoque terapéutico personalizado. En la última década, las colecciones de PDX en EE.UU. y Europa han aumentado exponencialmente. Sin embargo, estos estudios presentan varias limitaciones y aún no reflejan el espectro total de la enfermedad. En la práctica se observa que los PDX exitosos son aquellos con los fenotipos más agresivos. También hay que tener en cuenta que puede haber selección clonal de aquellas células capaces de crecer dentro del ratón, por lo que los PDX posiblemente presenten disminución de la heterogeneidad tumoral respecto de los tumores parentales.

El patrimonio genético de una población es un dato fundamental para comprender la sensibilidad a determinadas enfermedades, la respuesta a tratamientos, y las manifestaciones clínicas, entre otros factores. Existen a nivel mundial diferentes organismos, como la Iniciativa de Medicina de Precisión del NIH de EE.UU., cuyo objetivo es entender cómo el estudio de la genética, el ambiente y el estilo de vida de una

persona ayudan a determinar el mejor enfoque para la prevención o tratamiento de enfermedades y elaborar políticas públicas dirigidas particularmente hacia la población.

Argentina cuenta con una importante historia de mestizaje, única e irrepetible, por lo que es imprescindible conocer las características genéticas de la población. En el año 2016 se inició el proyecto PoblAR (<https://www.conicet.gov.ar/poblar-un-biobanco-de-referencia-nacional/>) que es el primer repositorio de datos genómicos de Argentina, el cual aún se encuentra en la etapa de recolección de datos. El análisis de las características poblacionales es algo reciente en nuestra historia, y, hasta el momento, no existe otro Biobanco de PDX de CaM en Argentina, ni en América Latina. Dicho esto, los PDX establecidos hasta el momento, y los que seguimos generando con pacientes que asistan al Hospital de Pacheco, la mayoría del Gran Buenos Aires, y otros de Paraguay y Bolivia, permitirá tener modelos adecuados para estudios de medicina de precisión en nuestra región.

Sección “Terapia combinada”

El uso de terapias combinadas se basa en que dos drogas que tienen blancos terapéuticos que interactúan entre sí, se combinan para aumentar la eficacia terapéutica, disminuir sus dosis y, en consecuencia, sus efectos adversos, y eventualmente sobrepasar la resistencia a tratamientos (Correia et al., 2021). De esta forma, atacar una red de señalización a varios niveles puede traer un efecto aditivo o sinérgico. Se ha observado que existe una inhibición sinérgica cuando se combina PALBO con una ET contra ER, como es TAM (Finn et al., 2009). TAM actúa inhibiendo a ER, el cual, entre otras cosas, aumenta los niveles de ciclina D1. Indirectamente, al disminuir la expresión de la ciclina D1, disminuye la fosforilación de RB (Yang et al., 2017). Estos resultados demuestran que las terapias combinadas direccionadas al eje RB-E2F en tumores luminales ofrecen el máximo beneficio terapéutico. Aún más, se ha demostrado que pacientes tratadas con la combinación de ET+PALBO o el quimioterápico capecitabina, presentan una supervivencia global comparable. Sin embargo, las pacientes tratadas con el tratamiento combinado presentan una disminución en los eventos adversos (Martin et al., 2022).

En pacientes que recurren luego de la ET estándar, se elige la combinación de iCDK4/6 cambiando a su vez la hormonoterapia que se está utilizando. Por ejemplo, si se administró TAM (SERM) en primera línea, se cambia por FULVE (SERD) en segunda línea (Hartkopf et al., 2020). Nuestro laboratorio propone el uso de hormonoterapias dirigidas a PR, para ser incluidas en esquemas terapéuticos en un futuro. Proponemos que sólo las pacientes con tumores luminales PRA-H se beneficiarían de esta terapia. Recientemente, hemos publicado los resultados del ensayo clínico MIPRA (NCT 02651844; Elia et al., 2023) demostrando nuestra hipótesis. Es por eso que nos interesa evaluar los efectos de MFP en combinación con las terapias que están actualmente en uso para CaM. En esta tesis nos focalizamos en la combinación MFP e iCDK4/6, ya que en el laboratorio se ha ensayado el uso de TAM en combinación con MFP en el modelo murino C4-HI obteniendo beneficios terapéuticos (Tesis Wargon, 2010). También existen datos bibliográficos sobre el beneficio de dicha combinación en xenotransplantes de células MCF-7 (El Etreby & Liang, 1998). Asimismo, hemos explorado en estudios preclínicos la combinación de MFP con anticuerpos anti-PDL1 mostrando resultados promisorios (Sequeira et al., 2021), y la combinación con nanoquimioterapia (Sequeira et al., 2014).

En este trabajo de tesis demostramos que en modelos de carcinomas mamarios PRA-H, la terapia combinada MFP+PALBO es superior que las terapias simples. Estos resultados se evidenciaron claramente en los modelos en cultivo, en los que fue posible manipular las concentraciones de ambas drogas y encontramos la ventana óptima para ver el efecto de la combinación. Fue más difícil confirmar este efecto en los modelos murinos *in vivo* debido al efecto robusto de MFP sobre el crecimiento tumoral. Sin embargo, en el modelo humano T47D-WT *in vivo*, sí se pudo evidenciar la superioridad de la terapia combinada.

Teniendo en cuenta que establecimos y caracterizamos al PDX-685 luminal como sensible a las terapias simples TAM, MFP y PALBO, nos pareció que éste sería el modelo ideal para probar la triple combinación *in vivo*. Lamentablemente, en el último tiempo la colonia de ratones NSG sufrió una baja de producción por diversos motivos, pero actualmente se está reactivando y esperamos tener suficientes animales para continuar con estos ensayos. El tumor de la paciente 685 tenía un perfil de isoformas dudoso, y no

lo pudimos clasificar en función de la proporción de PR. Recordemos que contamos con fragmentos pequeños de los tumores de las pacientes para realizar la extracción de proteínas, y muchas veces el material alcanza para solo dos corridas de WB. Sin embargo, cuando establecimos el PDX y determinamos la proporción de isoformas de PR, lo clasificamos sin lugar a dudas como PRA-H. Debido a que los PDX se suplementaron con E2, nos preguntamos si el tratamiento hormonal podría favorecer la expresión de PRA. Un efecto similar se observó en el modelo murino, en el cual el tratamiento con E2 indujo un aumento de los niveles de PR total, favoreciendo principalmente a la isoforma PRA (Wargon et al., 2009). Este es otro punto de interés para seguir investigando.

Los estudios con el modelo murino nos permitieron demostrar que la sensibilidad a MFP está dissociada de la sensibilidad a iCDK4/6, y ahora disponemos de modelos bien caracterizados en los cuales se podrán investigar los mecanismos de resistencia a dichas terapias. De hecho, estamos realizando los estudios de RNA-Seq y Exome-Seq de las 4 variantes murinas para dilucidar los mecanismos de resistencia. Será interesante evaluar si las variantes resistentes a PALBO poseen alguno de los marcadores genómicos de resistencia ya descritos, como son la amplificación de FGFR1, la pérdida de PTEN, mutaciones en las vías de reparación del DNA, pérdida funcional de RB o la sobreexpresión de Ciclina E y CDK2 (Lee et al., 2022), o identificar nuevos marcadores. En estudios previos, se observó por WB que la familia de tumores murinos resistente a PALBO no expresaba el CDKi p16, mientras la familia sensible si lo expresaba (Tesis Wargon, 2010; Wargon et al., 2011). Dado que la pérdida de p16, desreprime el eje RB-E2F, algunos autores postulan que estos tumores podrían ser más sensibles a PALBO (Konecny et al., 2011) mientras que otros postulan que por pérdida de p16 podrían ser resistentes a PALBO (McCartney et al., 2019). Sin embargo, estudios clínicos mostraron que la delección de p16 no es un marcador predictor de respuesta (Finn et al., 2015).

Los resultados con los distintos modelos de CaM utilizados en este trabajo de tesis nos permitieron dilucidar un posible mecanismo por el cual convergen las acciones del antiprogéstágeno MFP y del iCDK4/6 PALBO. Nos enfocamos en E2F1 y RB porque son los blancos principales afectados por los iCDK4/6 y existían evidencias de que E2F1

estaría regulado por progestágenos/PR (Wade et al., 2010). Demostramos que en todos los modelos PRA-H respondedores a ambas drogas, tanto *in vivo* como *in vitro*, los tratamientos simples disminuyeron los niveles de fosforilación de RB y los niveles de E2F1. La terapia combinada disminuyó más eficientemente dichas proteínas en ensayos en cultivo, mostrando así una convergencia entre ambas vías. En la mayoría de los ensayos se evaluó pRB sin relativizarlo a la cantidad de RB total, sino al control de carga. Esta metodología se basó en datos bibliográficos donde se demostró que PALBO no altera los niveles de RB total (Qin et al., 2015; Herrera-Abreu et al., 2016; Fry et al., 2017; Guarducci et al., 2018). En células T47D pudimos corroborar estos resultados, dado que los niveles de RB total no se vieron alterados por los tratamientos simples ni combinados, pero sí se vio alterado su nivel de fosforilación.

La incapacidad de disminuir la fosforilación de RB es un predictor de resistencia a PALBO (Arnedos et al., 2018). En nuestro modelo murino, observamos que cuando existe resistencia *in vivo* no hay disminución de pRB (C4-HI) o, notoriamente, se observa un aumento (C4-2-HI). En bibliografía no hay reportes sobre un aumento de pRB luego del tratamiento con PALBO en modelos resistentes a dicho iCDK4/6. En cambio, se ha observado que, en líneas resistentes adquiridas por presión del inhibidor, existen bajos niveles basales de pRB y RB con respecto a su contraparte sensible (Guarducci et al., 2018; Ono et al., 2021). En nuestro modelo murino resistente a PALBO observamos menor marca de pRB que en el tumor sensible. En este caso, no sabemos si la diferencia se encuentra en RB total o en la fosforilación. La adquisición de mutaciones en RB se ha reportado en pacientes con resistencia adquirida al tratamiento con PALBO (Condorelli et al., 2018) y los estudios de Exome-Seq nos brindarán información sobre si esto sucede en nuestro modelo resistente.

En relación al tratamiento con MFP, la expresión basal de pRB no pareciera explicar su sensibilidad o resistencia a la droga. El tumor resistente a PALBO (C4-HI), que posee baja expresión de pRB, es sensible a MFP. Sin embargo, posee menor sensibilidad que el doble sensible (59-2-HI). La variante resistente a MFP de esta familia (59-HI) posee igual o mayor expresión de pRB que el C4-HI. En resumen, no existe una correlación entre la expresión relativa de pRB entre las variantes murinas y su sensibilidad a MFP.

En el tumor C4-HI, respondedor a MFP, pRB disminuye luego del tratamiento, pero el tratamiento de PALBO es incapaz de inducir dicha disminución. Esto podría sugerir que ambos agentes disminuyen pRB por mecanismos distintos. La MFP tiene múltiples efectos sobre la célula tumoral, pero en lo que se refiere al eje RB-E2F, disminuye la expresión de ciclina D1 reduciendo así al complejo que inicia la fosforilación de RB. Además, induce un aumento de los niveles de p21, el cual inhibe al complejo ciclina E/CDK2, impidiendo la hiperfosforilación de RB. De esta forma, la célula es sensible de ser inhibida en dos niveles: ciclina D y ciclina E. Por otra parte, PALBO es un inhibidor altamente específico de CDK4/6 pudiendo solo inhibir al nivel del complejo ciclina D/CDK4/6. Es posible que el modelo C4-HI (sensible MFP/resistente PALBO) tenga modificaciones a nivel de ciclina D/CDK4/6, lo que lo hace resistente a PALBO, pero que MFP sea aún capaz de reducir los niveles de pRB al inhibir al complejo ciclina E/CDK2. Estos resultados explicarían por qué en los tumores murinos sensibles a ambas drogas la respuesta a MFP es muy superior a la respuesta a PALBO.

Como ya mencionamos anteriormente, el factor E2F1 es clave mediando la proliferación celular. Tiene acción sobre su propio promotor y, por ende, regula su expresión. Se ha reportado que el tratamiento con PALBO disminuye E2F1 y sus genes *target*, fenómeno relacionado a la falta de disponibilidad de E2F1 para inducir la transcripción de sí mismo dado su secuestro por RB (Michaloglou et al., 2018). Sin embargo, en el tratamiento con antiprogéstágenos, no estaba claro que su acción inhibitoria estuviera asociada a una disminución de pRB, ya que existen pocas publicaciones que describan su acción sobre el eje RB-E2F (Musgrove et al., 1997; Alban et al., 2001; Wade et al., 2010). Nuestros resultados muestran una reducción de los niveles de ARNm de *E2F1* sólo en células con alta expresión de PRA, reportando por primera vez esta acción de MFP sobre la transcripción de E2F1. Este efecto podría ser explicado por una disminución de la autorregulación de E2F1 (como en el caso del PALBO) o por una acción directa de PR sobre el promotor del gen.

EL gen de *E2F1* posee sitios *enhancer* modulados por PR en regiones regulatorias de la transcripción. Para evaluar si PR/MFP regulaba dicho gen, hicimos ensayos de ChIP utilizando células que solo expresan PRA. Demostramos que MFP aumenta el reclutamiento de PRA a dicho sitio en el promotor, evidenciando así una regulación

directa sobre el gen. Haber observado un pequeño aumento en el reclutamiento del correpresor SMRT y disminución del coactivador AIB1, apuntan a un rol represor de PR sobre la transcripción de *E2F1*.

Un dato interesante que surgió en este trabajo de tesis fue el aumento en los niveles de PR luego del tratamiento con PALBO en distintos modelos experimentales. Es posible que el aumento de PR se deba al aumento de los niveles de ciclina D1 inducidos por el tratamiento con PALBO (Herrera-Abreu et al., 2016), y que, a su vez, dicha proteína regule positivamente la expresión de PR (Yang et al., 2010). Un aumento en los niveles de PR tendría un beneficio adicional respecto a la terapia con antiprogéstágenos, siempre y cuando el tumor se mantenga PRA-H. En las células resistentes a PALBO también se observa un aumento de PR, lo que indica que este aumento no es consecuencia de la inhibición de la proliferación celular.

En resumen, los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* utilizando aproximaciones diferentes (PDX, modelo murino, CDX y T47D), son concluyentes y novedosos en cuanto a la inhibición de la proliferación y crecimiento tumoral de la terapia combinada de MFP y PALBO en modelos PRA-H. Existiría una convergencia entre ambos compuestos regulando al eje RB-E2F, aunque de forma diferente.

A continuación, sugerimos un modelo para explicar la acción de MFP y PALBO sobre el eje RB-E2F1 en CaM (**Figura D-1**). La regulación de MFP sobre E2F1 puede darse de forma directa (mediando el reclutamiento de PRA sobre sitios regulatorios de la transcripción), y de forma indirecta (disminuyendo la fosforilación de RB). PALBO refuerza dicha inhibición de la fosforilación de RB, al interferir con las quinasas correspondientes (CDK4/6).

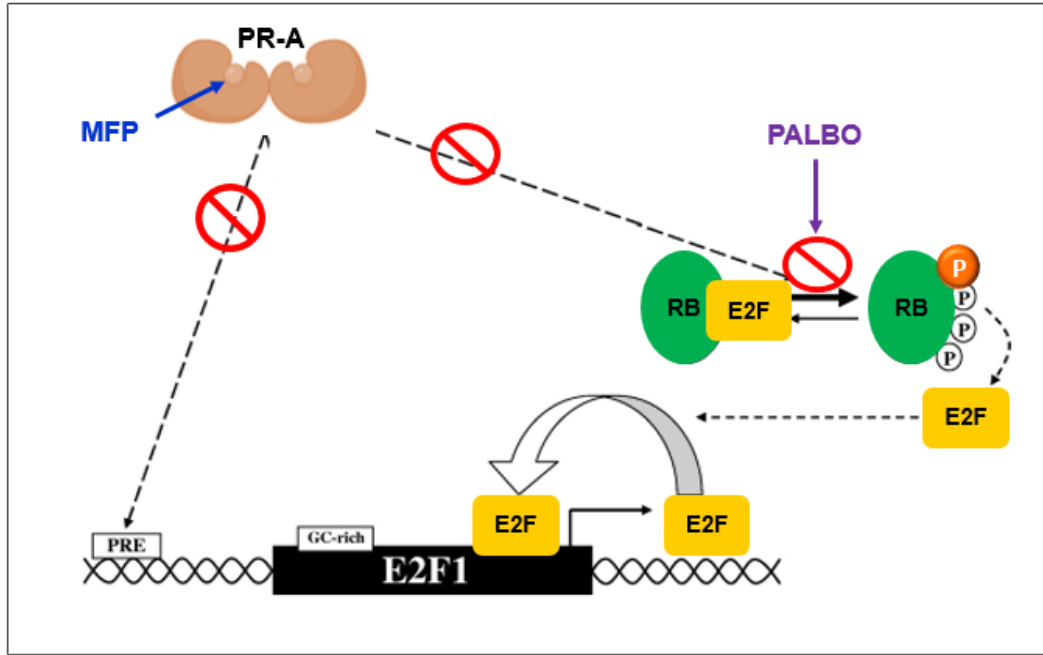


Figura D-1. Modelo propuesto de regulación de la isoforma A de PR sobre la expresión de E2F1 luego del tratamiento con MFP y PALBO. MFP se une a PRA e interacciona con secuencias regulatorias del gen de E2F1 y disminuye su expresión. Por otro lado, MFP induce una disminución de la fosforilación de RB, y esta función está compartida con PALBO.

CONCLUSIÓN GENERAL

Este trabajo de tesis aporta, por un lado, la caracterización de modelos PDX de CaM que reflejan, en parte, nuestro bagaje genético y son una herramienta valiosa para la medicina de precisión. Por otro lado, hemos avanzado en el estudio de los mecanismos asociados a terapias endócrinas que tienen como blanco terapéutico al PR, y analizamos cómo se pueden potenciar dichos efectos al combinarlo con iCDK4/6.

Demostramos que en tumores PRA-H los tratamientos combinados pueden ser más eficientes que los simples, ya que si bien ambas terapias actúan sobre el eje RB-E2F1, los mecanismos por los cuales las afectan son diferentes. Además, mostramos cómo las isoformas de PR tienen una acción diferencial sobre dicho eje.

Hemos individualizado tumores murinos con sensibilidad/resistencia a las terapias simples que nos permitirán continuar ahondando en el estudio de los mecanismos asociados a la resistencia a los tratamientos. Si bien actualmente la terapia con antiprogéstágenos no es una opción clínica, existe un gran interés en su utilización en el tratamiento del CaM, por lo que es relevante discriminar las pacientes que se beneficiarían de nuevas alternativas o combinaciones terapéuticas.

APÉNDICE

MANEJO DE CÉLULAS

▽ Medio de cultivo DMEM/F12 (*Dulbecco's modified eagle's médium*):

Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada y se esterilizó por filtración (0,22 μm)

Ham's F12, 1:1 (Corning) sin rojo fenol5,6 g/l

Bicarbonato de Sodio (Sigma Aldrich)1,2 g/l

Glutamina.....2 mM

▽ Suero Fetal Bovino (SFB):

Antes de ser utilizado, el suero fetal bovino (Natocor, Argentina) se deconplementó calentado en baño térmico a 56°C por 30 minutos.

▽ Solución de tripsina-EDTA:

Tripsina (Gibco).....0,25 %

EDTA (Laboratorios Anedra).....0,02 %

Disuelto en PBS 1X y esterilizado por filtración (0,1 μm). Se fraccionó en tubos de 50 ml y se almacenó a -20°C.

▽ Buffer fosfato sin Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺ (PBS 10X):

Na₂HPO₄.12H₂O (fosfato dibásico de sodio, dodecahidratado, Anedra):.....30,06 g

NaH₂PO₄.H₂O (fosfato monobásico de sodio, monohidratado, Anedra):.....2,56 g

NaCl (cloruro de sodio, Anedra):.....87,60 g

Se disolvió todo en H₂O_d hasta alcanzar un volumen de 1 litro. Para trabajar (PBS 1X), se preparó una dilución 1:10 con H₂O_d.

▽ Medio de congelado de células:

SFB (Natocor, Argentina):.....20 %.

DMSO (Sigma Aldrich):.....10 %.

Disuelto en DMEM F12. Se esterilizó por filtración (0,1 μ m), se fraccionó en tubos de 50 ml y se almacenó a -20°C.

ENSAYOS DE WESTERN BLOT

▽ **Buffer RIPA:**

Tris (Invitrogen):.....0,121 g

NaCl (Anedra):.....0,876 g

Vanadato de sodio (Sigma):.....0,0367 g

Deoxicolato de sodio (Sigma):.....1 g

SDS (Merck):.....0,1 g

Igepal CA-630 (Sigma):.....1 ml

Se disolvió todo en 100 ml de H₂O_d y se llevó a pH 7,5. Se almacenó a 4°C. Al momento de usar se le adicionaron inhibidores de proteasas y fosfoproteasas.

NaF (Cicarelli).....solución de trabajo: 0,025 M

β -Glicerofosfato disódico pentahidratado (Chem Cruz)solución de trabajo: 10 mM

Cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich, P8340)..... 1/100

▽ **Acrilamida 30 %:**

Acrilamida (Invitrogen):.....29 g

Bisacrilamida (Invitrogen):.....1 g

Se disolvió todo en 100 ml de H₂O_d en agitación por 30 min. La solución se filtró (0,45 μ m) y se almacenó a 4°C, protegida de la luz.

▽ **Tris-HCl 1.0 M pH 6,8:**

Se disolvieron 60,57 g de Tris (Invitrogen) en 400 ml de H₂O_d y llevó a pH 6,8 con HCl 1M. Se completó el volumen hasta 500 ml con H₂O_d y se almacenó a 4°C.

▽ **Tris-HCl 1,5 M pH 8,8:**

Se disolvieron 90,85 g de Tris (Invitrogen) en 400 ml de H₂O_d y llevó a pH 8,8 con HCl 1M. Se completó el volumen hasta 500 ml con H₂O_d y se almacenó a 4°C.

▽ **SDS 10 %:**

Se disolvieron 10g de SDS (Merck) en 100 ml de H₂Od. Se almacenó a temperatura ambiente.

▽ **Persulfato de amonio 10 % (APS):**

Se disolvió 1 g de APS (GE Healthcare) en 10 ml de H₂Od. Se fraccionó en tubos de 1,5 ml y se almacenó a -20°C.

▽ **TBS 10X pH 7,4:**

Tris (Invitrogen):.....60,6 g

NaCl (Anedra):.....87,6 g

Se llevó a 1 litro con H₂Od y se diluyó 1:10 en H₂Od antes de usar (TBS 1X).

▽ **TBS-T (TBS 1X-Tween 0.1 %):**

Se agregó 1 ml de Tween 20 (Anedra) por cada litro de TBS 1X pH 7,4.

▽ **Cracking Buffer o solución de siembra 4X:**

SDS (Merck):.....8 %

β- mercaptoetanol (Sigma):.....20 % v/v

Glicerol (Sintorgan):.....40 %

Tris (Invitrogen):.....0,25 M

Azul de Bromo Fenol (Sigma):.....0,04 % p/v

Se diluyó todo en H₂Od, se fraccionó en tubos de 1,5 ml y se almacenó a -20°C.

▽ **Buffer de corrida 10X:**

Tris (Invitrogen):.....30 g

Glicina (Invitrogen):.....144 g

SDS (Merck):.....10 g

Se disolvió todo en un litro de H₂Od y se almacenó a 4°C. Para su uso, se diluyó 1:10 en H₂Od (buffer de corrida 1X).

▽ **Buffer de transferencia:**

Buffer de corrida 1X:.....800 ml

Metanol para análisis (Laboratorios Cicarelli):.....200 ml

▽ **Soluciones de bloqueo:**

Se disolvió leche descremada en polvo 5 % en TBS-T.

Se disolvió BSA 5% en PBS 1X.

Se utilizó una u otra solución de acuerdo con las instrucciones de fábrica de cada anticuerpo.

▽ **Sustrato quimioluminiscente:**

Se mezclaron las soluciones (A) y (B) y se colocó el resultante sobre las membranas de nitrocelulosa por 1 minuto antes de exponer las películas fotográficas.

(A) 4,6 ml de H₂O_d + 333 µl Tris pH 8,8 + 50 µl luminol + 22 µl ácido cumárico.

(B) 4,6 ml de H₂O_d + 333 µl Tris pH 8,8 + 22 µl H₂O₂ (Parafarm, 30 volúmenes).

Luminol (A8511, Sigma):.....22 mg en 500 µl de DMSO

Ácido cumárico (C9008, Sigma):7,5 mg en 500 µl de DMSO

ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

▽ **Fijadores y permabilizantes de membrana para IF:**

Tritón X-100 en PBS: se diluyeron 0,25 ml de tritón X-100 (Anedra) en 100 ml de metanol absoluto o PBS, según el caso.

▽ **DAPI**

Se diluyó 1 µl de DAPI (Sigma) 1 mg/ml en 1 ml de PBS 1X.

ENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNm

▽ **H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato):**

Se preparó agregando 0,01 ml de DEPC a 100 ml de H₂O_d. Posteriormente, se autoclavó.

▽ **Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X:**

Tris base:.....242 g
Ácido acético glacial (laboratorio Cicarelli):.....57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8):.....100 ml

Se llevó a 1 litro de volumen final con H₂Od. La solución de trabajo se obtuvo diluyendo 1:50 con H₂Od.

▽ **Gel de agarosa 1,2 %:**

Se preparó mezclando 0,6 g de agarosa (Invitrogen) en 50 ml de TAE 1X y calentando en microondas hasta disolver.

ENSAYO DE CHIP

▽ **SFB adsorbido con carbón dextrano (SFBcharcolizado):**

Se incubó el SFB con carbón activado al 5 % (Mallinckrodt) por 1 hora a 4°C con agitación permanente. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó 2 veces a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se incubó con 5 % de carbón activado ON a 4°C. Al día siguiente, el suero se centrifugó entre 10 y 15 veces hasta que se eliminó completamente el carbón y se esterilizó por filtración (0,1 µm). Luego, se fraccionó en tubos de 15 ml y se almacenó a -20°C.

INMUNOHISTOQUÍMICA

▽ **Buffer citrato para recaptura antigénica (10 mM):**

Se disolvieron 2,94 g de citrato de sodio (Laboratorios Cicarelli) en un litro de H₂Od. Se llevó a pH 6 con NaOH y HCl 1 M.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS TUMORALES

▽ **Buffer A**

Tris (Invitrogen):.....40,27 g
EDTA (Laboratorios Anedra):.....55,8 mg
Na₂MoO₄.2H₂O (Merck):.....0,491 g

Se disolvió todo en 100 ml de H₂Od y se llevó a pH 7. Se almacenó a 4°C.

TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PDX

▽ **Buffer de lisis**

NaCl.....0,58 g

Tris-Cl 1M pH 8.....1 ml

EDTA 0,5M pH 8.....5 ml

SDS 10%.....5 ml

Se llevó a 100 ml de H₂O_d

▽ **Acetato de amonio**.....57,8 g

Se llevó a 100 ml de H₂O_d. Concentración final: 7,5 M

▽ **Buffer Tris-EDTA**

Tris-Cl 1 M pH 8.....1 ml

EDTA 0,5 M pH 8.....200 µl

Se llevó a 100 ml de H₂O_d.

BIBLIOGRAFÍA

Abascal MF, Elia A, Alvarez M, Pataccini G, Sequeira G, Riggio M et al. (2022) Progesterone receptor isoform ratio dictates antiprogestin/progestin effects on breast cancer growth and metastases: A role for NDRG1. *Int J Cancer* **150**: 1481-1496

Abdolahi S, Ghazvinian Z, Muhammadnejad S, Saleh M, Asadzadeh Aghdaei H, Baghaei K (2022) Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *J Transl Med* **20**: 206

Alban P, Hurd C, Dinda S, Khattree N, Moudgil VK (2001) Differential regulation of retinoblastoma protein by hormonal and antihormonal agents in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **77**: 135-141

Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL et al. (2020) Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol* **38**: 1346-1366

Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS et al. (2019) Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New Engl J Med* **380**: 1929-1940

Arnedos M, Bayar MA, Cheaib B, Scott V, Bouakka I, Valent A et al. (2018) Modulation of Rb phosphorylation and antiproliferative response to palbociclib: the preoperative-palbociclib (POP) randomized clinical trial. *Ann Oncol* **29**: 1755-1762

Batalini F, Xiong N, Tayob N, Polak M, Eismann J, Cantley LC et al. (2022) Phase 1b Clinical Trial with Alpelisib plus Olaparib for Patients with Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **28**: 1493-1499

Belachew EB, Sewasew DT (2021) Corrigendum: Molecular Mechanisms of Endocrine Resistance in Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer. *Front Endocrinol* **12**: 689705

Beleut M, Rajaram RD, Caikovski M, Ayyanan A, Germano D, Choi Y et al. (2010) Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2989-2994

Bergamaschi A, Hjortland GO, Triulzi T, Sorlie T, Johnsen H, Ree AH et al. (2009) Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models. *Mol Oncol* **3**: 469-482

Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, Drost J (2019) Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J* **38**: e101654

Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL et al. (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* **8**: 269-280

Bretones G, Delgado MD, Leon J (2015) Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta* **1849**: 506-516

Brisken C (2013) Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat Rev Cancer* **13**: 385-396

Brisken C, Scabia V (2020) 90 YEARS OF PROGESTERONE: Progesterone receptor signaling in the normal breast and its implications for cancer. *J Mol Endocrinol* **65**: T81-T94

Byrne AT, Alferez DG, Amant F, Annibaldi D, Arribas J, Biankin AV et al. (2017) Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer* **17**: 254-268

Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA (2006) Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem* **97**: 261-274

Cangi MG, Cukor B, Soung P, Signoretti S, Moreira G, Jr., Ranashinge M et al. (2000) Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *J Clin Invest* **106**: 753-761

Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R et al. (2004) Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* **24**: 7260-7274

Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004) RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 355-366

Condorelli R, Spring L, O'Shaughnessy J, Lacroix L, Bailleux C, Scott V et al. (2018) Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* **29**: 640-645

Correia AS, Gartner F, Vale N (2021) Drug combination and repurposing for cancer therapy: the example of breast cancer. *Heliyon* **7**: e05948

Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N et al. (2016) Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3):

final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* **17**: 425-439

Chen Q, Wei T, Wang J, Zhang Q, Li J, Zhang J et al. (2020) Patient-derived xenograft model engraftment predicts poor prognosis after surgery in patients with pancreatic cancer. *Pancreatology* **20**: 485-492

Daniel AR, Gaviglio AL, Czaplicki LM, Hillard CJ, Housa D, Lange CA (2010) The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. *Mol Endocrinol* **24**: 2126-2138

Daniel AR, Hagan CR, Lange CA (2011) Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* **6**: 359-369

DeRose YS, Wang G, Lin YC, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MT et al. (2011) Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med* **17**: 1514-1520

Dickler MN, Tolaney SM, Rugo HS, Cortes J, Dieras V, Patt D et al. (2017) MONARCH 1, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HR(+)/HER2(-) Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **23**: 5218-5224

Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, Aparicio S, Behbod F, Bentires-Alj M et al. (2016) Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev* **35**: 547-573

Dong G, Ma G, Wu R, Liu J, Liu M, Gao A et al. (2020) ZFH3 Promotes the Proliferation and Tumor Growth of ER-Positive Breast Cancer Cells Likely by Enhancing Stem-Like Features and MYC and TBX3 Transcription. *Cancers* **12**

Dong XY, Sun X, Guo P, Li Q, Sasahara M, Ishii Y, Dong JT (2010) ATBF1 inhibits estrogen receptor (ER) function by selectively competing with AIB1 for binding to the ER in ER-positive breast cancer cells. *J Biol Chem* **285**: 32801-32809

Eggersmann TK, Degenhardt T, Gluz O, Wuerstlein R, Harbeck N (2019) CDK4/6 Inhibitors Expand the Therapeutic Options in Breast Cancer: Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *BioDrugs* **33**: 125-135

El Etreby MF, Liang Y (1998) Effect of antiprogesterins and tamoxifen on growth inhibition of MCF-7 human breast cancer cells in nude mice. *Breast Cancer Res Treat* **49**: 109-117

Elfgen C, Bjelic-Radusic V (2021) Targeted Therapy in HR+ HER2- Metastatic Breast Cancer: Current Clinical Trials and Their Implications for CDK4/6 Inhibitor Therapy and beyond Treatment Options. *Cancers* **13**

Elia A, Saldain L, Vanzulli SI, Helguero LA, Lamb CA, Fabris V, Pataccini G et al. (2023) Beneficial Effects of Mifepristone Treatment in Patients with Breast Cancer Selected by the Progesterone Receptor Isoform Ratio: Results from the MIPRA Trial. *Clin Cancer Res* **29**: 866-877

Eyre R, Alferez DG, Spence K, Kamal M, Shaw FL, Simoes BM et al. (2016) Patient-derived Mammosphere and Xenograft Tumour Initiation Correlates with Progression to Metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **21**: 99-109

Faivre EJ, Daniel AR, Hillard CJ, Lange CA (2008) Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol Endocrinol* **22**: 823-837

Fiche M, Scabia V, Aouad P, Battista L, Treboux A, Stravodimou A et al. (2019) Intraductal patient-derived xenografts of estrogen receptor alpha-positive breast cancer recapitulate the histopathological spectrum and metastatic potential of human lesions. *J Pathol* **247**: 287-292

Finn RS, Aleshin A, Slamon DJ (2016) Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res* **18**: 17

Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO et al. (2015) The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* **16**: 25-35

Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ et al. (2009) PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast cancer Res* **11**: R77

Fontes-Sousa M, Amorim M, Salta S, Palma De Sousa S, Henrique R, Jeronimo C (2019) Predicting resistance to endocrine therapy in breast cancer: It's time for epigenetic biomarkers (Review). *Oncol Rep* **41**: 1431-1438

Garcia-Gutierrez L, Delgado MD, Leon J (2019) MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes. *Genes* **10**

Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP (2000) The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* **20**: 3102-3115

Giulianelli S, Cerliani JP, Lamb CA, Fabris VT, Bottino MC, Gorostiaga MA et al. (2008) Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *Int J Cancer* **123**: 2518-2531

Goetz MP, Kalari KR, Suman VJ, Moyer AM, Yu J, Visscher DW et al. (2017a) Tumor Sequencing and Patient-Derived Xenografts in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* **109**

Goetz MP, Toi M, Campone M, Sohn J, Paluch-Shimon S, Huober J et al. (2017b) MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol* **35**: 3638-3646

Graham JD, Yager ML, Hill HD, Byth K, O'Neill GM, Clarke CL (2005) Altered progesterone receptor isoform expression remodels progesterin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **19**: 2713-2735

Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL (1995) Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* **55**: 5063-5068

Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP (2016) Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol* **428**: 3831-3849

Guarducci C, Bonechi M, Benelli M, Biagioni C, Boccalini G, Romagnoli D et al. (2018) Cyclin E1 and Rb modulation as common events at time of resistance to palbociclib in hormone receptor-positive breast cancer. *NPJ breast cancer* **4**: 38

Guillen KP, Fujita M, Butterfield AJ, Scherer SD, Bailey MH, Chu Z et al. (2022) A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nat Cancer* **3**: 232-250

Hagan CR, Regan TM, Dressing GE, Lange CA (2011) ck2-dependent phosphorylation of progesterone receptors (PR) on Ser81 regulates PR-B isoform-specific target gene expression in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **31**: 2439-2452

Hartkopf AD, Grischke EM, Brucker SY (2020) Endocrine-Resistant Breast Cancer: Mechanisms and Treatment. *Breast Care* **15**: 347-354

Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A, Shyamala G, Lanari C, Molinolo AA (2003) Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res Treat* **79**: 379-390

Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, Rivas MA, Cutts RJ, Garcia-Murillas I et al. (2016) Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Res* **76**: 2301-2313

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C et al. (2014) Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* **4**: 998-1013

Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S et al. (2016) Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **375**: 1738-1748

Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S et al. (2018) Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Ann Oncol* **29**: 1541-1547

Hwang HC, Clurman BE (2005) Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**: 2776-2786

Institute of Laboratory Animal Resources CoLSNRC (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Washington, D.C.: National Academy Press.

Islam S, Afrin S, Jones SI, Segars J (2020) Selective progesterone receptor modulators-mechanisms and therapeutic utility. *Endocr Rev*

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K et al. (2002) NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**: 3175-3182

Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB (1997) The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* **11**: 693-705

Jacobsen BM, Richer JK, Schittone SA, Horwitz KB (2002) New Human Breast Cancer Cells to Study Progesterone Receptor Isoform Ratio Effects and Ligand-independent Gene Regulation. *J Biol Chem* **277**: 27793-27800

Jafari H, Hussain S, Campbell MJ (2022) Nuclear Receptor Coregulators in Hormone-Dependent Cancers. *Cancers* **14**

Kastellorizios M, Tipnis N, Burgess DJ (2015) Foreign Body Reaction to Subcutaneous Implants. *Adv Exp Med Biol* **865**: 93-108

Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M et al. (1979) Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* **15**: 659-670

Konecny GE, Winterhoff B, Kolarova T, Qi J, Manivong K, Dering J, et al. (2011). Expression of p16 and retinoblastoma determines response to CDK4/6 inhibition in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **6**: 1591–1602.

Kumari R, Jat P (2021) Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol* **9**: 645593

Kuwata T, Yanagihara K, Iino Y, Komatsu T, Ochiai A, Sekine S et al. (2019) Establishment of Novel Gastric Cancer Patient-Derived Xenografts and Cell Lines: Pathological Comparison between Primary Tumor, Patient-Derived, and Cell-Line Derived Xenografts. *Cells* **8**

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lan T, Xue X, Dunmall LC, Miao J, Wang Y (2021) Patient-derived xenograft: a developing tool for screening biomarkers and potential therapeutic targets for human esophageal cancers. *Aging* **13**: 12273-12293

Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC et al. (2009) The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **16**: 333-350

Lange CA, Richer JK, Horwitz KB (1999) Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol Endocrinol* **13**: 829-836

Lee JS, Yost SE, Li SM, Cui Y, Frankel PH, Yuan YC et al. (2022) Genomic Markers of CDK 4/6 Inhibitor Resistance in Hormone Receptor Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancers* **14**

Li J, Huo X, Zhao F, Ren D, Ahmad R, Yuan X, Du F, Zhao J (2020) Association of Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6 Inhibitors With Survival in Patients With Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* **3**: e2020312

Lim S, Kaldis P (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**: 3079-3093

Liu X, Qiu R, Xu M, Meng M, Zhao S, Ji J, Yang Y (2021) KMT2C is a potential biomarker of prognosis and chemotherapy sensitivity in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **189**: 347-361

Martin M, Zielinski C, Ruiz-Borrego M, Carrasco E, Ciruelos EM, Munoz M et al. (2022) Overall survival with palbociclib plus endocrine therapy versus capecitabine in postmenopausal patients with hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer in the PEARL study. *Eur J Cancer* **168**: 12-24

McCartney A, Migliaccio I, Bonechi M, Biagioni C, Romagnoli D, De Luca F et al. (2019) Mechanisms of Resistance to CDK4/6 Inhibitors: Potential Implications and Biomarkers for Clinical Practice. *Front Oncol* **9**: 666

McFall T, McKnight B, Rosati R, Kim S, Huang Y, Viola-Villegas N, Ratnam M (2018) Progesterone receptor A promotes invasiveness and metastasis of luminal breast cancer by suppressing regulation of critical microRNAs by estrogen. *J Biol Chem* **293**: 1163-1177

McFall T, Patki M, Rosati R, Ratnam M (2015) Role of the short isoform of the progesterone receptor in breast cancer cell invasiveness at estrogen and progesterone levels in the pre- and post-menopausal ranges. *Oncotarget* **6**: 33146-33164

Michaloglou C, Crafter C, Siersbaek R, Delpuech O, Curwen JO, Carnevalli LS et al. (2018) Combined Inhibition of mTOR and CDK4/6 Is Required for Optimal Blockade of E2F Function and Long-term Growth Inhibition in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* **17**: 908-920

Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA et al. (2015) Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer. *Nature* **523**: 313-317

Moore NL, Edwards DP, Weigel NL (2014) Cyclin A2 and its associated kinase activity are required for optimal induction of progesterone receptor target genes in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **144 Pt B**: 471-482

Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL (2002) Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* **72**: 163-172

Mote PA, Gompel A, Howe C, Hilton HN, Sestak I, Cuzick J et al. (2015) Progesterone receptor A predominance is a discriminator of benefit from endocrine therapy in the ATAC trial. *Breast Cancer Res Treat* **151**: 309-318

Musgrove EA, Lee CS, Cornish AL, Swarbrick A, Sutherland RL (1997) Antiprogestin inhibition of cell cycle progression in T-47D breast cancer cells is accompanied by induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol Endocrinol* **11**: 54-66

Narayanan R, Edwards DP, Weigel NL (2005) Human progesterone receptor displays cell cycle-dependent changes in transcriptional activity. *Mol Cell Biol* **25**: 2885-2898

Ono M, Oba T, Shibata T, Ito KI (2021) The mechanisms involved in the resistance of estrogen receptor-positive breast cancer cells to palbociclib are multiple and change over time. *J Cancer Res Clin Oncol* **147**: 3211-3224

Park HS, Lee JD, Kim JY, Park S, Kim JH, Han HJ, Choi YA, Choi AR, Sohn JH, Kim SI (2019) Establishment of chemosensitivity tests in triple-negative and BRCA-mutated breast cancer patient-derived xenograft models. *PloS one* **14**: e0225082

Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S (2015) Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum Reprod Update* **21**: 155-173

Patel H, Abduljabbar R, Lai CF, Periyasamy M, Harrod A, Gemma C et al. (2016) Expression of CDK7, Cyclin H, and MAT1 Is Elevated in Breast Cancer and Is Prognostic in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **22**: 5929-5938

Pennycook BR, Barr AR (2020) Restriction point regulation at the crossroads between quiescence and cell proliferation. *FEBS Lett*

Pequeux C, Raymond-Letron I, Blacher S, Boudou F, Adlanmerini M, Fouque MJ et al. (2012) Stromal estrogen receptor-alpha promotes tumor growth by normalizing an increased angiogenesis. *Cancer Res* **72**: 3010-3019

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-752

Peyressatre M, Prevel C, Pellerano M, Morris MC (2015) Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers* **7**: 179-237

Prat A, Perou CM (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* **5**: 5-23

Qin G, Xu F, Qin T, Zheng Q, Shi D, Xia W et al. (2015) Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-Jun/COX-2 signaling pathway. *Oncotarget* **6**: 41794-41808

Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB (2002) Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **277**: 5209-5218

Rocca A, Schirone A, Maltoni R, Bravaccini S, Ceconetto L, Farolfi A et al. (2017) Progress with palbociclib in breast cancer: latest evidence and clinical considerations. *Ther Adv Med Oncol* **9**: 83-105

Rodrigues J, Heinrich MA, Teixeira LM, Prakash J (2021) 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer* **7**: 249-264

Rodriguez MJ, Perrone MC, Riggio M, Palafox M, Salinas V, Elia A, et al. (2023) Targeting mTOR to overcome resistance to hormone and CDK4/6 inhibitors in ER-positive breast cancer models. *Sci Rep* **13**: 2710

Rojas PA, May M, Sequeira GR, Elia A, Alvarez M, Martinez P et al. (2017) Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogestin Responsiveness. *J Natl Cancer Inst* **109**

Saal F, Colmerauer ME, Braylan RC, Pasqualini CD (1972) Tumor growth in allogeneic mice bearing a luciferase cylinder. *J Natl Cancer Inst* **49**: 451-458

Sahores A, Luque GM, Wargon V, May M, Molinolo A, Becu-Villalobos D et al. (2013) Novel, low cost, highly effective, handmade steroid pellets for experimental studies. *PLoS ONE* **8**: e64049

Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB (1994) New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B- receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Res* **54**: 3868-3877

Sequeira G, Vanzulli SI, Rojas P, Lamb C, Colombo L, May M et al. (2014). The effectiveness of nano chemotherapeutic particles combined with mifepristone depends on the PR isoform ratio in preclinical models of breast cancer. *Oncotarget* **5**: 3246–3260.

Sequeira GR, Sahores A, Dalotto-Moreno T, Perrotta RM, Pataccini G, Vanzulli SI, et al. (2021) Enhanced Antitumor Immunity via Endocrine Therapy Prevents Mammary Tumor Relapse and Increases Immune Checkpoint Blockade Sensitivity. *Cancer Res* **81**: 1375-1387

Sflomos G, Dormoy V, Metsalu T, Jeitziner R, Battista L, Scabia V et al. (2016) A Preclinical Model for ER α -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response. *Cancer Cell* **29**: 407-422

Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-1512

Sitruk-Ware R, Spitz IM (2003) Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception* **68**: 409-420

Slamon DJ, Neven P, Chia S, Fasching PA, De Laurentiis M, Im SA et al. (2018) Phase III Randomized Study of Ribociclib and Fulvestrant in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: MONALEESA-3. *J Clin Oncol* **36**: 2465-2472

Sledge GW, Jr., Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X et al. (2017) MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *J Clin Oncol* **35**: 2875-2884

Stribbling SM, Ryan AJ (2022) The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. *Nat Protoc* **17**: 2108-2128

Subtil-Rodriguez A, Millan-Arino L, Quiles I, Ballare C, Beato M, Jordan A (2008) Progesterone induction of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 promoter in breast cancer cells involves coordinated recruitment of STAT5A and progesterone receptor to a distal enhancer and polymerase tracking. *Mol Cell Biol* **28**: 3830-3849

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*

Thu KL, Soria-Bretones I, Mak TW, Cescon DW (2018) Targeting the cell cycle in breast cancer: towards the next phase. *Cell Cycle* **17**: 1871-1885

Trape AP, Liu S, Cortes AC, Ueno NT, Gonzalez-Angulo AM (2016) Effects of CDK4/6 Inhibition in Hormone Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Breast Cancer Cells with Acquired Resistance to Paclitaxel. *J Cancer* **7**: 947-956

Tripathy D, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Harbeck N et al. (2018) Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive, advanced breast cancer (MONALEESA-7): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **19**: 904-915

Truong TH, Lange CA (2018) Deciphering Steroid Receptor Crosstalk in Hormone-Driven Cancers. *Endocrinology* **159**: 3897-3907

Vanzulli S, Efeyan A, Benavides F, Helguero L, Peters G, Shen J et al. (2002) p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogestin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. *Carcinogenesis* **23**: 749-757

Vanzulli SI, Soldati R, Meiss R, Colombo L, Molinolo AA, Lanari C (2005) Estrogen or antiprogestin treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis* **26**: 1055-1063

Von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M et al. (2019) Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **380**: 617-628

Wade HE, Kobayashi S, Eaton ML, Jansen MS, Lobenhofer EK, Lupien M et al. (2010) Multimodal regulation of E2F1 gene expression by progestins. *Mol Cell Biol* **30**: 1866-1877

Waks AG, Winer EP (2019) Breast Cancer Treatment: A Review. *Jama* **321**: 288-300

Wang Y, Zhang B, Huang H, Wang T (2019) An improved method to build lung cancer PDX models by surgical resection samples and its association with B7-H3 expression. *Transl Cancer Res* **8**: 2848-2857

Wargon V, Fernandez SV, Goin M, Giulianelli S, Russo J, Lanari C (2011) Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive antiprogestin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **126**: 319-332

Wargon V, Helguero LA, Bolado J, Rojas P, Novaro V, Molinolo A, Lanari C (2009) Reversal of antiprogestin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **116**: 449-460

Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M et al. (2015) Progestin and antiprogestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int J Cancer* **136**: 2680-2692

Weeber F, Ooft SN, Dijkstra KK, Voest EE (2017) Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem Biol* **24**: 1092-1100

Women's Health I (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* **288**: 321-333

Yang C, Chen L, Li C, Lynch MC, Brisken C, Schmidt EV (2010) Cyclin D1 enhances the response to estrogen and progesterone by regulating progesterone receptor expression. *Mol Cell Biol* **30**: 3111-3125

Yang C, Li Z, Bhatt T, Dickler M, Giri D, Scaltriti M et al. (2017) Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene* **36**: 2255-2264

Yin P, Roqueiro D, Huang L, Owen JK, Xie A, Navarro A et al. (2012) Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells. *PLoS One* **7**: e29021

Yoshida GJ (2020) Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol* **13**: 4

Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q et al. (2013) A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res* **73**: 4885-4897

Fin.