Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Resistencia constitutiva y adquirida al tratamiento hormonal de carcinomas mamarios murinos

Wargon, Victoria

2010

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

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

Cita tipo APA:
Wargon, Victoria. (2010). Resistencia constitutiva y adquirida al tratamiento hormonal de carcinomas mamarios murinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Wargon, Victoria. "Resistencia constitutiva y adquirida al tratamiento hormonal de carcinomas mamarios murinos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Resistencia constitutiva y adquirida al tratamiento hormonal de carcinomas mamarios murinos.

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

Victoria Wargon

Director de Tesis: Claudia L. M. Lanari

Consejero de Estudios: Jorge Muschietti

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires, 2010.

AGRADECIMIENTOS

A Claudia, por ser mi directora de tesis y permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. Por compartir durante el desarrollo de esta tesis, experimentos, resultados, mates y mucho más. POR ESCUCHARME.

A todos mis compañeros y AMIGOS del laboratorio:
María, Caro, Virgi, Rocío, Juan, Ceci, Vicky, Paola, Ana, Marina, Laura, Tomás, Betina y Gonza. A cada uno por compartir el día a día y hacer que todo sea más divertido! Gracias por la ayuda que me ha dado cada uno en experimentos varios…. alguna placa de proliferación… algún cambio de medio…algún ratón….
A Juli por su ayuda en el bioterio, y a Pablo por su ayuda con el confocal.
A Caro y Virgi por corregir este manuscrito.

Al CONICET, por su apoyo económico con la beca de doctorado tipo I y tipo II

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) donde realicé este trabajo de investigación.

A la Fundación Sales por su apoyo económico con subsidios para el desarrollo de esta investigación.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por los subsidios provistos al laboratorio durante estos años.

A la fundación AVON, por las becas otorgadas para participar de los congresos de la AACR 2006, 2008, y 2009, donde pude presentar los resultados de esta tesis.

A Aflac, por la beca otorgada para participar del congreso de la AACR 2007, donde pude presentar los resultados de esta tesis.

A la UICC, por la beca ICRETT otorgada en el año 2008 para poder llevar acabo los estudios de metilación en el laboratorio del doctor José Russo bajo la supervisión de Sandra Fernandez.

Al doctor José Russo, por recibirme en su laboratorio, y a Sandra Fernandez por capacitarme para llevar a cabo los estudios de metilación.

A Silvia Vanzulli por analizar las histologías de los tumores y mamas.

A Laboratorios Craveri, por proveernos el MPA.

A Mercedes y Diego de Laboratorios Beta por ayudarme con los experimentos de clonado.

A Cristina por jugar con Lucía mientras yo escribía esta tesis.

Muy especialmente a mi mamá y a mi papá, que apostaron por mí en todos mis proyectos y me apoyaron incondicionalmente.

A mi abuela Beatriz, que me enseñó que con alegría, todo se puede, y que nunca hay que bajar los brazos.

A mis hermanos: Fede y Nico; a mis primos cuasi hermanos: Mariano y Juli.

A mis sobrinos, por llenar los espacios de alegría: Nico, Cata, Matías, Joaquín, Julia y Facu.

A Seba, por ayudarme a concluir con este trabajo de tesis. Por acompañarme cada día, por cuidarme, por estar siempre. Por estar haciendo entre los dos el mejor experimento de TODOS, compartir la vida.

A mi hija Lucía, por hacer que cada día sea único.

A Seba y Lucía!

RESUMEN-ABSTRACT

Resistencia constitutiva y adquirida al tratamiento hormonal de carcinomas mamarios murinos.

Los mecanismos por los cuales los estrógenos y los progestágenos, a través de sus respectivos receptores (RE y RP), participan en el desarrollo y crecimiento del cáncer de mama es un tema de gran interés ya que su detección se utiliza como factor pronóstico y orienta la terapéutica hacia una de tipo hormonal.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en ratones hembras vírgenes de la cepa BALB/c. Se establecieron líneas tumorales hormono-dependientes (HD) y hormono-independientes (HI) que expresan RE, alfa (REα) y beta (REβ), y las dos isoformas del RP (RPA y RPB). Los tumores HI se clasifican en respondedores (sensibles) y resistentes a la terapia con antiprogestágenos. Hemos generado a su vez por presión selectiva variantes tumorales con resistencia adquirida a los mismos.

Utilizando tres familias tumorales de este modelo, demostramos que los tumores sensibles expresan mayor nivel de RPA que de RPB, mientras que lo opuesto se observa en los resistentes. Esta diferencia sería un posible marcador para discriminar un tumor sensible de uno resistente. Pudimos determinar que la resistencia adquirida puede revertir ya sea por tratamiento hormonal, o por cultivo y en todos los casos esta reversión se ve acompañada de la reexpresión de RPA.

Demostramos que el silenciamiento de RPA en los tumores con resistencia adquirida se debe a metilación del promotor de PRA y que el tratamiento con el agente desmetilante 5azadC desensibiliza los tumores al antiprogestágeno.

No hemos podido hasta el momento dilucidar cuál es el mecanismo que silencia la expresión de RPA en los tumores con resistencia adquirida, sin embargo la plasticidad que observamos en la expresión de esta isoforma nos hace pensar que se trataría de algún otro mecanismo epigenético.

La fuerte correlación que hemos observado a lo largo de este trabajo de investigación entre la expresión de RPA y la sensibilidad a los antiprogestágenos sugieren que la terapia con antiprogestágenos debería ser considerada como posible tratamiento para tumores de mama con alta expresión de RPA.

Palabras clave: resistencia hormonal adquirida, AKT, antiprogestágenos, cáncer de mama, resistencia hormonal constitutiva, ERK, metástasis, isoformas del receptor de progesterona, metilación, inhibidores de las Dnmts.

Constitutive and Acquired hormone resistance in murine breast carcinomas.

The mechanisms by which estrogens and progestins activate estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) respectively are still a main and controversial area in breast cancer research. The detection of these receptors is used as a prognostic factor and patients with high levels of ER and PR will be treated with a hormone therapy aimed to block estrogen synthesis or to inhibit ER activation. There is however compelling evidence that points out that PR is also involved in the development and progression of breast carcinomas.

In our Laboratory we have developed an experimental model of mammary carcinomas induced by the continuous administration of medroxyprogesterone acetate (MPA) into BALB/c female mice. MPA-dependent tumors (HD) are maintained by syngeneic transplantations in MPA-treated mice. Spontaneously, tumors which are able to grow without exogenous hormone supply may arise, and these are referred to as hormone independent tumors (HI). Both tumor types express ER alpha (ERα) and beta (ERβ), and both isoforms of PR (PRA and PRB). HI tumors are classified as antiprogestin responsive or antiprogestins resistant tumors. We have already demonstrated that PR play a key role mediating tumor growth in both tumor types since antisense oligonucleotides of PR and different antiprogestins inhibit their growth.

In this study we analyzed 3 responsive, 3 acquired resistant and 2 constitutive resistant tumors from three different tumor families from the MPA breast cancer model. We demonstrated that the difference between these responsive and resistant tumors relies in the PRA/PRB ratio, being PRA higher than PRB in responsive tumors.

Interestingly the acquired resistant phenotype was possible to be reverted and this reversion was significantly associated with an increase in PRA expression.

We demonstrated that only in the constitutive-resistant tumors, PRA expression was silenced by DNA methylation. This prompted us to investigate whether the treatment of constitutive resistant tumors with a demethylating agent could restore PRA

expression and antiprogestins responsiveness. We found that 5-aza- 2´-deoxycytidine treatment induced PRA expression and RU-486 responsiveness in vitro and in vivo experiments. Furthermore, high levels of DNA methyltransferase (Dnmts) were detected in these tumors. In conclusion, our results suggest that methyltransferase inhibitors in combination with antiprogestins may be effective in the treatment of constitutive-resistant carcinomas with a high DNA methyltransferase level.

The correlation between PRA expression and antiprogestins responsiveness supports the hypothesis that antiprogestin should be used for the treatment of breast cancer patients showing high expression of PRA.

Keywords: Acquired hormone resistance; AKT, Antiprogestins; Breast cancer; De novo hormone-resistance; ERK; Metastasis; Progesterone receptor isoforms; Tumor regression; DNA-methylation; Dnmt inhibitors.

ABREVIATURAS

AR	Receptor de andrógenos
AI	Inhibidores de aromatasa
5azadC	5-aza-2´-deoxicitidina o decitabina
Aza	Azacitidina
CAF	Fibroblastos Asociados a Carcinoma (*Carcinoma Associated Fibroblasts*)
CYP2D6	Enzima Citocromo CYP2D6
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	Dominio de unión a ADN
DPN	*4-hydroxy-phenyl-propionitrile* (agonista selectivo del REβ)
DTT	*Dithiothreitol*
Dnmt	ADN metiltransferasa (*DNA methyltransferase*)
E2	17β-estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPI	Células epiteliales
ERE	Elemento respondedor a estrógenos
FGF-2	*Fibroblast growth factor 2*
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GR	Receptor de glucocorticoides
H_2Od	Agua destilada
H&E	Tinción con hematoxilina-eosina
HRE	Elemento respondedor a hormonas
HRT	Terapia de reemplazo hormonal (*Hormone replacement therapy*)
HSP	Proteínas de *shock* térmico
HAT	Histona acetiltransferasas
HDAC	Histona deacetilasas
HGF	*Hepatocyte growth factor*
IGF-1	I*nsulin-like growth factor 1*
IF	Inmunofluorescencia
LBD	Dominio de unión al ligando
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
MAPK o ERK1/2	Proteínas quinasas activadas por mitógenos p44/42
MR	Receptor de mineralocorticoides
MiARN	Micro-ARN

MSP	PCR específica para metilación
ON	*Overnigth*
OVX	Ovariectomía
PD	PD 98059, inhibidor de la vía MEK1/MAPK
PD/HD	Progestágeno dependiente/Hormono-dependiente
PD/HI	Progestágeno independiente/Hormono-independiente
Pg	Progesterona
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKB/Akt	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	*Phenylmethylsulphonyl fluoride*
PPT	*4,4',4''-(4-propyl-(1H)-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol* (agonista selectivo del REα)
PRE	Elemento respondedor a progestágenos
PRM	Moduladores del RP
RP	Receptor de progesterona
RPA	Isoforma A del RP
RPA	Isoforma B del RP
REα	Receptor de estrógenos *alpha*
REβ	Receptor de estrógenos *beta*
RU-486	RU 38486 o mifepristona
SC	Subcutáneo
SERD	Disruptor selectivo del RE (*selective estrogen receptor disrupter*)
SERM	Modulador selectivo de receptores estrogénicos
SFB	Suero fetal bovino
SFBch	Suero fetal bovino depletado de hormonas
SN	Sobrenadante
SR	Receptores para hormonas esteroides (*steroid hormone receptors*)
Src	Tirosina-quinasa Src
TAM	Tamoxifeno
TAME	*N_α-p-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride*
TLCK	*N_α-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride*
TPCK	*N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*

WHI	Estudio aleatorio de la Iniciativa para la Salud de la Mujer (*The Women's Health Initiative Randomized Trial*)
Wt	*Wild type*
ZK 299	ZK 98299 u onapristona
ZPCK	*N-Carbobenzyloxy-L-phenylalanyl chloromethyl ketone*
PI3	Fosfatidilinositol-3
PLC	Fosfolipasa C
PKA	Proteína quinasa A
RA	Receptores de andrógenos
RG	Receptores de glucocorticoides
RM	Receptores de mineralocorticoides
PM	Peso molecular
ERE	Secuencias de respuesta a E2
RPKO	*Knockout* para RP
RPAKO	*Knockout* para RPA
RPBKO	*Knockout* para RPA
RTK	Receptores tirosina-quinasa
SERMs	Moduladores selectivos del RE
SERDs	Regulador negativo selectivo del RE
TF	Factores de transcripción
TSA	Tricostatina A
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

INDICE

AGRADECIMIENTOS…….……ii

RESUMEN……vii

ABSTRACT……x

ABREVIATURAS.....xiii

INTRODUCCIÓN…… …….……...1

I. CANCER DE MAMA: GENERALIDADES…….....2

Cáncer de mama y hormonas……4

Marcadores predictivos en cáncer de mama……..5

II. RECEPTORES HORMONALES……...…….....6

Receptores de estrógenos……...6

Receptores de progesterona...……8

Mecanismos no genómicos……..11

III. ESTROMA…….……...13

IV. TRATAMIENTOS Y RESISTENCIA...…….….13

Tratamientos……13

Antiprogestágenos……15

Mecanismos de resistencia al tratamiento endócrino……...16

V. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS Y CÁNCER……....22

Metilación del ADN y cáncer…….22

Silenciamiento de genes por aumento de actividad de HDAC……..29

MicroARN (miARN) en cáncer de mama…….29

VI. MODELO EXPERIMENTAL DE INDUCCIÓN DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS POR PROGESTÁGENOS …….31

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS……...37

MATERIALES Y MÉTODOS……....41

I- ANIMALES Y TUMORES…….42

II- CULTIVOS PRIMARIOS……..46

III- EXTRACTOS TUMORALES Y CELULARES……..49

IV- *WESTERN BLOT*……...51

V- INMUNOHISTOQUÍMICA……..52

VI- INMUNOFLUORESCENCIA……..53
VII- PCR ESPECÍFICA PARA METILACION (MSP)…….55
VIII- ANALISIS ESTADÍSTICO……..57
IX- ANTICUERPOS UTILIZADOS…….58

RESULTADOS ……60
PARTE I….....61
- Obtención de variantes con resistencia adquirida

PARTE II.…….. 69
- Validación de los efectos del RU-486 con el antiprogestageno ZK 230211 *in- vivo*

PARTE III……72
- Caracterización de las variantes tumorales sensibles y resistentes al RU-486.
- Expresión de receptores hormonales

PARTE IV…….80
- Caracterización de las variantes C4-HI, C4-HIR, C4-HIRev.
- Potencial metastásico, tasa de crecimiento, activación de ERK y AKT.

PARTE V……..86
- Reversión de la resistencia por tratamiento con estrógenos

PARTE VI…….95
- Cultivos primarios

PARTE VII……..112
- Células epiteliales de tumores con resistencia adquirida reinoculadas en hembras BALB/c.

PARTE VIII……117
- Metilación de *RPA*

PARTE IX ……123
- Reversión de la resistencia constitutiva a los antiprogestágenos: re-expresión de RPA mediante el tratamiento con el agente desmetilante 5 aza 2´ deoxicitidina.

PARTE X…….....132

- Análisis de la expresion de las ADN metiltransferasas: Dnmt1, Dnmt 3a, Dnmt 3b
- Patrón de expresión de E-Caderina, p16, PTEN, Rb y RARβ

DISCUSIÓN…….145

- Obtención de variantes tumorales con resistencia adquirida. Patrón de isoformas del RP.
- Potencial metastásico.
- Reversibilidad de la resistencia adquirida.
- Participación de los CAFs en el fenotipo resistente adquirido.
- Metilación de *RPA* y reversión de la resistencia constitutiva.
- RG y efecto antiprogestágeno.

CONCLUSIONES……159

APÉNDICE……..163

BIBLIOGRAFÍA…… 172

INTRODUCCIÓN

I- CÁNCER DE MAMA: GENERALIDADES.

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte (superado por el cáncer de pulmón) en mujeres de los países industrializados (Parkin 2004; Parkin 2006). En nuestro país encabeza la lista de enfermedades oncológicas femeninas, padeciendo de cáncer de mama una de cada nueve mujeres. Se calcula entre 15.000 y 18.000 nuevos casos de cáncer de mama por año en la Argentina. Una de cada ocho mujeres se verá afectada por este tipo de neoplasia (Fundación para la Investigación y Prevención del Cáncer (FUCA); http://www.fuca.org.ar/cancer_mama.htm).

En la actualidad, pese a que el porcentaje de mujeres que padece esta enfermedad sigue siendo alto, vale destacar que la detección es más temprana y las posibilidades de curación son mayores. La Asociación Americana del Cáncer lleva adelante registros estadísticos para los Estados Unidos. En la Tabla 1-1, se detalla el porcentaje estimado de nuevos casos y de muertes por cáncer en el año 2009 para este país para hombres y mujeres discriminando el tipo cáncer.

Estimated New Cases*		Estimated Deaths	
Male	**Female**	**Male**	**Female**
Prostate 192,280 (25%)	Breast 192,370 (27%)	Lung & bronchus 88,900 (30%)	Lung & bronchus 70,490 (26%)
Lung & bronchus 116,090 (15%)	Lung & bronchus 103,350 (14%)	Prostate 27,360 (9%)	Breast 40,170 (15%)
Colon & rectum 75,590 (10%)	Colon & rectum 71,380 (10%)	Colon & rectum 25,240 (9%)	Colon & rectum 24,680 (9%)
Urinary bladder 52,810 (7%)	Uterine corpus 42,160 (6%)	Pancreas 18,030 (6%)	Pancreas 17,210 (6%)
Melanoma of the skin 39,080 (5%)	Non-Hodgkin lymphoma 29,990 (4%)	Leukemia 12,590 (4%)	Ovary 14,600 (5%)
Non-Hodgkin lymphoma 35,990 (5%)	Melanoma of the skin 29,640 (4%)	Liver & intrahepatic bile duct 12,090 (4%)	Non-Hodgkin lymphoma 9,670 (4%)
Kidney & renal pelvis 35,430 (5%)	Thyroid 27,200 (4%)	Esophagus 11,490 (4%)	Leukemia 9,280 (3%)
Leukemia 25,630 (3%)	Kidney & renal pelvis 22,330 (3%)	Urinary bladder 10,180 (3%)	Uterine corpus 7,780 (3%)
Oral cavity & pharynx 25,240 (3%)	Ovary 21,550 (3%)	Non-Hodgkin lymphoma 9,830 (3%)	Liver & intrahepatic bile duct 6,070 (2%)
Pancreas 21,050 (3%)	Pancreas 21,420 (3%)	Kidney & renal pelvis 8,160 (3%)	Brain & other nervous system 5,590 (2%)
All sites 766,130 (100%)	All sites 713,220 (100%)	All sites 292,540 (100%)	All sites 269,800 (100%)

*Excludes basal and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

©2009, American Cancer Society, Inc., Surveillance and Health Policy Research

Tabla 1-1. Muertes y nuevos casos de cáncer en EEUU para hombres y mujeres estimados en el año 2009. Datos *American Cancer Society.*

La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad (Bernstein 2002) y existen varios factores de riesgo relacionados a hormonas que se asocian a una mayor

incidencia del cáncer de mama humano (Russo & Russo 2006). Los factores más destacados son:

a. Predisposición genética (mutaciones de los genes BRCA).
b. Menarca temprana.
c. Menopausia tardía.
d. Primer embarazo tardío.
e. Ausencia de amamantamiento postparto o períodos de amamantamiento cortos.
f. Nuliparidad y/o fallas en la ovulación.
g. Obesidad en mujeres postmenopáusicas.
h. Dietas ricas en grasas y proteínas.
i. Tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos y progestágenos.

Con respecto a la edad de menarca y menopausia, se observó que cuanto más temprana es la edad de menarca, más alto es el riesgo de cáncer de mama. El efecto protector de una menopausia temprana así como también una menarca tardía demuestran que la exposición durante los ciclos menstruales normales al 17β-estradiol (E2) y/o progesterona (Pg), aumentan el riesgo de contraer cáncer de mama. Probablemente debido a que las hormonas ováricas estimularían directa o indirectamente la proliferación celular de las células mamarias. La nuliparidad, un primer embarazo tardío ó tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos implican una exposición prolongada a picos de E2 durante el ciclo menstrual, el cual aumentaría el riesgo de contraer la enfermedad. El amamantamiento tiene un efecto protector sobre la mama ya que induce la diferenciación del tejido mamario (Russo *et al.* 2005). La obesidad y el consumo de dietas ricas en grasas y proteínas aumentan el riesgo de contraer la enfermedad ya que estaría asociado a los altos niveles de estrógenos circulantes formados a partir de la aromatización de la androstenediona en el tejido adiposo (Franks & Teich 1997; Cotran *et al.* 1999).

Cáncer de mama y hormonas

A pesar de que la mayoría de las evidencias apuntan a los estrógenos como principales factores hormonales involucrados en cáncer de mama, se ha sugerido últimamente que la Pg puede tener importancia en el proceso de transformación de la glándula mamaria. Las siguientes observaciones estarían relacionadas con dicho riesgo:

a. La mayor parte de los factores mencionados anteriormente, relacionados con un aumento en la exposición a estrógenos, como menarca temprana, y menopausia tardía, también están relacionados con aumentos en niveles de Pg.
b. Los anticonceptivos orales combinados de estrógenos y Pg en mujeres jóvenes están asociados con un incremento en la incidencia de tumores (Thomas 1993).
c. Es controvertido el efecto de la inoculación de anticonceptivos de acción prolongada, por ejemplo el acetato de medroxiprogesterona (MPA) *depot* como factor de riesgo (Selman *et al.* 1995).
d. Existe un aumento de riesgo de contraer cáncer de mama con la terapia conjunta de progestágenos y estrógenos en la postmenopausia (Thomas 1991).

Durante años se postuló que los efectos proliferativos de los estrógenos y diferenciadores de la Pg en el útero eran extrapolables a la glándula mamaria (Aupperlee *et al.* 2005a). En los últimos años han surgido sin embargo, numerosas evidencias epidemiológicas que se han sumado a las experimentales que apuntan a un papel protagónico de los progestágenos en cáncer de mama (Hofseth *et al.* 1999; Greiser *et al.* 2005; Rossouw *et al.* 2002).

Fueron principalmente dos estudios, "*The Women's Health Initiative Randomized Trial*" (WHI) y "*The Million Women Study*" los que pusieron en jaque los postulados que se venían manejando. En el año 2002, y luego de cinco años de estudio, el WHI suspendió un ensayo clínico que incluía a 16608 mujeres postmenopáusicas. En este ensayo se compararon los efectos de una terapia combinada de estrógenos con el progestágeno sintético MPA *versus* una terapia placebo. La razón de la suspensión fue el aumento en la incidencia de cáncer de mama en un período menor de 5 años en el grupo tratado con la combinación. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de mujeres con mamografías anormales y los tumores se detectaron en un estadio más avanzado que en las mujeres tratadas con el placebo (Chlebowski *et al.* 2003).

Los autores del "*The Million Women Study*" estudiaron entre 1996 y 2001, a 1.084.110 mujeres de Gran Bretaña entre 50-64 años de edad obteniendo información acerca del uso de la terapia de reemplazo hormonal (HRT) y otros detalles personales, llevándose adelante un seguimiento de la incidencia de cáncer y mortalidad. Los resultados de este trabajo confirmaron que el uso actual y reciente de la HRT aumenta el riesgo de cáncer de mama. Éste, aumenta además con el tiempo de uso de la terapia, y es mayor en aquellas personas que fueron tratadas con HRT combinada de estrógenos y progestágenos (Beral 2003).

Marcadores predictivos en cáncer de mama

Se pueden definir como factores predictivos aquellos capaces de pronosticar la sensibilidad o resistencia a un tratamiento específico (Duffy 2005). Los marcadores más ampliamente utilizados son el estudio de la presencia del receptor de estrógenos *alfa* (REα) y del receptor de progeterona (RP), asociados con un beneficio de la terapia endócrina adyuvante (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998). Más del 60% de los cánceres de mama invasivos expresan RE, pero sólo el 50-60% de las mujeres con tumores positivos para el RE, responden a la terapia endócrina (McGuire 1975; Jordan & Brodie 2007). Posteriormente se demostró que el 70-80% de los tumores que expresaban ambos receptores, el RE y RP, luego de ser tratados con terapia hormonal presentaban un período libre de enfermedad mayor (McGuire 1980). La expresión de ambos receptores es indicativa de un REα funcional y, en consecuencia, de una respuesta favorable al tratamiento. De todas maneras, en la gran mayoría de los cánceres de mama, el tratamiento hormonal deja de ser efectivo luego de un cierto tiempo; la enfermedad recurre y se disemina (Tonetti & Jordan 1997). Otro marcador utilizado en la actualidad es HER-2/neu (o *ErbB2*), miembro de la superfamilia de receptores tirosina-quinasa pero que, a diferencia de HER-1 (también denominado receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR), HER-3 y HER-4, no se conoce aún su ligando. HER-2 puede heterodimerizar con otros receptores de la familia iniciando una vía intracelular por medio de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3 (PI3) o fosfolipasa C (PLC). En líneas celulares de cáncer de mama y modelos tumorales, la sobreexpresión del gen HER-2 ha sido asociada con aumento de la mitosis, transformación maligna, aumento de la motilidad celular,

invasión y metástasis (Olayioye *et al.* 2000). Entre el 20% y el 30% de los tumores de mama presentan sobreexpresión de HER-2, evento que se correlaciona con un pronóstico pobre y disminución de la supervivencia (Demonty *et al.* 2007).

II. RECEPTORES HORMONALES

Los receptores para hormonas esteroides (SR, *steroid hormone receptors*) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de clase I. Son factores de transcripción entre los que se encuentran los REα y RE*beta* (REβ), los RP, los receptores de andrógenos (RA), los receptores de glucocorticoides (RG) y los receptores de mineralocorticoides (RM). Mientras que dentro de la clase II de receptores nucleares encontramos los receptores para ácido retinoico (RARα/β/γ), los receptores X de retinoides (RXRα/β/γ), el receptor de la vitamina D (VDR), los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARα/γ/δ), y los receptores de la hormona tiroidea (TRα/β). Todos estos receptores nucleares descriptos son factores de transcripción inducibles, que se hacen activos en presencia de su ligando especifico (Ellmann *et al.* 2009).

Receptores de estrógenos

Los estrógenos ejercen su acción por medio de la unión a los RE. Existen dos genes conocidos que codifican para los receptores de estrógenos clásicos, el gen para el REα y el gen para el REβ. El primero en descubrirse y sobre el que más información se tiene es el REα. El REα tiene un peso molecular (PM) de 67 kDa (Stirone *et al.* 2003). Mientras que el REβ tiene un PM de 56 kDa en roedores, y de 59 kDa en humanos (Figura 1-2).

Ambos receptores unen E2, y luego de la unión con la hormona, pueden formar homo o heterodímeros (Pace *et al.* 1997), interactúan con la maquinaria de transcripción basal y con numerosos coactivadores. Se asocian con secuencias consenso de respuesta a estrógenos, ERE (Tyulmenkov & Klinge 2000; Roemer *et al.* 2006; Bourdeau *et al.* 2004), en promotores de genes blanco, regulando su expresión. Además, pueden interactuar con otros factores de transcripción como Sp1 (Porter *et al.* 1997), AP-1 (Webb *et al.* 1995), Stat5b (Bjornstrom *et al.* 2001) o CRE, y regular la expresión de

genes particulares de una manera tejido especifica (Lazennec *et al.* 2001). El REα y el REβ, poseen una capacidad transcripcional diferente, siendo el REβ menos potente en su actividad que el REα, e incluso inhibiendo la actividad del REα en diferentes contextos (Hall & McDonnell 1999; Kuiper & Gustafsson 1997; Montano *et al.* 1998).

En muchos tejidos de ratón, ambos receptores son coexpresados, como por ejemplo: en el ovario, útero, pulmón, glándula mamaria, tejido neural y en tejidos reproductivos del macho. Sin embargo, existen diferencias en su expresión en el ovario, donde la expresión del REβ es más abundante que la del REα, y en glándula mamaria normal, donde ocurre lo contrario (Couse *et al.* 1997; Hewitt & Korach 2003).

El REα es el RE más vinculado con el desarrollo de la glándula mamaria y la proliferación de las células normales y neoplásicas de mama. Además está fuertemente asociado a la posible respuesta a tamoxifeno (TAM), de manera que la mayor parte de los estudios se centran en el REα más que en el REβ (Brinkman & el Ashry 2009).

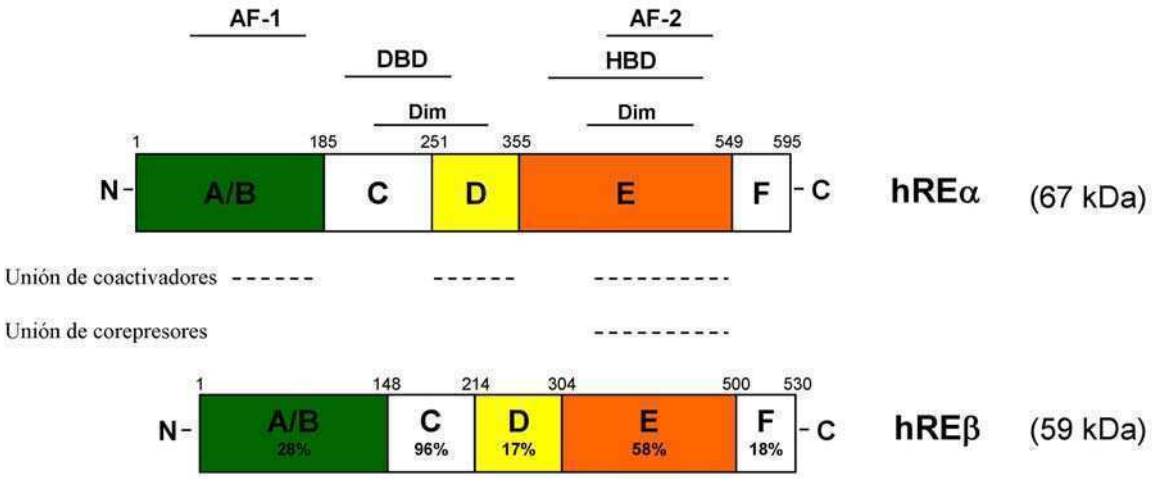


Figura 1-2. Esquema del REα y el REβ de humanos. Se transcriben a partir de dos genes diferentes. El REβ es más corto en su extremo N-terminal que el REα. Se muestra la organización de los dominios de las isoformas del RE humano. DBD: dominio de unión al ADN; HBD: dominio de unión a la hormona; Dim: dominio de dimerización; AF-1 y -2 son los dominios de activación transcripcional.

Se sabe que el REα posee en su secuencia promotora y en el primer exón 5 islas CpG, cuya metilación correlaciona con el silenciamiento de este receptor. En tumores mamarios humanos REα-, solo un 25% de los casos se observó el REα metilado,

mientras que este evento sí se detecta en la mayoría de las líneas celulares (Brinkman & el Ashry 2009; Mirza *et al.* 2007).

Receptores de progesterona

Los RP han sido implicados en una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo el desarrollo de la glándula mamaria, la regulación de la progresión del ciclo celular, el procesamiento de proteínas, el metabolismo y la inducción de otros eventos de señalización (Li & O'Malley 2003; Parkin 2004). Existen dos isoformas del RP, RPA y RPB, que derivan de promotores alternativos (promotor distal: promotor *RPB*, promotor proximal: promotor *RPA*) de un mismo gen localizado en el cromosoma 11 q22-q23 humano (Kastner *et al.* 1990; Rousseau-Merck *et al.* 1987), y en el cromosoma 9 de ratón (Schott *et al.* 1991). Originalmente clonado en células de cáncer de mama humano, el RPB contiene 933 aminoácidos y un PM de 116 kDa, mientras que el RPA carece de los 164 aminoácidos iniciales teniendo un PM de 94 kDa. Se observó que el RPB se origina desde el codón de inicio de la traducción AUG1, mientras que el RPA, lo hace a partir del codón AUG2 (Kastner *et al.* 1990). En roedores, el PM del RPB y RPA es 115 y 83 kDa respectivamente (Schneider *et al.* 1991; Figura 1-3).

Está ampliamente aceptado que el RP es un gen regulado por E2 (Horwitz *et al.* 1978; Horwitz & McGuire 1979; Kastner *et al.* 1990; Kurita *et al.* 2000; Nardulli *et al.* 1988). Se han encontrado secuencias ERE en regiones proximales del promotor del RP humano (Kastner *et al.* 1990), pero dicha secuencia no es completa, sino un medio sitio ERE (*half* ERE) en el promotor del RPA (Petz & Nardulli 2000). El REα, unido a su ligando, seria capaz de regular la expresión del RP por asociación con otros factores de transcripción, tales como Sp1 y AP-1 en el promotor del RP (Petz *et al.* 2004; Petz *et al.* 2002; Petz & Nardulli 2000; Schultz *et al.* 2003). Recientemente se describieron secuencias distales al promotor del RP que serian capaces de regular la expresión de dicho gen por interacción con el REα activado en secuencias ERE (Boney-Montoya *et al.* 2010). De manera tal que la regulación de la expresión del RP por secuencias proximales y distales a su promotor, evidencia la extremada complejidad en dicha regulación. Por otro lado, se han encontrado secuencias ERE en el promotor del RP de rata (Kraus *et al.* 1994), mientras que en ratón se han encontrado secuencias putativas para el pegado del RE, muy similares a la secuencia ERE consenso, ubicadas en el promotor del RPA (Hagihara *et al.* 1994).

Se ha descripto la presencia de islas CpG tanto en el promotor de RPA como de RPB en humanos, de manera que ambas isoformas pueden ser reguladas por metilación de estas islas (Vasilatos *et al.* 2009).

En ratones *knockout* para el RP (RPKO) se ha demostrado que es el RPB el que media los efectos proliferativos de la Pg sobre la glándula mamaria (Conneely *et al.* 2001). Si bien los ratones RPAKO presentaron severas anormalidades en la función ovárica y uterina llevando a infertilidad en las hembras, estos ratones no tuvieron afectada la acción de la Pg sobre la glándula mamaria o sobre el timo de estos ratones, no se vio afectada (Mulac-Jericevic *et al.* 2000). Se desarrolló también el ratón RPBKO, sobre el cual se demostró que la supresión en la expresión del RPB no afecta la acción de la Pg sobre el útero, el ovario y timo, pero resulta en una reducida morfogénesis ductal y alveologénesis de la mama durante la preñez (Mulac-Jericevic *et al.* 2003). De esta manera, el RPA es necesario y suficiente para desarrollar las respuestas reproductivas mediadas por Pg para la fertilidad de la hembra, mientras que el RPB es necesario para las respuestas proliferativas y diferenciadoras de la Pg sobre la glándula mamaria (Conneely *et al.* 2003). Es evidente que las dos isoformas tienen distintas funciones *in vivo* (Hopp *et al.* 2004; Leo & Lin 2008) *e in vitro* (Sartorius *et al.* 1994; Sartorius *et al.* 2003).

En la glándula mamaria normal y en el útero de ratón la relación RPA/RPB es 3/1 (Schneider *et al.* 1991), mientras que en la glándula mamaria humana *Sartorius y col*. informaron que ambas isoformas se encuentran en concentraciones equimolares (Sartorius *et al.* 1994).

Los RP, sufren considerables modificaciones post traduccionales que tienen que ver con fosforilación, acetilación, sumoilación, y ubiquitinación (Dressing *et al.* 2009; Hagan *et al.* 2009). La fosforilación del RP, afecta su función y activación transcripcional sobre genes blanco, su localización subcelular, su estabilidad y vida media, y su capacidad de interactuar con otras proteínas (Clemm *et al.* 2000; Hagan *et al.* 2009; Dressing *et al.* 2009).

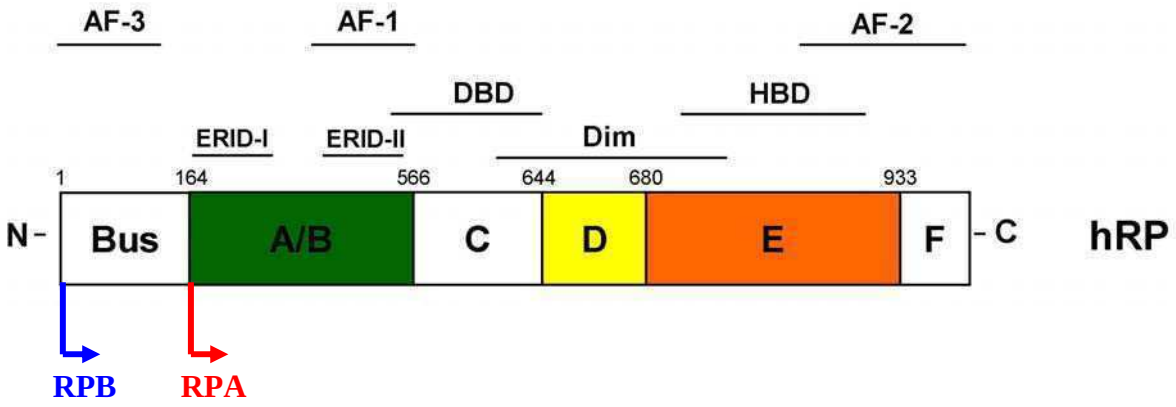


Figura 1-3. Esquema de las diferentes isoformas del RP. Organización de los dominios de las isoformas clásicas del RP humano (RPA, RPB). DBD: dominio de unión al ADN; HBD: dominio de unión a la hormona; Dim: dominio de dimerización; Bus: dominio de 164 aminoácidos específicos de la isoforma B; AF-1, -2 y -3 son los dominios de activación transcripcional; ERID-I y ERID-II, dominios de interacción con el REα. Adaptado de (Cork *et al.* 2008; Kastner *et al.* 1990; Wei *et al.* 1996; Ballare *et al.* 2003).

En general, el RPB es un activador transcripcional más fuerte que el RPA, mientras que este último, puede funcionar como un represor ligando-dependiente de otros receptores de hormonas esteroides, incluyendo RPB, RE, RA, RG y RM, de una manera célula-contexto del promotor-dependiente (Boonyaratanakornkit & Edwards 2007; Vegeto *et al.* 1993). La acción inhibitoria del RPA se debería a su incapacidad de reclutar coactivadores de la transcripción, comparado con la del RPB (Giangrande *et al.* 2000). Sin embargo, los estudios en ratones *knockouts* para una u otra isoforma, descriptos previamente, sugieren que ambos receptores funcionan de una manera tejido-dependiente como activadores transcripcionales. En células de cáncer de mama humano que expresan sólo la isoforma B (T47D-YB) o sólo la A (T47D-YA) del RP (Sartorius *et al.* 1994), la gran mayoría de los genes regulados por el RP, lo hacen vía la isoforma B (~65% de los genes) del receptor en presencia de ligando. Mientras que sólo un 4% de los genes resultaron regulados por la isoforma A, aproximadamente un 25% se encontraron regulados por ambas isoformas (Richer *et al.* 2002). Además, se demostró que los progestágenos sintéticos tienen un alto grado de similitud con la Pg, en sus respuestas transcripcionales (alrededor de un 77-91% de semejanza; Bray *et al.* 2005). Aun en ausencia de ligando, el RP puede ser activo transcripcionalmente, y en oposición a los resultados obtenidos en presencia del progestágeno, el RPA sería la isoforma mas activa (Jacobsen *et al.* 2002).

Además de las diferencias en la funcionalidad de RPA y RPB, se ha propuesto que el balance RPA/RPB podría definir la respuesta a las terapias hormonales (Hopp *et al.* 2004; Sartorius *et al.* 2003). El grupo de S. Fuqua ha demostrado que aquellos tumores con altos niveles de expresión de RPA son aquellos que responden menos a la terapia con TAM (Hopp *et al.* 2004).

Mecanismos no genómicos

Clásicamente, se considera a los SR como factores de transcripción nucleares, que cuando se activan por unión con sus ligandos específicos, regulan la expresión de diferentes genes blanco. Los SR activados pueden actuar como dímeros sobre secuencias especificas de respuesta a hormonas en promotores en el ADN [en forma general se las conoce como HREs, (*hormone-responsive elements*)], o pueden actuar por interacción con otros factores de transcripción. En ambos casos, el resultado es el reclutamiento de coreguladores de la transcripción, complejos remodeladores de la cromatina, y la maquinaria de transcripción basal (Beato *et al.* 1995; Onate *et al.* 1995). Por otro lado, se ha visto cómo los SR pueden modular también la activación de vías de señalización citoplasmáticas, como por ejemplo la activación de la adenilato ciclasa, de las MAPKs, de la PI3K, y de la tirosina-quinasa Src, entre otras, sin necesitar de la actividad transcripcional clásica (Baulieu 1978; Pietras & Szego 1977). Incluso, por activación de estas vías, y sin ir al núcleo, los SR son capaces de regular la expresión de genes particulares. A estos efectos no dependientes de la acción nuclear de los SR, se lo denomina mecanismos no genómicos (Edwards 2005).

Los SR localizados en la membrana plasmática o en el citoplasma, pueden asociarse de forma momentánea con otras moléculas de señalización incluyendo receptores acoplados a proteínas G (GPCR), a la tirosina-quinasa citosólica Src (c-Src, Fyn), proteínas con dominios SH2 (SH2-*containing domain*, Shc), o proteínas adaptadoras (Shc, p130Cas, MNAR, Grb2, Crk, p85), y proteinas asociadas a membrana (Caveolina 1), produciendo la activación de vías de señalización como MAPKs o PI3K/Akt. La consecuencia biológica de la activación de estas cascadas de señalización, generadas por las hormonas esteroides, es influenciar la transcripción génica. Se han propuesto al menos tres mecanismos para describir este proceso: 1) un mecanismo de retroalimentación positiva donde la actividad transcripcional de los SR o de los

coreguladores es aumentada por fosforilación, 2) vías de señalización que convergen y activan a genes blanco requiriendo que otros factores de transcripción (TF) cooperen con los SR mediante la unión de promotores HREs, y 3) activación de TF independientes de la unión directa de los SR al ADN (Boonyaratanakornkit & Edwards 2007). Estos mecanismos se muestran en la Figura 1-4.

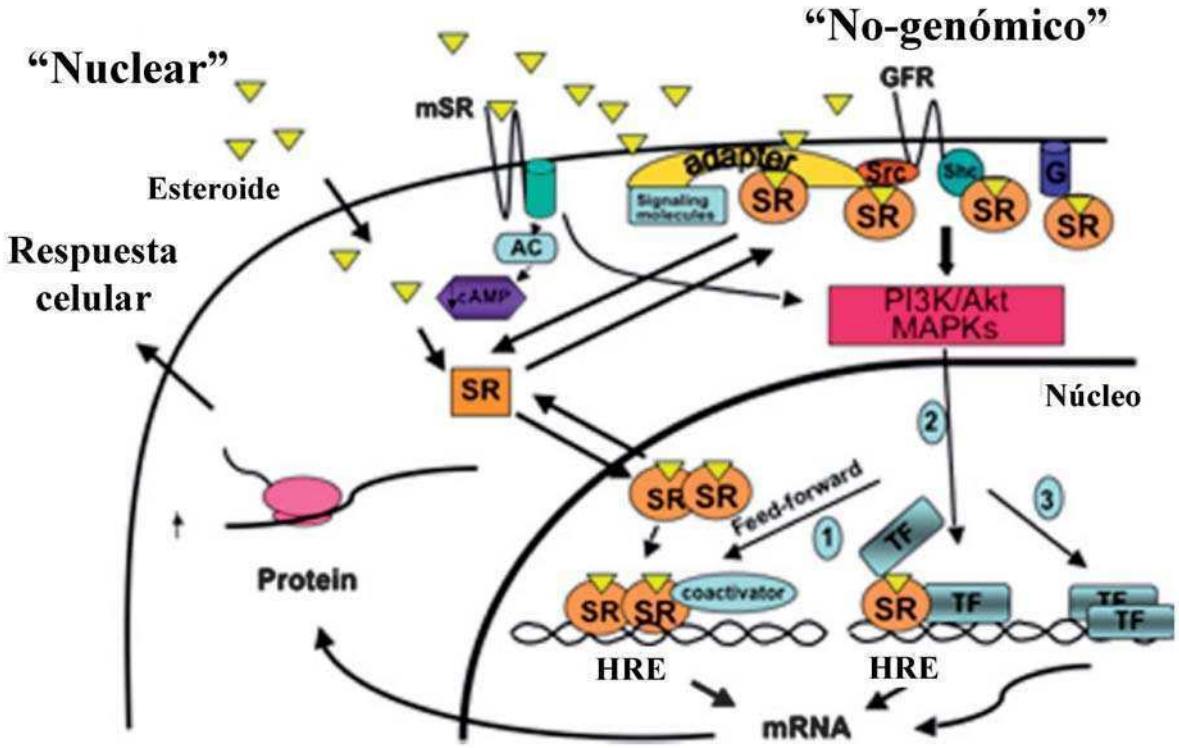


Figura 1-4. Vías de señalización clásicas y no genómicas activadas por hormonas esteroides. SR: receptores de hormonas esteroides, TF: factores de transcripción, mSR: receptores no clásicos de esteroides en membrana, HRE: elementos de respuesta a hormonas esteroides. *Adaptado de Boonyaratanakornkit y Edward 2007.*

III. ESTROMA TUMORAL

El estroma tumoral, también denominado microambiente tumoral, es un tejido heterogéneo que se compone de diferentes poblaciones celulares, como por ejemplo: fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, adipocitos, células del sistema inmune, todas inmersas en la matriz extracelular (Micke & Ostman 2005; Radisky & Radisky 2007).

Los miofibroblastos son el principal componente del tejido conectivo, embebidos dentro de la matriz extracelular, y siendo los mayores responsables de su síntesis, acompañan el crecimiento tumoral. Se han denominado *carcinoma associated fibroblasts,* (CAF; Orimo *et al.* 2005; Orimo & Weinberg 2006), y están involucrados en la secreción de metaloproteasas, factores de crecimiento (como IGF-1, i*nsulin-like growth factor 1*; HGF, *hepatocyte growth factor;* FGF-2, *fibroblast growth factor 2*) y citoquinas (como SDF-1, *stromal derived factor 1;* IL-6, *interleukin 6; CXCL-14, chemokine C-X-C ligand 14;),* que actúan promoviendo el crecimiento tumoral y la invasión (Studebaker *et al.* 2008; Ma *et al.* 2009; Giulianelli *et al.* 2008a). Además, son responsables de estimular la angiogénesis tumoral, liberando factores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; Kalluri & Zeisberg 2006). La mayor parte de ellos expresa actina de músculo liso, también se los ha denominado fibroblastos activados.

El microambiente tumoral puede a su vez modificar la respuesta del tumor a los agentes antitumorales al controlar el crecimiento y la homeostasis celular.

IV. TRATAMIENTOS Y RESISTENCIA.

Tratamientos

Luego del diagnóstico, el tratamiento a seguir en cáncer de mama depende del estadio de la enfermedad, y de factores patológicos como la expresión de receptores hormonales y el grado tumoral (Moulder *et al.* 2008). La primera decisión es la cirugía, y la evaluación del ganglio centinela. Para reducir el riesgo de recurrencia de la enfermedad, los pacientes pueden recibir terapia de rayos, quimioterapia u hormonoterapia. Para aquellos pacientes que presentan cáncer de mama avanzado y metástasis, la terapia se considera solamente paliativa, realizándose principalmente

tratamientos con agentes quimioterapéuticos. En los casos en que se haya desarrollado metástasis ósea, se utilizan también los bisfosfonatos (Coleman 2005). Otra posibilidad es la administración de una terapia adyuvante, endócrina o biológica, que puede ser administrada como neoadyuvante (antes de la cirugía) o adyuvante (post-cirugía). Se ha demostrado que la terapia adyuvante puede reducir el riesgo de recurrencia entre un 30-50% (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005).

La terapia biológica es aquella que se dirige al control de señales intracelulares transmitidas por los receptores tirosina-quinasa (RTK) que influyen en el crecimiento, supervivencia, y diferenciación de las células del cáncer de mama. En este caso se utilizan los compuestos desarrollados contra HER-2, o contra el VEGF, por ejemplo (Moulder *et al.* 2008). Las terapias endócrinas actuales en cáncer de mama están dirigidas a bloquear el RE o a inhibir la síntesis de E2. El tratamiento más utilizado es con moduladores selectivos del RE (SERMs), pudiendo actuar de manera diferencial dependiendo del tejido en el cual se encuentren. El SERM que se utiliza actualmente es el TAM. Sin embargo, dada su actividad agonista en el útero, se está intentando reemplazar por otros SERMs, como por ejemplo el Raloxifeno. Además de los SERMs se encuentran en estudio otros compuestos como el Fulvestrant (Faslodex, ICI 182780), considerado como un antiestrógeno puro o regulador negativo selectivo del RE (SERD). El Fulvestrant se une al RE e induce un cambio conformacional previniendo la dimerización del receptor y llevando a una rápida degradación del mismo (Dauvois *et al.* 1993). Resumiendo, las estrategias actuales para inhibir el crecimiento de tumores REα+, son: inhibir la unión del E2 a su receptor mediante el tratamiento con tamoxifeno; bloquear la síntesis de E2 utilizando inhibidores de aromatasa (AI); o reducir los niveles del REα empleando el antiestrógeno puro Fulvestrant.

Teniendo en cuenta que el E2 regula la síntesis del RP, que existe una asociación entre el gen BRCA mutado y un aumento del RP (King *et al.* 2004), y que los RP median acciones proliferativas en la glándula mamaria, parecería razonable utilizar agentes que bloqueen al RP en el tratamiento del cáncer de mama. En ese sentido nuestro laboratorio está abocado a estudiar si un subgrupo de pacientes portadores de tumores mamarios con alta expresión de la isoforma A del RP podría beneficiarse de una terapia con antiprogestágenos, tema que se estudia en profundidad a lo largo de esta tesis.

Antiprogestágenos

Los moduladores del RP (PRM) se clasifican en tres grupos: tipo I, tipo II y tipo III. Los PRM tipo I se comportan sólo como antagonistas y previenen el pegado del complejo RP-antagonista al ADN (ej. Onapristona). Los PRM tipo II permiten el pegado del complejo RP-antagonista al ADN. Muestran potencial agonista cuando se estimula la vía de PKA *in vitro*. Muestran cierta actividad agonista de manera tejido y especie específica (ej. Mifepritona, RU-486). Los antagonistas tipo III inducen el pegado del RP al sitio PRE y tienen actividad puramente antagonista (ej. ZK 230211; Afhuppe *et al.* 2010).

La mifepristona (RU-486) fue el primer antagonista de la Pg desarrollado que exhibió actividad antiprogestágeno en humanos. El RU-486 es un PRM tipo II ya que puede funcionar como un agonista en bajas concentraciones (Bottino *et al.* 2010) o cuando activa específicamente a la isoforma B del RP (Meyer *et al.* 1990). Asimismo, se ha observado que en presencia de activadores de la proteína quinasa A (PKA), como el AMPc, RU-486 puede comportarse como agonista (Beck *et al.* 1993). Este compuesto, produce la dimerización del RP y la asociación al ADN, mayor que la inducida por el agonista (DeMarzo *et al.* 1992; Skafar 1991). A su vez la unión del RU-486 induce el reclutamiento de correpresores (Jackson *et al.* 1997).

Otro antagonista utilizado anteriormente fue la Onapristona (ZK 98299). Actúa de la misma forma que RU-486, produciendo dimerización de los receptores y unión al ADN, pero de forma mas débil que la inducida por RU-486 (Leonhardt & Edwards 2002). Ambos compuestos tienen afinidad por el RG, siendo la del ZK 299 menor que la del RU-486. El uso del ZK 299 fue discontinuado debido a los efectos colaterales que presentaron (Robertson *et al.* 1999).

Otro antiprogestágeno es el ZK 230211, posee una marcada reducción de la actividad antiglucocorticoide comparado con el RU-486 y un efecto antiprogestágeno mayor. Este antiprogestágeno hace que el complejo RP-antagonista se una al ADN, pero no induce activación de la transcripción y a diferencia del RU-486, no tiene actividad agonista en presencia de AMPc (Afhuppe *et al.* 2010; Chwalisz *et al.* 2000; Fuhrmann *et al.* 2000). El Laboratorio Schering Bayer está reclutando pacientes con cáncer de mama para ensayar los efectos de este antiprogestágeno.

La aglepristona es otro antagonista del RP desarrollado para uso animal específicamente (Galac *et al.* 2004) que se une con alta afinidad al RP (Polisca *et al.* 2010). Ha sido utilizado en el tratamiento de piometra canina y en la prevención de la nidación en las perras. Pese a que su mecanismo no se conoce bien, la aglepristona ha sido utilizada para tratar tumores benignos dependientes de Pg, como por ejemplo, la hiperplasia fibroadenomatosa mamaria en gatos y fibroma vaginal en perros (Muphung *et al.* 2009).

Mecanismos de resistencia al tratamiento endócrino

Como se mencionó previamente, dos tercios de los tumores mamarios son positivos para REα y RP al momento del diagnóstico. Inicialmente la mayoría de ellos responde a las terapias endócrinas, pero es conocido también que luego pueden desarrollar resistencia: **RESISTENCIA ADQUIRIDA**. Asimismo existen aquellos tumores que, presentan resistencia a los tratamientos desde el inicio de los mismos: **RESISTENCIA CONSTITUTIVA**.

Pese a los avances en la detección temprana del cáncer de mama, alrededor del 30% de los pacientes desarrollan recurrencia de la enfermedad. Para poder ofrecer tratamientos más efectivos y menos tóxicos debe seleccionarse la terapia apropiada. Para ello debe estudiarse cada paciente y las características clínicas y moleculares de cada tumor. Los tratamientos sistémicos son eficientes al comienzo de la terapia en una alta proporción de tumores, pero luego de un tiempo, que puede variar en cada paciente, suele observarse recurrencia, y es en este momento donde se observa y espera la aparición de resistencia a la terapia (Gonzalez-Angulo *et al.* 2007).

El fenómeno de resistencia hormonal ha sido motivo de estudio durante los últimos años en el cáncer de mama. En dichos estudios se sugiere que durante el desarrollo de resistencia ocurre un cambio en el fenotipo de las células cancerosas. Éstas pasan de crecer de forma dependiente de los SR, a crecer dependiendo de factores de crecimiento independientes de los receptores hormonales (Arpino *et al.* 2008).

Actualmente son dos las terapias hormonales más utilizadas en tumores mamarios positivos para los receptores hormonales: el TAM cuyo blanco es el RE y los inhibidores de aromatasa (AI; anastrazole, letrozole, exemestane) que inhiben la síntesis de estrógenos. (Hurvitz & Pietras 2008) Debido a que ambas terapias están dirigidas directa o

indirectamente al RE, la mayor parte de los estudios de resistencia a los tratamientos endocrinos han sido realizados en torno al REα y el TAM (Normanno *et al.* 2005).

En la actualidad la resistencia hormonal se vincula mayormente a un *cross-talk* entre las quinasas río arriba y el REα, resultando en la activación del REα de forma ligando-independiente, o en hipersensibilidad a estrógenos. En particular, la fosforilación del REα en la Serina 118 y la Serina 167 derivan en una activación transcripcional independiente de estrógenos y están asociadas a la resistencia hormonal. Por ejemplo, la sobreexpresión de HER2 resulta en la fosforilación y activación del REα y en la resistencia al TAM *in vitro* y a la resistencia hormonal *in vivo* (Benz *et al.* 1992; Kok *et al.* 2009; Pancholi *et al.* 2008; Plaza-Menacho *et al.* 2010; Shou *et al.* 2004; Yamashita 2008).

A continuación se mencionan algunos mecanismos de resistencia a los tratamientos hormonales:

- **REα**

Teniendo en cuenta que la expresión de REα es uno de los principales marcadores predictivos de respuesta a la terapia endocrina, la falta de expresión del mismo es claramente uno de los principales mecanismos de resistencia al tratamiento hormonal. La ausencia de este receptor ha sido asociada a la selección de clones negativos, o más recientemente a la metilación de sus islas CpG (Brinkman & el Ashry 2009). Estudios *in vitro* han demostrado que la ADN metiltransferasa (Dnmt1) interactúa físicamente con la histona deacetilasa 1 (HDAC1) ó la histona deacetilasa 2 (HDAC2), y que, el cotratamiento con inhibidores de la Dnmt1 y las HDAC pueden, de manera sinérgica, inducir la expresión de REα en células de carcinoma mamario negativas para REα (Palii *et al.* 2008; Rountree *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2006; Yang *et al.* 2001).

Se ha hipotetizado también que la pérdida de REα podría ser la responsable de la resistencia adquirida al TAM. Sin embargo, ha sido demostrado que pacientes con tumores positivos para REα, sensibles al TAM, generalmente no pierden la expresión de REα mientras sí adquieren resistencia a esta droga. La pérdida de este receptor ha sido demostrada sólo en un 17% a 28 % de pacientes con resistencia adquirida al TAM (Gutierrez *et al.* 2005; Hurvitz & Pietras 2008). Esto sugiere que la resistencia a la terapia es generada por cambios más complejos que afectarían a varías vías de señalización y no por una desregulación en la expresión de un solo gen (Hurvitz & Pietras 2008).

Alteraciones genéticas en el REα como inserciones, deleciones, rearreglos, mutaciones puntuales también pueden afectar la respuesta a la terapia con anti estrógenos ya que dan lugar al silenciamiento de la expresión del *REα* o a la expresión de una mutante del receptor. Sin embargo raramente dichas mutaciones se han encontrado en carcinomas mamarios primarios humanos, y, asimismo, generalmente se han hallado en pacientes clasificados clínicamente como REα negativos (Herynk & Fuqua 2004; Hurvitz & Pietras 2008; Yan *et al.* 2001).

La expresión de RP está también asociada con mayores beneficios de la terapia con TAM. Los pacientes REα +/ RP + tienen una importante reducción del riesgo relativo de recurrencia y muerte en comparación con los REα +/ RP - (Arpino *et al.* 2005; Normanno *et al.* 2005; Yan *et al.* 2001).

La pérdida de expresión del RP, vinculada mayoritariamente con una estimulación sostenida de las vías de los factores de crecimiento, también se ha descripto como posible causa de la resistencia al TAM, pero no a los AI (Hurvitz & Pietras 2008).

- **REβ**

Aunque se ha sugerido la participación del REβ en la adquisición de un fenotipo resistente (Speirs *et al.* 1999), su rol no ha sido elucidado hasta el momento. Se ha demostrado que cuando REβ está unido al TAM, raloxifeno o al anti-estrógeno ICI 164.384, la transcripción de los genes dependiente de AP-1 se ve aumentada (Paech *et al.* 1997). Sin embargo, trabajos más recientes postulan que no hay cambios significativos en la expresión del REβ en tumores con resistencia al TAM y al fulvestrant (Hurvitz & Pietras 2008). De esta manera, no hay en la actualidad conclusiones precisas respecto al rol de REβ en la resistencia a la terapia hormonal.

- **CYP2D6**

Una posible razón por la cual los tumores mamarios pueden presentar resistencia a la terapia con TAM es debido a un polimorfismo genético en la enzima Citocromo CYP2D6, que metaboliza el TAM a su metabolito más activo, el endoxifeno. Se ha observado que pacientes tratados con TAM, que presentan determinados polimorfismos en el gen de la enzima P4502D6 (*CYP2D6*), producen niveles menores de endoxifeno y presentan mayor riesgo de recurrencia tumoral. Además esta enzima está involucrada en el metabolismo de otras drogas, como antipsicóticos, antidepresivos, antiarrítmicos β-bloqueantes, y puede ser

inhibida por otras como los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. Por este motivo es muy importante tener cuidado a la hora de combinar el TAM con otras drogas (Eroles *et al.* 2010; Hurvitz & Pietras 2008; Normanno *et al.* 2005).

- **Coreguladores**

La actividad transcripcional de REα depende tanto de coactivadores como corepresores. Muchos estudios *in vitro* demostraron que alta expresión de coactivadores reducen la eficiencia del TAM como terapia antiestrogénica. El AIB1 es un coactivador que modula la función del RE. En relación a esto, un estudio reciente ha demostrado que un alto nivel de expresión de este coactivador está asociado con una menor posibilidad de sobrevida en pacientes que reciben TAM como terapia (Osborne *et al.* 2003). Altos niveles de coactivadores podrían aumentar los efectos agonistas del TAM y, de esa manera, contribuir a la generación de resistencia a esta droga (Eroles *et al.* 2010; Hurvitz & Pietras 2008). Altos niveles de AIB1 y HER-2 están relacionados con un peor pronóstico. La explicación biológica podría ser que HER-2 activa MAPK que fosforilan y activan al RE y al AIB1 (Eroles *et al.* 2010).

Los corepresores son reclutados por RE cuando un antagonista como el TAM se une a él (Lavinsky *et al.* 1998). A pesar que estudios *in-vitro* han sugerido que niveles de corepresores reducidos podrían estar asociados a la resistencia al TAM, no hay datos clínicos al respecto que avalen esta hipótesis.

- **Factores de crecimiento**

Las vías de señalización de los factores de crecimiento juegan un rol muy importante en la adaptación de las células de carcinomas mamarios a la falta de estrógenos. Una expresión alterada de los factores de crecimiento también puede contribuir a la generación de un fenotipo hormono resistente (Hurvitz & Pietras 2008; Normanno *et al.* 2005).

Las moléculas más involucradas en estos procesos son el EGFR, HER-2/*neu*, TNFα, PKCα, y MAPK. Existen evidencias que sugieren que las vías de señalización de los receptores tirosina quinasa participan en la resistencia hormonal modulando la localización subcelular de los coreguladores del RE (Hurvitz & Pietras 2008).

El principal mecanismo de resistencia constitutiva de las células de carcinoma mamario a la terapia hormonal es la pérdida de la expresión de REα (Badia *et al.* 2007). En

relación a ello, los niveles de expresión de EGFR, ErbB-2 y TGFα son generalmente mayores en carcinomas RE negativos en comparación con los tumores positivos (Normanno *et al.* 1994). Hay evidencias que sugieren que la activación de las vías de señalización de factores de crecimiento podría reducir la expresión y/o función de REα.

- **Efectos de una deprivación a largo plazo de estrógenos**

Células de cáncer de mama que son deprivadas de E2 se adaptan a la falta de esta hormona desarrollando hipersensibilidad a estrógenos. Esta podría ser la explicación para aquellos tumores hormono dependientes que inicialmente regresionan luego de una ovariectomía en mujeres premenopáusicas y reinciden en respuesta a muy bajas concentraciones de estrógenos y finalmente regresionan cuando reciben terapia con AI (Hurvitz & Pietras 2008).

A lo largo de estos párrafos se mencionaron algunos mecanismos involucrados en la resistencia de las células de carcinoma mamario a la manipulación endócrina, principalmente vinculados con el REα y la resistencia al TAM (Figura 1-5). Pese a que son importantes los avances en los estudios de resistencia endócrina, en la actualidad los mecanismos causantes de los fenotipos resistentes permanecen inciertos y como consecuencia no están disponibles aún métodos efectivos para prevenir la resistencia (Johnston 2009).

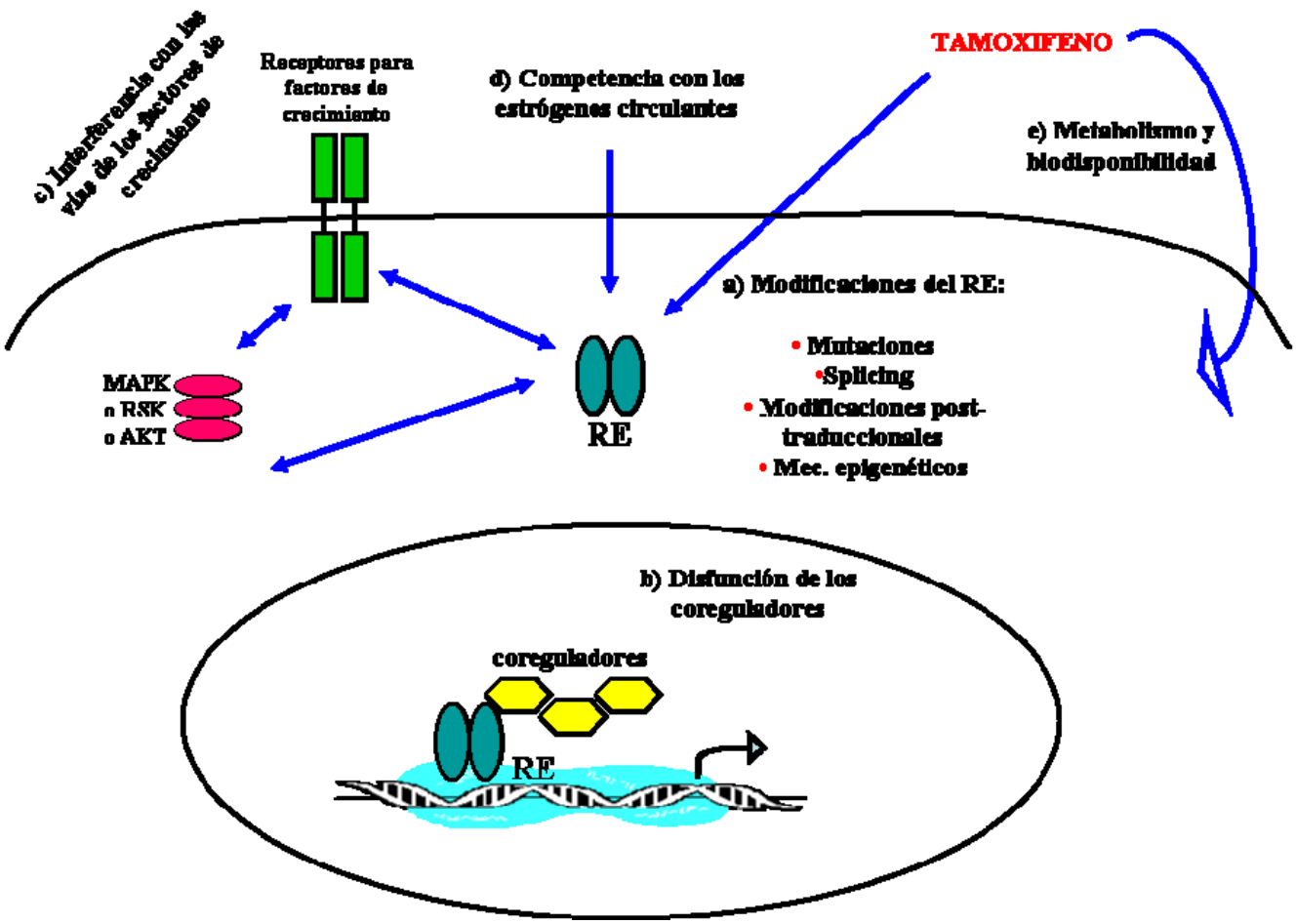


Figura 1-5 Mecanismos de resistencia al TAM. Las modificaciones en el RE asociadas a la resistencia al TAM, pueden involucrar mutaciones, *splicing* alternativo, modificaciones *post* traduccionales y mecanismos epigenéticos. Pueden existir disfunciones de los coreguladores de receptores nucleares e interferencia con las vías de señalización de factores de crecimiento, que pueden involucrar la fosforilación y activación del RE por las MAPK, RSK y AKT. También puede ocurrir una acción no genómica del RE, activando receptores de factores de crecimiento por la acción de vias de señalización intracelular. Adaptado de *Badía y colaboradores*, *2007*.

V- MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS Y CÁNCER

Como en muchos tipos de cáncer, en el cáncer de mama la cantidad de genes desregulados que existen afectan el correcto funcionamiento del ciclo celular, de la apoptosis, de la reparación del ADN, procesos de detoxificación, desinflamación, adhesión celular y migración. Durante mucho tiempo se han adjudicado estos defectos a mutaciones en genes claves del crecmiento celular. En la actualidad se sabe que las modificaciones epigenéticas son tan importantes como las genéticas. Las modificaciones epigenéticas son aquellos cambios hereditarios en el ADN que no modifican su secuencia y coordinan procesos biológicos muy importantes, como la inactivación del cromosoma X, el *imprinting* genómico, reprogramación del genoma en procesos de diferenciación y desarrollo. Si estas funciones se ven alteradas repercuten negativamente generando desórdenes como el posible desarrollo de carcinomas mamarios (Jones & Baylin 2007; Veeck & Esteller 2010).

Metilación del ADN y cáncer

La modificación epigenética que predomina en los mamíferos es la metilación de las citosinas, que no modifica la función del producto del gen, sino que determina dónde y cuándo se expresa dicho gen. La metilación del ADN en el genoma es estable en estadios tempranos del desarrollo y se mantiene durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, el patrón de metilación del genoma puede verse modificado en células tumorales, en donde la metilación aberrante genera el silenciamiento de genes o la desmetilación aberrante produce la expresión de genes que no deberían expresarse (Susan Clark *et al.* 2006).

En las células de mamíferos el 3-5 % de las citosinas se encuentran como 5-metilcitosina. Esta modificación de las citosinas ocurre después de la replicación del ADN y es catalizada por las *DNA* metiltransferasas (Dnmts) utilizando S-adenosil-metionina como donor del grupo metilo (Veeck & Esteller 2010; Figura 1-6). Han sido descriptas cinco Dnmts: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a y Dnmt3b, Dnmt3L. De estas cinco sólo tres han mostrado tener actividad metiltransferasa: Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b (Veeck & Esteller 2010). La Dnmt1 es la de mantenimiento, ya que utiliza ADN hemimetilado como molde. Su función principal es mantener el patrón de metilación luego de la replicación del ADN (Bouchard & Momparler 1983). Las Dnmt3a y Dnmt3b han sido descriptas como metilasas *de novo*, ya que pueden generar esta modificación en ADN hemimetilado y no metilado. Las Dnmt2 y

Dnmt3L no tienen actividad citosina metiltransferasa, pese a que se ha visto que la Dnmt3L es capaz de estimular la metilación *de novo* mediada por Dnmt3a (Veeck & Esteller 2010). El grupo de Robertson reportó ya en 1999 que la expresión de la Dnmt3b estaba aumentada en tumores sugiriendo su participación en la carcinogénesis (Veeck & Esteller 2010). Se sabe en la actualidad que las Dnmt están aumentadas en muchos tipos de tumores: en leucemias, cáncer de próstata, de ovario, de endometrio y mama (Veeck & Esteller 2010).

El 70% aproximadamente de los residuos 5-metilcitosina se encuentran en las secuencias CpG, y, cuando estas secuencias se encuentran con alta frecuencia en el genoma, son denominadas "islas CpG". Las islas CpG contienen múltiples sitios de unión a factores de transcripción y se encuentran como regiones regulatorias de la expresión en promotores y exones. Muchos genes cuya expresión esta regulada por metilación están asociados a procesos de diferenciación y desarrollo embrionario, aunque otros también a procesos de promoción tumoral (Momparler & Bovenzi 2000; Richardson & Yung 1999). La metilación del ADN esta asociada a la pérdida de la expresión de los genes cuya secuencia se encuentra modificada. Esto ocurre porque esta modificación interfiere con el pegado de factores de transcripción que ocurre con menor afinidad. Otro mecanismo a través del cual la metilación puede regular la expresión de genes es por el pegado de "proteínas específicas de pegado al ADN metilado" (*methylated DNA binding proteins*, MDBP) a secuencias promotoras metiladas (Esteller 2002). Por último se sabe también que estas secuencias metiladas pueden atraer otras proteínas que actúan como represores de la transcripción, denominadas MeCPs (*Methylated CpG-binding proteins*; Meehan *et al.* 1989).

Los niveles de ADN hipermetilado en células tumorales son generalmente mayores que los de las células normales (Gama-Sosa *et al.* 1983; Feinberg *et al.* 1994) Durante el proceso de tumorigénesis se ha observado un incremento en la metilación de genes como p16 (supresor tumoral), E-caderina (supresor de la capacidad de invasión), RE, RARβ (supresor tumoral), entre otros, ver Tabla 1-2.

En relación al RE, se sabe que un porcentaje de los tumores RE+ pueden evolucionar a RE- y desarrollar consecuentemente resistencia a la terapia hormonal, es por ello que durante muchos años se han estudiado los mecanismos por los cuales el REα está silenciado en algunos tumores mamarios. Pese a que han sido descriptas mutaciones de la secuencia de esta receptor, las mismas presentan muy baja frecuencia y no justifican la mayor parte de los casos. En la actualidad se sabe que el gen para el REα puede estar silenciado por metilación

de su promotor. También ha sido reportado por varios grupos que el RP puede estar silenciado por metilación en lineas celulares y tumores RP- :

- Rena G. Lapidus y colaboradores (Lapidus *et al.* 1996), ya en 1996 demostraron mediante análisis de *southern blot* enzimas de restricción que las islas CpG en el extremo 5´ del *RP* están metiladas en un porcentaje importante de muestras de carcinomas mamarios humanos RP- mostrando una correlación entre la pérdida de expresión de RP y la metilación de su promotor en muestras primarias de tumores mamarios, y relacionan esta pérdida de expresión de RP con la resistencia endócrina.

- Sameer Mirza y colaboradores (Mirza *et al.* 2007) demuestran que en muestras de carcinomas de mama ductales invasivos de mujeres provenientes de la India la falta de expresión de RPB, está causada por hipermetilación de su promotor.

- Yun Ren y colaboradores (Ren *et al.* 2007), demuestran que existe una correlación entre la hipermetilación del exón de RP y su silenciamiento en dos líneas celulares (Ishikawa; KLE) de cáncer de endometrio.

- L. Fleury y colaboradores (Fleury *et al.* 2008), demuestran que el REα no puede unirse al *RP* por estar este último hipermetilado en la isla CpG río abajo del promotor de RPB en las células MDA-MB231. En su estudio muestran que no es suficiente con re-expresar REα para que se exprese RP, sino que es necesario además tratar las células con un agente desmetilante para desmetilar las regiones regulatorias del gen.

- Shauna N. Vasilatos y colaboradores (Vasilatos *et al.* 2009), muestran que el promotor de RPB está metilado, pero no el de RPA, en tumores mamarios no asociados a BRCA (non-brca-associated early mammary carcinogénesis).

Si bien como se ha mencionado la metilación tanto del REα como del RP, ha sido reportada mayoritariamente en estudios con líneas celulares, *in vitro*, hay también algunos trabajos que lo han demostrado *in vivo*. Sin embargo no hay estudios *in vivo* que estudien el silenciamiento de RP en procesos tumorales de resistencia adquirida o constitutiva a los tratamientos hormonales.

Se ha demostrado en líneas celulares que existe una correlación entre hipermetilación de genes y sobreexpresión de Dnmts (Roll *et al.* 2008). Para estos estudios se ha utilizado mayormente el agente desmetilante 5-aza-2´-deoxicitidina o decitabina (5azadC). El 5azadC es un análogo de la citosina que se activa *in vivo* por fosforilación y se incorpora al DNA durante la fase S del ciclo celular. Como resultado de la reacción de la metiltransferasa, la Dnmt se une covalentemente al ADN impidiéndole mantener su actividad metilasa (Palii *et al.* 2008; Figuras 1-7 y 1-8). El 5azadC es un deoxi – derivado de la azacitidina (aza), que también es un análogo de la citosina. El 5azadC y el aza son los inhibidores de las Dnmts mejor caracterizados en la actualidad; funcionan de manera muy similar, y ambos presentan efectos tóxicos si son utilizados a largo plazo (Billam *et al.* 2010). Ha sido estudiado que en células negativas para el REα, el tratamiento con 5azadC induce la reexpresión de un receptor funcional (Brinkman & el Ashry 2009; Ferguson *et al.* 1995; Palii *et al.* 2008). La reexpresión del receptor se ha visto acompañada por la resensibilización de las células MDA-MB-231 a la terapia con tamoxifeno (Sharma *et al.* 2006). También se sabe que la inhibición específica de la Dnmt1 utilizando oligonucleótidos antisentido induce la re-expresión del REα en las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (Yan *et al.* 2003).

Existe además del 5azadC y el aza, otro inhibidor de la metilación llamado zebularina. Es también un análogo de la citosina y al igual que el aza y el 5azadC, se incorpora en el ADN y une covalentemente las Dnmts inhibiendo su actividad de metiltransferasa. A diferencia de los demás inhibidores, presenta menor toxicidad en la mayoría de las células en las que se ha probado. Se ha demostrado que es capaz de inducir la re-expresión del REα y RP (Billam *et al.* 2010).

Uno de los métodos para estudiar la metilación de los genes es la PCR específica para metilación (*Methylation specific PCR,* MSP). Un paso crítico en esta técnica es la modificación del ADN por el bisulfito de sodio. Esta modificación consiste en la deaminación de las citosinas y es específica para hebras únicas de ADN y no apareadas. A las citosinas no metiladas las convierte en uracilo mientras que las metiladas en timina. El correcto diseño de los *primers* también es crítico en esta técnica. La MSP tiene alta sensibilidad. (Susan Clark *et al.* 2006; Figura 1-9).

Gene	*Function*	*Location*	*Tumor profile*	*Consequences*
p16^{INK4a}	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor	9p21	Multiple Types	Entrance in Cell Cycle
p14^{ARF}	*MDM2* inhibitor	9p21	Colon, Stomach, Kidney	Degradation of *p53*
p15^{INK4b}	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor	9p21	Leukemia	Entrance in Cell Cycle
hMLH1	DNA mismatch repair	3p21.3	Colon, Endometrium, Stomach	Frameshift Mutations
MGMT	DNA repair of 06-alkyl-guanine	10q26	Multiple Types	Mutations, Chemosensitivity
GSTP1	Conjugation to Glutathione	11q13	Prostate, Breast, Kidney	Adduct Accumulation?
BRCA1	DNA Repair, Transcription	17q21	Breast, Ovary	Double Strand-Breaks?
p73	p53 Homologue	1p36	Lymphoma	Unknown (Cisplatin?)
LKB1/STK11	Serine/Threonine Kinase	19p13.3	Colon, Breast, Lung	Unknown
ER	Estrogen Receptor	6q25.1	Breast	Hormone Insensitivity
PR	Progesterone Receptor	11q22	Breast	Hormone Insensitivity
AR	Androgen Receptor	Xq11	Prostate	Hormone Insensitivity
RARβ2	Retinoic Acid Receptor β2	3p24	Colon, Lung, Head and Neck	Vitamin Insensitivity?
RASSF1	Ras Effector Homologue	3p21.3	Multiple Types	Unknown
VHL	Ubiquitin Ligase Component	3p25	Kidney, Hemangioblastoma	Loss of hypoxic response?
Rb	Cell Cycle Inhibitor	13q14	Retinoblastoma	Entrance in Cell Cycle
THBS-1	Thrombospondin-1, Anti-angiogenic	15q15	Glioma	Neovascularization
CDH1	E-cadherin, cell adhesion	16q22.1	Breast, Stomach, Leukemia	Dissemination
HIC-1	Transcription Factor	17p13.3	Multiple Types	Unknown
APC	Inhibitor of β-catenin	5q21	Aerodigestive Tract	Activation β-catenin Route
COX-2	Cyclooxigenase-2	1q25	Colon, Stomach	Antinflamatory Resistance?
SOCS-1	Inhibitor of JAK/STAT Pathway	16p13.13	Liver	JAK2 Activation
SRBC	*BRCA1*-binding Protein	1p15	Breast, Lung	Unknown
SYK	Tyrosine Kinase	9q22	Breast	Unknown
RIZ1	Histone/Protein Methyltransferase	1p36	Breast, Liver	Aberrant Gene Expression?
CDH13	H-cadherin, cell adhesion	16q24	Breast, Lung	Dissemination?
DAPK	Pro-apoptotic	9q34.1	Lymphoma, Lung, Colon	Resistance to Apoptosis
TMS1	Pro-apoptotic	16p11	Breast	Resistance to Apoptosis
TPEF/HPP1	Transmembrane Protein	2q33	Colon, Bladder	Unknown

Tabla 1-2. Algunos genes que son regulados por metilación de sus promotores en tumores humanos. Tomado de *Manel Esteller y colaboradores, 2002*. Destacamos el RP en rojo cuya expresión se estudiará a lo largo de este trabajo de tesis.

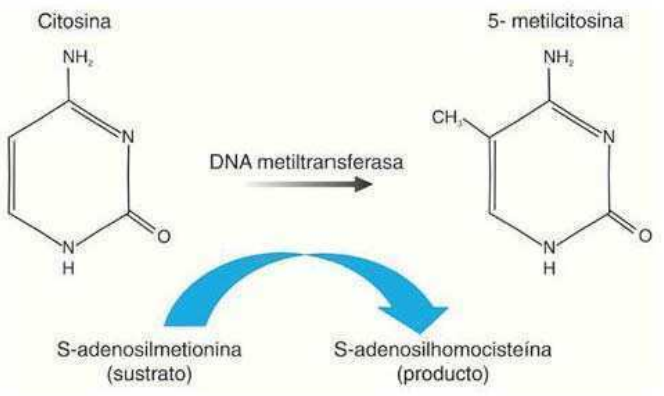


Figura 1-6. Metilación de la citosina. La DNA metiltransferasa cataliza la transferencia de grupos metilo del sustrato S-adenosilmetionina a la citosina, produciendo 5-metilcitosina y S-adenosilhomocisteína. *Adaptado de Luis Miguel Gomez y colaboradores, 2006.*

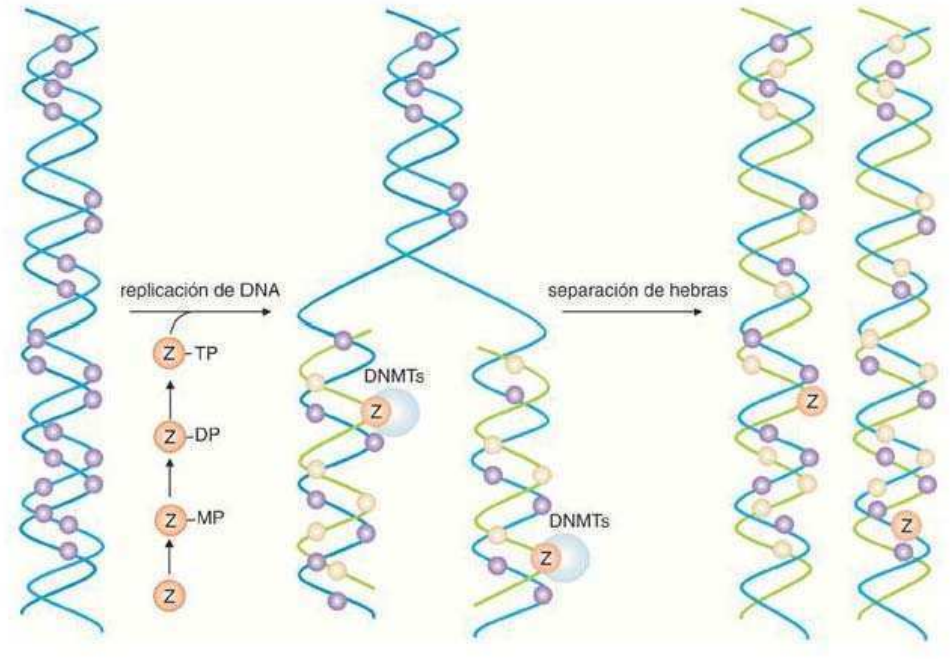


Figura 1-7. Mecanismo de acción de los inhibidores de la metilación. El análogo de nucleósidos 5azadC (representado por la Z) es convertido en trifosfato en la fase S del ciclo celular y es incorporado en el sitio de la citosina en la hebra nueva. Una vez que están en el ADN, estas bases "fraudulentas" forman enlaces covalentes con las *DNA* metiltransferasas (Dnmts) resultando en la desmetilación del ADN. Círculos rosados: CpG metiladas, círculos claros: CpG no metiladas. *Adaptado de Luis Miguel gomez y colaboradores, 2006.*

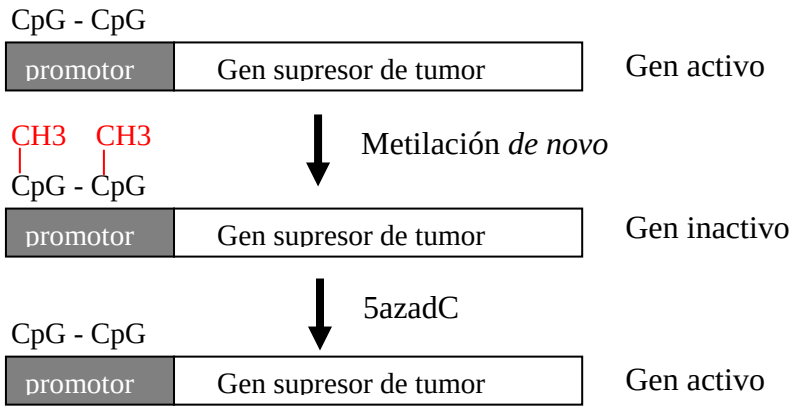


Figura 1-8. Inactivación de la expresión de un gen supresor de tumor por metilación *de novo* de la región promotora y reactivación de la expresión por tratamiento con 5azadC. *(Adaptado de Momparler y Bovenzi, 2000).*

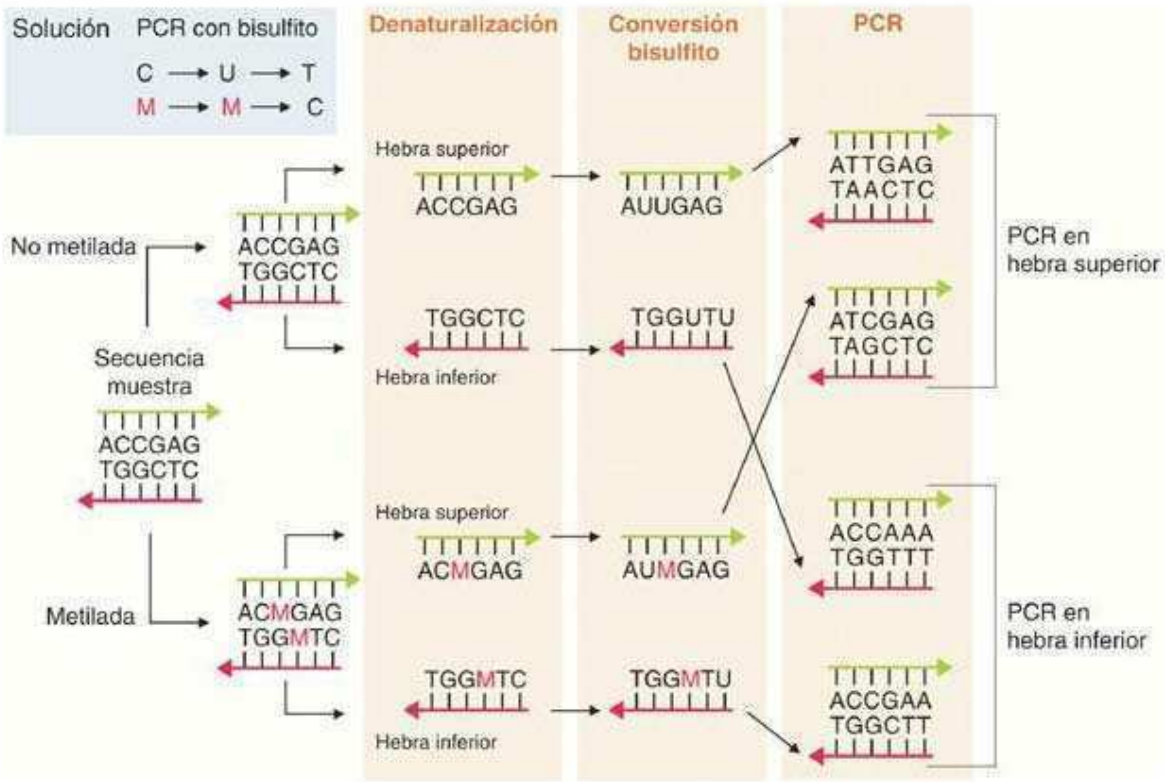


Figura 1-9. Modificación del ADN con bisulfito de sodio. La exposición del ADN al bisulfito de sodio produce la conversión de las citosinas no metiladas en uracilos. Como consecuencia, el ADN transformado necesita diferentes *primers*, unos específicos pero el ADN metilado y otros para el ADN no metilado. *Adaptado de Luis Miguel Gomez y colaboradores, 2006.*

Silenciamiento de genes por aumento de actividad de HDAC

La estructura de la cromatina y la transcripción de los genes son reguladas también por la acetilación de las histonas. Durante la fase S del ciclo celular las histona acetiltransferasas (HAT) acetilan residuos conservados de lisina en las histonas por transferencia de un grupo acetilo desde una molécula de acetil-CoA para formar ε-N-acetil lisina. La acetilación neutraliza las cargas positivas de las histonas, reduciendo así la capacidad de las histonas para unirse al ADN. Esta reducción de la afinidad de unión permite la expansión de la cromatina y así la transcripción genética de esa región cromosómica. Las histona deacetilasas (HDAC) eliminan los grupos acetilo, incrementando la carga positiva de las histonas y por tanto la afinidad de éstas por el ADN. Este incremento de la unión condensa la estructura del ADN, impidiendo la transcripción. La deacetilación puede entonces ser una causa también del silenciamiento de genes. Ha sido reportado que inhibidores de las HDAC como la tricostatina A (TSA) pueden inducir la expresión del RARα, sin embargo, genes como p16 y p21 pueden re-expresarse sólo con el tratamiento combinado de TSA y 5azadC pero no con las terapias simples en células neoplásicas de colon. (Yan *et al.* 2001). Se ha observado también que en las células resistentes al TAM, MDA-MB-231 REα-, la expresión del receptor puede recuperarse con el tratamiento con TSA y 5azadC y las células recuperan la sensibilidad al tratamiento (Sharma *et al.* 2006). Esta re-expresión del REα inducida por el tratamiento combinado de TSA y 5azadC ha sido reportada también en las células MDA-66 (derivadas de las MDA-MB-231). En relación al RP, ha sido reportado también que en las células derivadas de las MDA-MB-231, HE-5 y las MDA-66, el mensajero de RP aumenta con el tratamiento combinado de TSA y 5azadC (Fleury *et al.* 2008).

Micro-ARN (miARN) en cáncer de mama

Los miARNs son secuencias regulatorias de ARN de entre 20 y 30 nucleótidos de longitud que hibridan perfectamente con las regiones 3´ no codificantes (3´UTR) de ARNm blanco, produciendo consecuentemente su degradación o inhibición de la traducción de dicho ARNm. La función del ARNm es la que determina si el miRNA actúa como supresor tumoral (si el ARNm corresponde a un oncogen) o como oncogénico (si el ARNm corresponde a un supresor tumoral). Una familia de miARN conocida es la familia let-7. Su depleción en cáncer de mama, de pulmón y de colon

aumenta la tumorigenicidad. Otro ejemplo es miR-21, cuya sobreexpresión en cáncer de mama confiere mayor invasividad y promueve la metástasis tumoral al pulmón. Actualmente la cantidad de genes regulados por miARN son cada vez más. Los miARN han demostrados jugar un rol muy importante en la regulación de muchos procesos biológicos y patológicos. Además se ha demostrado que en muchos tipos de cáncer, incluyendo de mama, los miARN están regulados negativamente. Han sido descriptas algunas correlaciones entre la regulación negativa de miARNs y positividad para RE y RP, tamaño tumoral, presencia de metástasis, expresión de p53. En particular la pérdida de expresión de miembros de la familia let7 se ha asociado con los niveles de expresión de RP (let-7c) y un alto nivel de proliferación (let-7c y let-7d).

Los miARN pueden estar regulados por metilación, la hipermetilación de los mismos puede ser la causa de su silenciamiento. También pueden estar desregulados por el número de copias, o por un mal funcionamiento de la maquinaria celular que los procesa (Veeck & Esteller 2010).

VI. MODELO EXPERIMENTAL DE INDUCCIÓN DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS POR PROGESTÁGENOS.

En nuestro laboratorio se desarrolló un modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios murinos por administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/c, con una incidencia actuarial del 76% y una latencia media de 52 semanas (Lanari *et al.* 1986a; Lanari *et al.* 1986b; Lanari *et al.* 2009; Figura 1-11). Estos tumores son en su mayoría de histología ductal y tienen capacidad de dar metástasis en pulmón y nódulos linfáticos (Lanari *et al.* 1989). Poseen inicialmente, un comportamiento progestágeno dependiente u hormono dependiente (HD) con altos niveles de expresión de receptores de estrógenos (REα y REβ; Soldati *et al* 2009) y de progesterona (RP), bajos o no detectables para prolactina y EGF por técnicas de unión al ligando (Molinolo *et al.* 1987) y además expresan ErbB2 (Elizalde *et al.* 2000; Elizalde *et al.* 2001). Tanto el FGF-2 (Giulianelli *et al.* 2008a) como el TNFα (Rivas *et al.* 2008) estimulan el crecimiento de este tumor *in vivo*, en ausencia de MPA. El E2 y los antiprogestágenos (Kordon *et al.* 1991) inhiben el crecimiento tumoral progestágeno dependiente. De acuerdo a la clasificación molecular actual (Perou *et al.* 2000; Sorlie *et al.* 2001; Sorlie *et al.* 2003) se trata de carcinomas luminales, ya que además de expresar alto contenido de receptores hormonales expresan las citokeratinas 8 y 18 (Giulianelli *et al.* 2008b).

Los tumores se mantienen por pasajes singeneicos en ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c en presencia del progestágeno. Asimismo, se lograron seleccionar por presión selectiva en ratones sin tratar con el MPA, variantes progestágeno independientes u hormono independientes (HI) que conservan altos sus niveles de expresión del RE y del RP.

En menor proporción, el MPA induce también carcinomas del tipo lobulillar que expresan bajos niveles de RE y RP y mayores de EGFR evaluados por técnicas de unión al ligando. Histológicamente, se asemejan a los tumores mamarios que surgen espontáneamente en hembras multíparas BALB/c. Tanto los tumores del tipo ductal como lobulillar son precedidos por lesiones preneoplásicas similares a las del cáncer de mama humano (Molinolo *et al.* 1987).

En los primeros experimentos, luego de un período de latencia de 4 a 12 meses se establecieron diversas líneas tumorales. Algunas de ellas, definidas como HD, se caracterizan por tener una mayor tasa de crecimiento, un menor período de latencia en

animales tratados con MPA o Pg y por no crecer en animales ovariectomizados sin tratar.

Eventualmente surgieron variantes tumorales HI que crecen tanto en presencia como en ausencia de la hormona (Kordon *et al.* 1990; Lanari *et al.* 1989; Molinolo *et al.* 1987). Estas variantes conservan altos niveles de RE y RP. Los tumores HI crecen en forma similar en animales tratados con MPA, no tratados, ovariectomizados y con operación simulada.

Los tumores HI se han subdividido a su vez en respondedores (sensibles) y resistentes a la terapia con antiprogestágenos y E2 (Helguero *et al.* 2003; Wargon *et al.* 2009), y estos últimos a su vez se clasifican en resistentes constitutivos y resistentes adquiridos (Figura 1-12).

Las células epiteliales HD purificadas de cultivos primarios son estimuladas con Pg o MPA, e inhibidas con E2 o con antiprogestágenos (Dran *et al.* 1995). FGFs, HRG o TNFα estimulan su crecimiento (Balana *et al.* 1999; Lamb *et al.* 1999), mientras que el EGF, IGF-I y el IGF-II no tienen efecto estimulatorio cuando se los administra solos (Elizalde *et al.* 1998; Molinolo *et al.* 1998), sin embargo, los dos últimos potencian la estimulación inducida por MPA. TGFβ 1, 2 y 3 ejercen todos efectos inhibitorios de la proliferación celular (Viegas *et al.* 1999). A pesar de que *in vivo* ambas variantes tumorales, HD y HI, son muy diferentes en cuanto a la dependencia por el MPA, *in vitro*, las células epiteliales derivadas de los mismos tumores, tienen el mismo requerimiento de hormonas y de factores de crecimiento para crecer (Giulianelli *et al.* 2008a). Es decir, ambos cultivos primarios son estimulados por MPA, y esta estimulación es inhibida por RU-486 y E2. Postulamos que en los tumores HI, factores estromales podrían estar activando a los RP. En una línea de trabajo que venimos desarrollando desde hace varios años en nuestro laboratorio, demostramos que el FGF-1 y el 2 (*fibroblast growth factor* 1 y 2) regulan la proliferación de células HD en forma similar al MPA, demostrando así un *cross talk* entre la vía del FGF y del RP (Giulianelli *et al.* 2008a; Lamb *et al.* 1999).

En este modelo, el RP juega un papel esencial en el crecimiento tumoral. Los tumores de crecimiento HI respondedores al tratamiento endocrino, tienen el mismo patrón de expresión de isoformas del RP que los tumores HD, excepto que en los primeros el MPA regula principalmente la isoforma B del RP. La importancia de este receptor en el crecimiento tumoral fue determinada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* con nucleótidos antisentido para el RP (asRP). Mediante esta estrategia se redujeron los

niveles de expresión del RP, causando una inhibición en la proliferación celular *in vitro*, y una inhibición el crecimiento tumoral HI *in vivo* (Lamb *et al.* 2005).

Las variantes tumorales del modelo experimental del MPA sensibles a la terapia hormonal, expresan RP y RE. Éstas, se caracterizan por expresar mayores niveles de RPA que de RPB (Helguero *et al.* 2003), mientras que las variantes con resistencia constitutiva (C4-2-HI, 59-HI) y la variante con resistencia adquirida (C4-HIR) a los antiprogestágenos expresan mayores niveles de RPB que de RPA (Tesis doctoral Luisa Helguero, Tesina Licenciatura Victoria Wargon). Por otra parte, la expresión del REα es menor en los tumores resistentes que en los sensibles, mostrando cierto paralelismo con la expresión de RPA (Figura 1-13). Estos resultados, muestran que existe una correlación entre la resistencia a los antiprogestágenos, bajos niveles de RPA y mayores de RPB.

La regresión tumoral inducida por RU-486 y E2, es acompañada de citostasis, apoptosis de células epiteliales e incremento en proteínas regulatorias del ciclo celular como p21, p27 y p53, llevando a una disminución del parénquima, a un aumento del estroma tumoral y a una remodelación en el patrón de expresión de laminina y colágeno IV (Vanzulli *et al.* 2002; Simian *et al.* 2006), o a la diferenciación celular (Wargon *et al.* 2009). Recientemente, utilizamos agonistas selectivos para el REα y el REβ, con el fin de identificar qué receptor esta involucrado en la inhibición del crecimiento tumoral mediado por E2. *In vitro*, E2, PPT (agonista selectivo del REα) y DPN (agonista selectivo del REβ) inhiben la proliferación mediada por MPA de células epiteliales C4-HI, observándose una disminución en la expresión del REα y en ciclina D1, y un incremento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax. *In vivo*, E2 y PPT son muy similares induciendo la regresión tumoral, observándose una disminución en la expresión del REα y un incremento en la participación de la vía intrínseca de la apoptosis (aumento de Bax y caspasa 9 activa, y disminución de Bcl-xl y Bcl-2). Mientras que con el DPN, se observó sólo un efecto inhibitorio transiente del crecimiento tumoral, acompañado por un aumento en la expresión de Bax y Aif (Soldati *et al.* 2009).

Asimismo, como se explicó previamente, el E2 ejerce efectos proapoptóticos en células que sobreexpresan PKCα (Zhang *et al.* 2009). En este modelo, también observamos una elevada expresión de PKCα en tumores respondedores al tratamiento

con E2 (tumores C4-HI), en comparación a aquellos no respondedores o resistentes (tumores C4-2-HI, resultados preliminares no publicados).

El estudio citogenético de los tumores de este modelo demostró que los tumores HD presentan generalmente un número de cromosomas cuasi-diploide, mientras que las variantes HI, o mantienen el mismo número (la minoría) o presentan un número de cromosomas en el rango triploide a tetraploide. Todos los tumores presentan alteraciones numéricas y estructurales de sus cromosomas; siendo los cromosomas 4 y 7 los más involucrados en traslocaciones, los 3, 4 y 6 en ganancia, y los cromosomas 16 y X en pérdida. La adquisición de la hormono-independencia no es causada por el aumento de cromosomas, este aumento suele ser posterior y ocurre como consecuencia del avance de los pasajes *in vivo* (Fabris *et al.* 2005). Además de las alteraciones numéricas detectadas, los tumores de la familia C4 presentan una mutación en el gen TRp53 (*transformation related protein 53*). Esta mutación en el codón 152 representa un cambio de serina a arginina en la proteína p53, sin embargo no están asociadas a la inestabilidad cromosómica (Fabris *et al.* 2005).

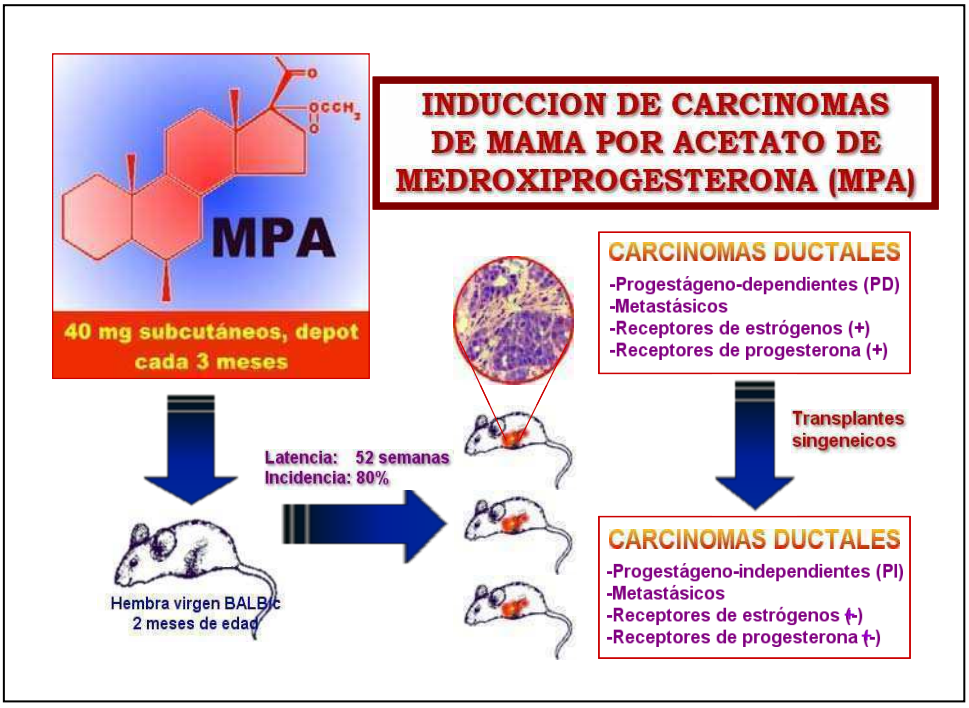


Figura 1 -11. **Modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios murinos por administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/**c. Estos tumores en pasajes singenéicos tienen inicialmente un comportamiento preogestágeno dependiente (HD). Por pasajes sucesivos de los tumores HD inducidos por MPA en animales sin tratar se seleccionaron variantes de crecimiento autónomo, progestágeno independientes (HI).

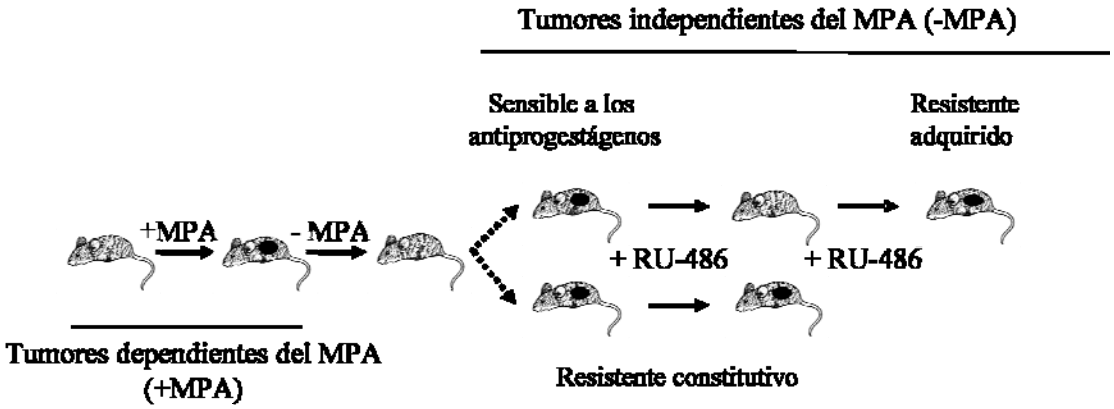


Figura 1 -12. **Modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/c**. Los tumores HI se clasifican en respondedores (sensibles) y resistentes a la terapia con antiprogestágenos (RU-486 y ZK 230211), y estos últimos a su vez se subdividen en resistentes constitutivos y resistentes adquiridos a los antiprogetágenos.

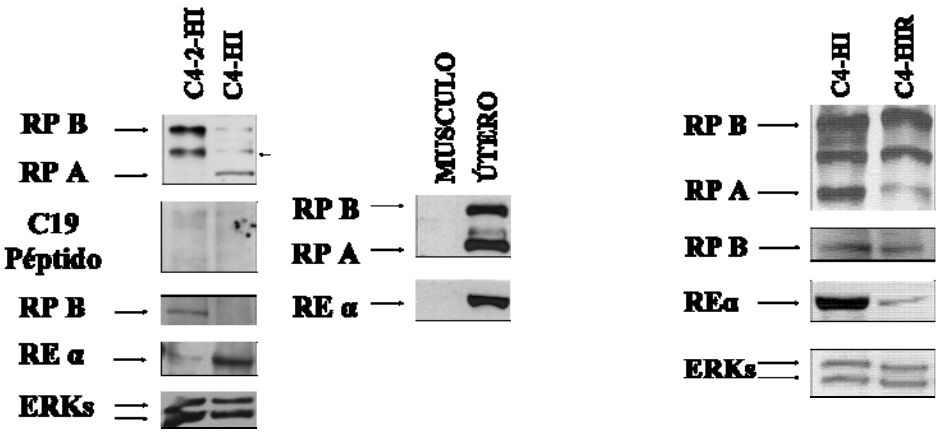


Figura 1-13. Los tumores con resistencia constitutiva (C4-2-HI) y adquirida (C4-HIR) expresan mayores niveles de RPB que RPA, mientras que los tumores sensibles al RU-486 (C4-HI) expresan mayores niveles de RPA. Se muestran *western blots* de extractos nucleares de los tumores crecidos sin tratamiento hormonal, revelados con el Ac de RP C-19, Ac de RPB, Ab6; o Ac de REα MC-20. Como control del anticuerpo C19, se incubó la membrana con el Ac. y el péptido contra el cual el anticuerpo fue desarrollado. Como control negativo del Ac C19 y M-C20 se usó músculo y como control positivo el útero. Se utilizaron las ERKs como control de carga. En todos los casos se muestra un *western blot* representativo de seis.

HIPÓTESIS-OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Nuestro Laboratorio se ha focalizado en los últimos años en estudiar el papel jerárquico de los RP en el crecimiento del cáncer de mama basado principalmente en observaciones realizadas en nuestro modelo experimental de carcinomas mamarios inducidos por la administración de MPA. Hemos demostrado que tanto el bloqueo de la expresión génica del RP, así como su inhibición farmacológica usando diferentes inhibidores, pueden inducir la regresión tumoral. Por otro lado reportamos hace algunos años ya que los tumores sensibles y los resistentes constitutivos tenían niveles similares de RP evaluado por el ensayo de protección a la ARNasa y por inmunohistoquímica, pese a que por *western blot* se observaban diferencias (Helguero *et al.* 2003). Sabíamos por resultados obtenidos durante la tesis doctoral de Luisa Helguero que los tumores con resistencia constitutiva C4-2HI y 59-HI expresan mayores niveles de RPB que de RPA. Asimismo, en resultados previos pudimos observar que la variante tumoral C4-HIR, con resistencia adquirida al antiprogestágeno RU-486, mostraba mayores niveles de expresión de RPB que de RPA, a diferencia de su variante sensible que mostraba exactamente el patrón opuesto. Estos resultados previos sumados a otros que postulan que el RU-486 ejercería efectos agonistas cuando se une a la isoforma B y antagonistas cuando se une a la A (Horwitz *et al.* 1995; Wardell *et al.* 2010), nos llevan a plantear entonces la siguiente hipótesis:

Los antiprogestágenos resultan inhibitorios en el crecimiento de tumores mamarios que expresan altos niveles de la isoforma A del RP. El patrón de expresión de RPA/RPB sería un marcador predictivo para elegir aquellos tumores que responderían eficientemente a la terapia con antiprogestágenos.

Asimismo, resultados previos mostraron que la resistencia adquirida puede revertir por pasajes consecutivos en ausencia de la presión selectiva con RU-486 y por tratamiento con E2 durante 48 hs., y que en ambos casos la recuperación de la sensibilidad al antiprogestágeno esta acompañada por la re expresión de RPA. Esto nos lleva a postular que:

La expresión de RPA está regulada por mecanismos epigenéticos en los tumores resistentes. Teniendo en cuenta que el RP puede regular su expresión por

metilación de su promotor, hipotetizamos que la isoforma A del RP se regula por metilación de su promotor.

Finalmente, considerando que los CAFs HD son diferentes de los HI, hipotetizamos que:

Los CAFs HIR estan involucrados en el crecimiento hormono resistente.

Objetivo general

Estudiar el rol de RPA en la determinación del fenotipo resistente.

Para ello fijamos los siguientes objetivos particulares

- Generar la mayor cantidad posible de variantes con resistencia adquirida al RU-486 en el modelo de carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.

- Validar la resistencia al RU-486 con el antiprogestágeno ZK 230211.

- Caracterizar las nuevas variantes con resistencia adquirida al RU-486 en función de la expresión de los receptores hormonales.

- Caracterizar los tumores con distinto grado de respuesta hormonal respecto a su potencial metastático, tasa de crecimiento, activación de ERK y AKT

- Ssbiendo que el E2 induce la expresión de RPA, evaluar si el tratamiento con E2 o TAM puede sensibilizar a los tumores al tratamiento con antiprogestágenos.

- Caracterizar la respuesta a hormonas *in vitro* y evaluar si el cocultivo con CAFs puede modificar la respuesta observada.

- Estudiar si la expresión de RPA está regulada por metilación de su promotor, y si asi fuese tratar de manipular la expresión con un agente desmetilante.

MATERIALES Y MÉTODOS

I- ANIMALES Y TUMORES.

ANIMALES

Se utilizaron ratones hembras BALB/c vírgenes de dos meses de edad provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de La Plata y criadas en nuestro Bioterio. Los animales fueron mantenidos con una dieta a base de alimento balanceado *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 hs de luz, 12 hs de oscuridad) a una temperatura entre 20 y 23ºC. Los animales fueron manipulados según las normas internacionales las cuales están acordes con la Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources 1996).

TUMORES

En este trabajo utilizamos carcinomas mamarios murinos inducidos por la administración prolongada de MPA a ratones hembra de la cepa BALB/c y mantenidos por transplantes singenéicos (Lanari *et al.* 1986a; Lanari *et al.* 1986b; Lanari *et al.* 1989; Lanari *et al.* 2009). Dentro de este modelo existen diversas variantes hormono dependientes (HD), que necesitan del MPA para crecer, y también hormono independientes (HI), que son capaces de crecer en ausencia del MPA. Dentro del grupo de los tumores HI existen a su vez tumores respondedores a las terapias endócrinas, y tumores no respondedores o resistentes. Dentro de este último grupo podemos definir a su vez a los tumores con resistencia adquirida y aquellos con resistencia constitutiva o *de novo*.

Para llevar a cabo esta investigación utilizamos tumores pertenecientes a 4 familias tumorales diferentes del modelo de carcinogénesis hormonal mamaria inducida por MPA:

- **Famila C4**.

  Tumores: C4-HI (respondedor a la terapia con antiprogestágenos), C4-2-HI (resistente constitutivo a los antiprogestágenos), C4-HIR (resistente adquirido a los antiprogestágenos)

- **Familia 59.**

  Tumores: 59-2-HI (respondedor a la terapia con antiprogestágenos), 59-HI (resistente constitutivo a los antiprogestágenos)

- **Familia 32.**

  Tumor: 32-2-HI (respondedor a la terapia con antiprogestágenos).

- **Familia C7.**

  Tumor: C7-2-HI (respondedor a la terapia con antiprogestágenos).

GENERACIÓN DE NUEVAS VARIANTES CON RESISTENCIA ADQUIRIDA.

Los tumores con patrón HI, sensibles a la terapia con antiprogestagenos, se mantuvieron por pasajes singeneicos en hembras vírgenes BALB/c. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 25-30 mm^2, a las hembras se les colocó un *pellet* de RU-486 sc (6 mg). La mayoría de los tumores presentó un patrón de regresión ante el tratamiento. En el caso de observar desarrollo de resistencia en algún tumor, éste se transplantó a 4 hembras vírgenes BALB/c, y cuando el tumor alcanzó los 20 mm^2 aproximadamente se colocó nuevamente un *pellet* de RU-486 (6 mg) de manera de mantener la presión selectiva, y generar de forma estable el tumor con resistencia adquirida al antiprogestágeno (Figura 2-1). Una vez obtenido el mismo se procedió a su caracterización.

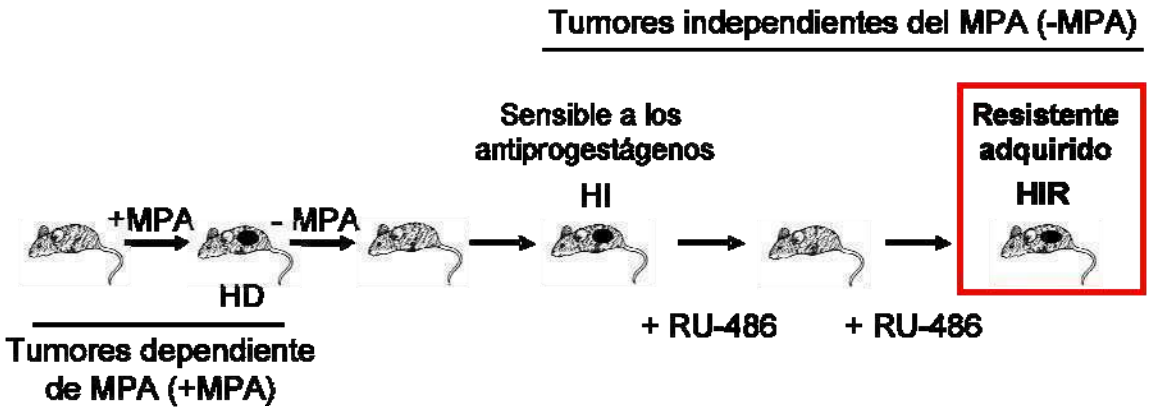


Figura 2-1. Generación de variantes tumorales con resistencia adquirida al RU-486. Tratamos tumores HI con RU-486 (*pellet* 6mg sc) hasta obtener un tumor que creciera en presencia del antiprogestágeno. Luego mantuvimos la resistencia adquirida por presión selectiva con el RU-486 (*pellet* 6mg sc) administrándolo a los ratones cada vez que los tumores alcanzaran un tamaño de 25 mm^2 aproximadamente.

PASAJES TUMORALES.

El transplante tumoral se realizó utilizando un trócar en el que se coloca un trozo de tumor de 2-3 mm^3 en forma sc en el flanco inguinal derecho del animal. En el caso de los tumores con resistencia adquirida, cuando los mismos alcanzaron un tamaño de 25 mm^2 aproximadamente se les colocó un *pellet* de RU-486 de 6 mg sc para mantener la presión selectiva.

HORMONAS, ANTIHORMONAS Y OTRAS DROGAS UTILIZADAS *IN VIVO.*

- **17-β estradiol** (E2, Sigma Aldrich): Se prepararon *pellets* de silastic de 5 mg.
- **RU 38486 (RU-486) o mifepristona** (Sigma Aldrich): Administrada de forma sc en dosis de 12 mg/kg/día o en *pellets* de silastic de 6 mg. Para inocularlo se preparó una solución madre de concentración 16,2 mg/0,4 ml de etanol absoluto, y diariamente se preparó la solución de trabajo 1/100 en solución fisiológica (SF), inyectándose 0,6 ml/ratón.
- **ZK 230211** (Bayer Schering Pharma AG, Berlin). Administrado de forma sc en dosis de 12 mg/kg/día. Se preparó una solución madre de concentración 16.2 mg/0,4 ml de etanol absoluto, y diariamente se preparó la solución de trabajo 1/100 en solución fisiológica (SF).
- **Citrato de tamoxifeno (**Laboratorios Gador, Buenos Aires) Administrado de forma sc en dosis de 5 mg/kg/día. Se preparó una solución madre de concentración 20 mg/ ml de etanol absoluto, y diariamente se preparó la solución de trabajo 1/100 en solución fisiológica (SF).
- **5 aza 2´deoxicitidina** (Sigma Aldrich): Administrado de forma ip en dosis de 0,75-1 mg/kg/día o día por medio. Se preparó una solución madre de concentración 10 mg/ml en DMSO: H_20 1:1, y diariamente se preparó la solución de trabajo en solución fisiológica (SF).
- **Aglepristona** (Virbac): Administrado en forma de depot de 3 mg una vez a la semana.

DISEÑO EXPERMENTAL *IN VIVO* Y VALORACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS TUMORES.

Los experimentos *in vivo* se realizaron utilizando un n=4-5 ratones por tratamiento. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Los tratamientos con RU-486, E2 y ZK 230211 comenzaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 30-50 mm^2. En los experimentos donde los tumores fueron tratados con 5azadC (solo o combinado), los tratamientos comenzaron cuando los tumores eran palpables. Se midió día por medio el tamaño tumoral (ancho y largo, mm^2) de los tumores primarios con un calibre Vernier. Con estos datos se elaboraron las curvas de crecimiento (mm^2 *vs*. tiempo) para los diferentes tratamientos en las variantes tumorales estudiadas.

TOMA DE MUESTRAS.

Una vez finalizados los experimentos *in vivo* los ratones se sacrificaron. Mediante un corte sc ventral se extirparon los tumores, tratando siempre de eliminar las zonas necróticas que generalmente se encuentran en el centro del tumor. Las muestras destinados a estudios de inmunofluorescencia y *western blot* se guardaron inmediatamente guardadas a –80ºC, y las destinadas a estudios por inmunohistoquímica se fijaron en formalina al 10% en PBS 1X (*ver apéndice*) para ser luego incluidos en parafina según técnicas de rutina.

Las muestras para inmunofluorescencia, embebidas en O.C.T. (Tissue-Tek), se cortaron en un crióstato (18 μm) y montaron en portaobjetos silanizados para aumentar la adhesión.

Para análisis de metástasis, se tomaron durante las autopsias muestras de ganglio axilar y de pulmón. Éstas se fijaron en formalina al 10% en PBS 1X para ser luego incluidos en parafina según técnicas de rutina.

II- CULTIVOS PRIMARIOS.

Los cultivos primarios se realizaron utilizando tumores de entre 50 y 100 mm^2. Los tumores se extirparon en esterilidad disgregando primero en forma mecánica con tijera y luego en presencia de la solución enzimática, agitando a 37°C durante 40 minutos (min). La suspensión celular obtenida está compuesta principalmente por dos poblaciones, una de estirpe epitelial y otra de estirpe fibroblástica. Para separarlas se utilizó la técnica de Pandis y col. con algunas modificaciones (Pandis *et al.* 1992). Esta técnica se basa en que la velocidad de sedimentación de las células epiteliales que forman agregados celulares es mayor que la de los fibroblastos, permitiendo así su separación luego de varias decantaciones diferenciales. Se colocaron las células en un tubo de centrífuga junto con 15 ml de medio de lavado y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante (SN) y las células se resuspendieron en medio con 10% suero fetal bovino (SFB). La suspensión se dejó sedimentar durante 20 min; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados y del SN se obtiene la fracción fibroblástica. A la fracción enriquecida en células epiteliales se le agregó 15 ml de medio de lavado y se resuspendieron las células. Las decantaciones fueron repetidas cada 20 min descartándose el SN cada vez, hasta que no se detectasen más células aisladas en en *pellet* (aproximadamente 20 decantaciones). Este es el momento en que se considera que se han separado exitosamente las células epiteliales. Luego de la última decantación las células fueron resuspendidas en medio con 10% SFB y se sembraron en placas de cultivo (Figura 2-2).

Para la obtención de cultivos enriquecidos en células epiteliales, los agregados celulares se dejaron adherir durante 48 hs en SFB 10%, y luego se eliminó cuidadosamente el SN. Los cambios de medio se realizaron cada 48 hs, reemplazándolo por medio fresco con SFB 10%.

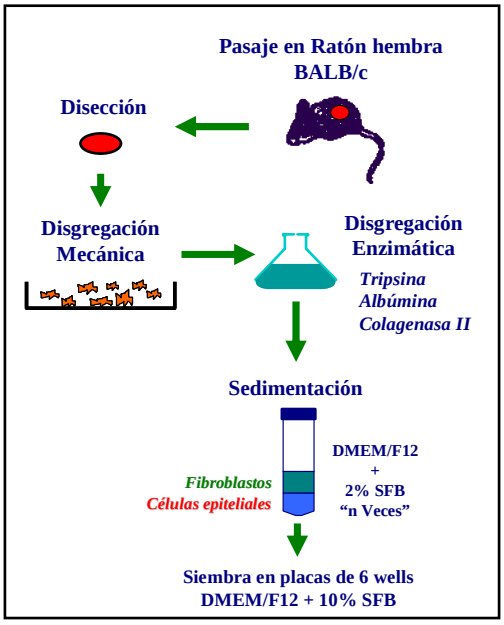


Figura 2-2. Representación esquemática de cultivo de tumores primarios (tomado de la tesis doctoral de Caroline Lamb).

Para la obtención de cultivos enriquecidos en fibroblastos asociados a carcinoma (CAFs), se tomó el SN de la primer decantación y se sembró en placas de 6 hoyos en 10% SFB. Luego de 90 min, se observaron las placas al microscopio y se verificó que los CAFs estuvieran pegados. Cabe destacar que las células epiteliales no son capaces de adherirse a las placas luego de este tiempo. Se realizó un cambio de medio, eliminando así las células epiteliales contaminantes, y se agregó medio fresco con 10% SFB. De esta forma solo crecen las células pegadas, CAFs. Los cambios de medio se realizaron cada 48 hs, reemplazándolo por medio fresco con 10% SFB.

REPIQUE DE CÉLULAS.

- Células epiteliales

Se lavaron las células con PBS estéril, y se incubaron durante 2-10 min a 37°C con la cantidad de tripsina necesaria como para cubrir el fondo de la placa. Una vez que las células se despegaron, se las pasó a un tubo conteniendo 10 ml de medio de cultivo con 10% SFB. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Luego, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con 10% SFB. Finalmente, se sembraron las células en las placas correspondientes.

- CAFs

Los cultivos se repicaron luego de alcanzar un 90% de confluencia. Se realizaron lavados con PBS estéril y utilizamos en este caso tripsina-EDTA en lugar de tripsina sola, para levantarlos más rápidamente.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR (INCORPORACIÓN DE ^{3}H-TIMIDINA).

- **Cultivos primarios de células epiteliales y CAFs**

Los cultivos enriquecidos en células epiteliales o fibroblásticas se subcultivaron en placas de 96 hoyos y se incubaron durante 24 hs en SFB 10%, para permitir la adhesión. Luego el medio se reemplazó por SBFch 1% durante 24 hs. Las células se incubaron durante 48 hs con las soluciones correspondientes, reemplazándose, a las 24 hs, el 50% del volumen de cada hoyo por medio de prueba fresco. Los ensayos se realizaron por octuplicado. Durante las últimas 18 hs de incubación se aplicó un pulso de 0,4 μCi de ^{3}H-timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) en cada hoyo. Luego los cultivos se tripsinizaron y cosecharon en un cosechador de células, y la radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo líquido beta durante 1 min.

Para los experimentos donde utilizamos el agente desmetilante 5azadC, las células epiteliales purificadas se sembraron directamente en placas de 96 hoyos en SFB 10%. Una vez pegadas las células se iniciaron los tratamientos correspondientes por 48 hs en SFB 10%. Esto se debe a que para que el 5azadC se incorpore las células deben estar dividiéndose.

- **Cocultivos de células epiteliales con CAFs**

Luego de levantar las células con tripsina, se realizó un recuento celular en cámara de Neubauer. Aproximadamente el mismo número (~2000) de células epiteliales y CAFs se sembraron solas o en las diferentes combinaciones en placas de 96 hoyos en SFB 10%. Luego de 24 hs el medio fue reemplazado por 1% SFBch. Los cultivos estuvieron durante 48 hs en estas condiciones, reemplazándose, a las 24 hs, el 50% del volumen de cada hoyo por medio 1% SFB depletado de hormonas (SFBch) fresco. Los ensayos se realizaron por octuplicado. Durante las últimas 18 hs de incubación se aplicó un pulso de 0,4 μCi de ^{3}H-timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) en cada

hoyo. Luego los cultivos se tripsinizaron y cosecharon en un cosechador de células, y la radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo líquido beta durante 1 min.

ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR (ENSAYO DE LA HERIDA).

Los cultivos enriquecidos en células epiteliales se sembraron en placas de petri en medio de cultivo con SFB 10%. Cuando las células alcanzaron un 80-90 % de confluencia aproximadamente se realizaron 3 heridas por placa con un tip de 200 µl esteril. Una vez realizadas las heridas, se cambió el medio de cultivo por medio fresco con el fin de lavar las células desprendidas. El medio de cultivo con SFB 10% se cambió todos los días por medio fresco.

HORMONAS, ANTIHORMONAS Y DROGAS UTILIZADAS *IN VITRO*.

- **MPA** (Sigma Aldrich)
- **RU 38486 o mifepristona** (Sigma Aldrich)
- **ZK 230211** (Bayer Schering Pharma AG)
- **17-β-estradiol** (Sigma Aldrich)
- **5 aza 2´deoxicitidina** (Sigma Aldrich)

III- EXTRACTOS TUMORALES Y CELULARES.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CITOSÓLICOS Y NUCLEARES DE MUESTRAS DE TUMOR, PARA ANALIZAR POR *WESTERN BLOT*.

Los tumores se pesaron y se agregó 4 veces su peso de *Buffer A* y los inhibidores de proteasas al 0,1%. Manteniéndolos constantemente en hielo, los tumores fueron homogeneizados en un politrón (Teckmar), hasta obtener los homogenatos que se dejaron reposar en hielo durante 40 min, para luego continuar con el siguiente esquema experimental (Figura 2-3) y obtener finalmente los extractos citosólicos y nucleares.

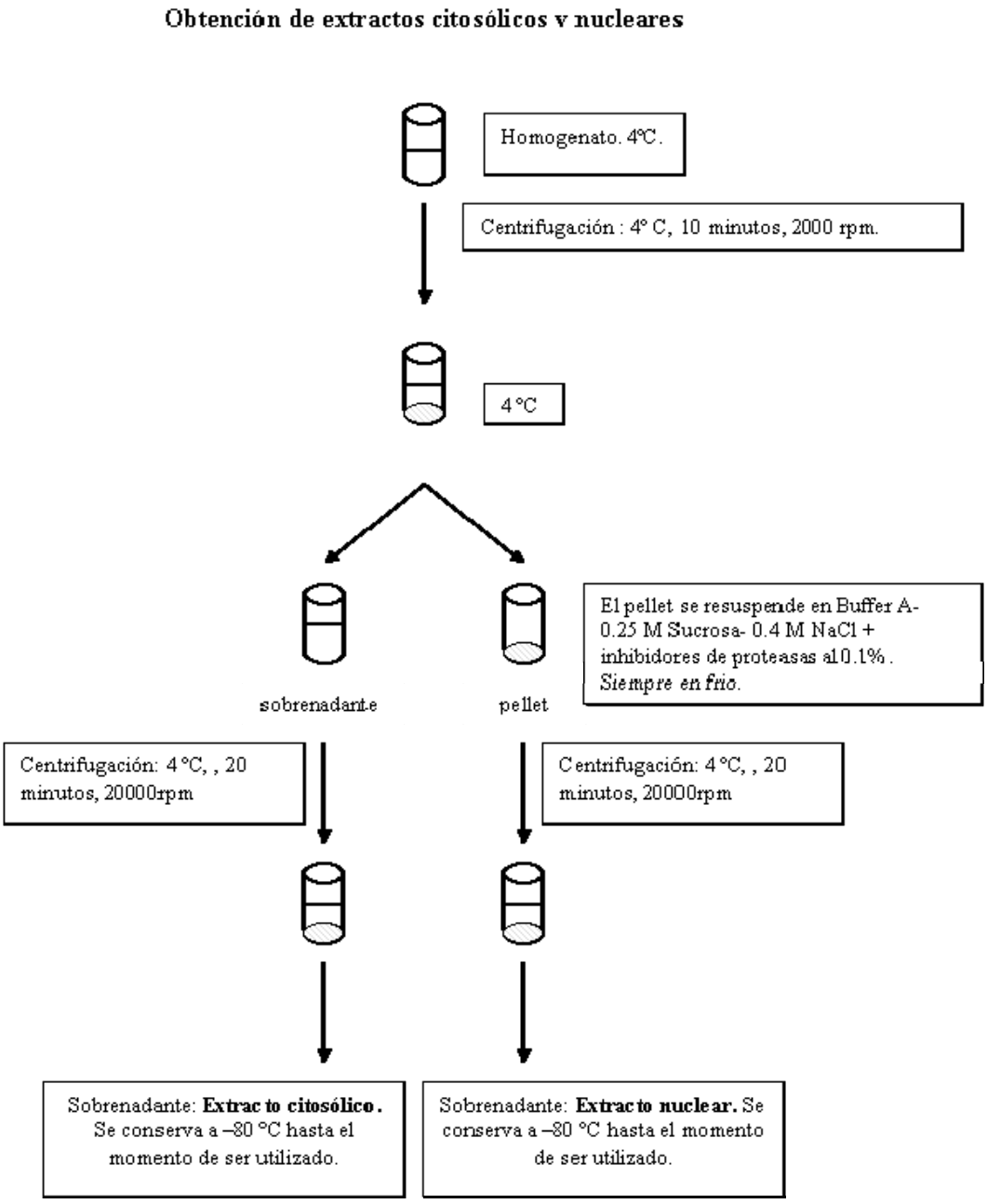


Figura 2-3. (Adaptado de (Helguero *et al.* 2003) La cantidad total de proteínas en estos extractos se cuantificó mediante la técnica de Lowry (*ver apéndice*).

EXTRACTOS CELULARES TOTALES.

Se realizaron a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HI, C4-HIR, C4-2-HI, 59-HI, 59-2-HI, 59-2-HIR. Los cultivos se lavaron con PBS frío, y las células fueron lisadas con el *buffer* comercial M-PER (*mammalian protein extraction reagent*, Thermo Scientific), mas inhibidores de proteasas, según recomendaciones del fabricante. Los extractos fueron inmediatamente congelados a -70°C hasta ser utilizados en ensayos de WB. Se estimó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES NUCLEARES Y CITOSÓLICOS.

Se realizaron a partir de cultivos primarios de células epiteliales C4-HI, C4-HIR, C4-2-HI, 59-HI, 59-2-HI, 59-2-HIR. Los cultivos se lavaron con PBS frío, y las células fueron recolectadas y centrifugadas a 3300 rpm por 10 min a 4ºC. El *pellet* de células se resuspendió en *buffer* TEDGS 10% en presencia de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF, 0,025 mM ZPCK, 0,0025 mM TLCK, 0,025 mM TPCK, 0,025 mM TAME) en hielo. El homogenato se volvió a centrifugar a 3300 rpm, 10 min., 4°C. Como resultado se obtuvo un sobrenadante que se volvió a centrifugar a 12000 rpm, 20 min, 4° y se guardó a -70°C. El sobrenadante contiene la fracción citosólica. Por otra parte, el *pellet* obtenido luego de centrifugar a 3300 rpm se resuspendió en *buffer* de lavado de núcleos (TEDG 10% + NP-40 0,01%) en presencia de inhibidores de proteasas. Luego de centrifugar a 3300 rpm por 10 min a 4ºC, el *pellet* conteniendo los núcleos celulares se resuspendieron en *buffer* TEDGS + 0,4 M KCl más inhibidores de proteasas, que permite la rotura de los núcleos. Se ayudó al disgregado del extracto utilizando una jeringa y se dejó extraer en hielo durante 30 min. Luego se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4ºC. El sobrenadante constituyó el extracto nuclear, y fue diluido 1:2 en TEDGS – 30% glicerol más inhibidores de proteasas, para reducir la concentración de sales. Se guardaron los extractos a -70ºC y se cuantificaron los niveles de proteínas por el método de Lowry.

IV- *WESTERN BLOT*.

Las muestras (50-100 μg de proteínas totales/calle) se separaron en un gel de poliacrilamida discontinuo usando el sistema de *buffers* discontinuos de *Laemmli* (Laemmli 1970). Se corrió un conjunto de marcadores de peso molecular en cada gel. Las proteínas se disolvieron en solución desnaturalizante (*cracking buffer*) y se

hirvieron durante 5 min. Se realizó la electroforesis durante 20-30 min a 20 mA/gel hasta que la muestra pasó el gel concentrador, y por 90-120 min a 25 mA/gel en el gel separador. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 100 V. Las membranas se bloquearon durante toda la noche en solución de bloqueo. Al terminar el bloqueo, las membranas se lavaron varias veces en PBST y luego se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 16 hs a 4°C en agitación. Luego de varios lavados en PBST, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa. Se revelaron las bandas inmunoreactivas con el sustrato quimioluminiscente, que al ser modificado por la peroxidasa del anticuerpo secundario, dá una señal quimioluminiscente. Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica. Los geles se cuantificaron utilizando el programa *ImageJ*. Sólo se cuantificó la intensidad de las bandas en los geles donde la proporción de intensidad se mantuvo lineal.

V- INMUNOHISTOQUÍMICA.

Los cortes se desparafinaron en Xilol durante 30 min y re-hidratados por pasajes sucesivos en alcoholes de concentración decreciente (10 min cada uno). Luego de lavar con agua destilada, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 10% en PBS 1X (*ver apéndice*) durante 20 min. A continuación se lavó con PBS 1X para luego bloquear con SFB al 10% en PBS 1X durante 1 hs a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalmente se incubaron los cortes histológicos con los anticuerpos primarios diluidos en SFB al 4% en PBS 1X durante toda la noche a 4ºC. Luego del lavado con el *buffer* salino, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en PBS 1X durante 1 hs a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las reacciones antígeno–anticuerpo fueron detectadas utilizando el Complejo Avidina Biotina (ABC kit Vectastain VECTOR). Se reveló con 3-3´diaminobencidina (DAB, Sigma) activada previamente con peróxido de hidrógeno. Esta reacción se detuvo sumergiendo los vidrios en agua destilada. Para contrastar la marca positiva se tiñeron los núcleos con hematoxilina (Biopur) y finalmente se deshidrataron los cortes pasándolos por alcoholes de graduación creciente (10 min cada uno) y xilol para finalmente montarlos en medio sintético (DPX). Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS 1X.

Los cortes se observaron por un microscopio óptico Nikon Eclipse E800. Las fotos se tomaron con una máquina digital Nikon asociada a este miscroscopio utilizando

el software ACT-2U. Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y en iguales condiciones.

VI- INMUNOFLUORESCENCIA.

Cortes de crióstato.

Los cortes histológicos (18 μm) se fijaron en formalina al 10% en PBS 1X durante 20 min a temperatura ambiente y se lavaron en PBS 1X (*ver apéndice*). A continuación se bloquearon (*ver apéndice*) en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 hs. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en SFB 4% en PBS 1X, durante toda la noche a 4º C. Los cortes fueron lavados con PBS 1X e incubados en oscuridad con el anticuerpo secundario fluoresceinado diluido en PBS 1X durante 1 hs a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de varios lavados con el *buffer* salino, se contrastaron los núcleos con Ioduro de Propidio (1/2000 de la solución madre, *ver apéndice*) durante 2 min, para finalmente montar los cortes con Vectashield (VECTOR) y sellar con esmalte. Las muestras fueron conservadas a –20 ºC. En este caso se utilizaron también anticuerpos mono y policlonales específicos, detallados en la Tabla 2-2. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS 1X.

Los cortes se observaron con un microscopio confocal Nikon Eclipse E800, y las correspondientes fotos fueron tomadas con el software EZ-C1 2.10. En todos los casos, al determinar la intensidad a la que se tomaron las fotografías, se restó el *background* ocasionado por el anticuerpo secundario.

Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y en iguales condiciones.

Cultivos primarios

Las IF se realizaron con células epiteliales en cultivo. Las mismas fueron crecidas hasta un 80% de confluencia en *chamber slides* (Lab-Tek, Nunc), y el día anterior a ser utilizadas se cambió el medio de crecimiento por medio con 1% SFBch. Las células se lavaron con PBS frío y fueron fijadas en etanol 70% a -20ºC. Se lavó luego con PBS y se bloqueó con 10% SFB en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se incubó con el primer anticuerpo diluido 1/100 en 4% SFB en PBS durante 16 hs a 4ºC. Se lavó con PBS y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario 1:100 en 4% SFB en PBS. Se tiñeron los núcleos con DAPI (1 μg/ml) o ioduro de propidio (IP, 1 μg/ml) durante 5 min, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs). Se observaron los preparados en un microscopio confocal Nikon.

En el caso de las IF para células tratadas con el agente desmetilante 5azadC, las mismas se mantuvieron en 10% SFB sólo (control) o con la correspondiente concentración del agente desmetilante, y luego se continuó con el mismo protocolo de fijación e inmunofluorescencia.

VII- PCR ESPECÍFICA PARA METILACIÓN (MSP).

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TUMORES.

Se colocaron los tumores en nitrógeno líquido y se trituraron con mortero enfriado previamente. El polvo obtenido se resuspendió en *buffer* de digestión (1,2 ml x c/100mg). Las muestras se incubaron ON a 50ºC. Luego se centrifugaron 15 min a 12000 rpm. Se conservó el sobrenadante. Se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamilico (25:24:1)

Digestión

Las muestras se incubaron a 50ºC ON. Luego se las centrifugó durante 15 min a 120000 rpm conservando el sobrenadante. Se agregó 1volumen de fenol-cloroformo-isoamilico (25:24:1; comúnmente no más de 200 µl) y se mezclaron los tubos por inversiones, dejándolos reposar luego por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregó ½ volumen de acetato de amonio 7,5 M y 1 volumen de isopropanol. Se dejaron reposar los tubos a -20ºC durante 30 min. A continuación las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante unos 15 min y se descartó el sobrenadante. Se lavaron los *pellet* con etanol al 70%, dejándolos secar luego a temperatura ambiente (mínimo 30 min). Para finalizar se resuspendieron los *pellets* en un volumen de 50 a 100 µl de agua molecular.

PCR ESPECÍFICA PARA METILACIÓN.

ADN genómico (1 µg) de cada muestra a analizar se desnaturalizó por la adición de NaOH 0,3 M e incubación a 42ºC durante 30 min. A continuación el ADN se trató con bisulfito de sodio 3,3 M e hidroquinona 0,49 mM y se incubó la muestra a 55ºC durante 16 hs en agitación. Finalmente el ADN modificado se purificó utilizando el kit de *Wizard DNA purification resin* (Promega, MAdiso, WI).

Para la reacción de PCR se utilizaron 150 ng del ADN modificado con bisulfito de sodio. La reacción de PCR fue realizada con los siguientes reactivos: PCR *buffer* 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 200 µM, 0,2 µM de cada uno de los *primers* y 1 unidad de Taq Platinum Polymerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para amplificar los sitios CpG metilados y no metilados se utilizaron los *primers* detallados en la Tabla 2-1. Estos *primers* fueron diseñados utilizando el *software* Methyl Primer Express Software 1.0

(Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando la secuencia del promotor y primer exon del RP (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/index.html; Hagihara *et al.* 1994).

La reacción de PCR fue realizada con un paso de desnaturalización inicial a 94ºC durante 5 min, continuado por 35 ciclos de 45 segundos a 94ºC, luego la temperatura de *annealing* por 45 segs, un paso de extensión de 45 segs a 45ºC y un final paso de extensión de 10 min a 72ºC. La temperatura de *annealing* para los *primers* M y UM se detallan en la Tabla 2-1.

ADN normal de linfocitos de ratón supermetilado con la enzma *Sss*I metiltransferasa (New England Biolabs, Beverly, MA) y modificado a continuación con bisulfito de sodio como se explicó previamente, fue utilizado como control de ADN metilado con todos los primers. ADN normal de linfocitos de ratón tratado solo con bisulfito de sodio fue utilizado como control de ADN no metilado.

Se sembraron 20 µl del producto de PCR en geles de agarosa del 2%.

Primers	**Secuencia**	**Temp. de *annealing***
PR1 F M	5' GGGCGGGTTTTTTTAGAGC 3'	57 ºC
PR1 R M	5' CTCGTTCTCCTACAACGACA 3'	58 ºC
PR1 F UM	5' TTTTGGGTGGGTTTTTTTAGAGT 3'	58 ºC
PR1 R UM	5' TACTCATTCTCCTACAACAACAA 3'	58 ºC
PR2 F M	5' ATTTTATCGTTATCGGGATAGCGC 3'	62 ºC
PR2 R M	5' ATAAATATAAAATCGCAAAACCCG 3'	57 ºC
PR2 F UM	5' TATTTTATTGTTATTGGGATAGTGT 3'	56 ºC
PR2 R UM	5' AATAAATATAAAATCACAAAACCCA 3'	54 ºC
PR3 F M	5' GAAGAAATACGAAAAAAAGTTTTTC 3'	56 ºC
PR3 R M	5' ATAAATATAAAATCGCAAAACCCG 3'	57 ºC
PR3 F UM	5' AGAAGAAATATGAAAAAAAGTTTTTT 3'	54 ºC
PR3 R UM	5' AATAAATATAAAATCACAAAACCCA 3'	54 ºC
PR4 F M	5' GTTTTTTATACGTTTGGCGTTTC 3'	58 ºC
PR4 R M	5' CACGTCGAACAACGACTACT 3'	58 ºC
PR4 F UM	5' AGGTTTTTTATATGTTTGGTGTTTT 3'	56 ºC
PR4 R UM	5' CTCCACATCAAACAACAACTACT 3'	59 ºC

Tabla 2-1. ***Primers* específicos para amplificar los sitios CpG metilados (M) y no metilados (UM) en el promotor y primer exón de RPA. F: *forward*; R: *reverse.***

CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.

Se clonaron los productos de PCR obtenidos de todas las muestras con el par de *primers* PR4 M y UM con el kit pCR2.1- TOPO (Invitrogen). Los plásmidos se transfectaron en bacterias competentes E.coli TOP10. Estas bacterias se plaquearon en placas de petri conteniendo LB agar con ampicilina (100 µg/ml) y 40 µl de X-gal (40 mg/ml). Las colonias transfectadas se visualizaron de color blanco. Aproximadamente 20 colonias de cada producto fueron evaluadas por PCR para colonia para asegurarnos que las mismas realmente contuviesen el producto de PCR, y 10 colonias positivas se repicaron, sembradas en criotubos conteniendo LB agar con ampicilina (100 µg/ml) y enviadas a Macrogen Inc, Korea, donde aislaron los plásmidos y llevaron a cabo la secuenciación de los fragmentos. Para analizar los resultados de las secuencias se utilizó el software EMBLE-EBI (http://www.ebi.ac.uk).

VIII- ANALISIS ESTADÍSTICO.

En los experimentos de proliferación celular y recuento de células, las diferencias entre concentraciones de un único tratamiento y el control se compararon usando ANOVA y *test* de *Tukey* para comparar grupos entre sí. Las diferencias entre medias de dos tratamientos se evaluaron con una prueba *"t"* de *Student*, utilizando el programa *GraphPad Prism* (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc.).

En las curvas de regresión tumoral se calcularon las pendientes de las mismas y se analizó si diferían significativamente entre sí, con el programa *GraphPad Prism* (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc.).

En los ensayos de WB, la intensidad de las bandas se cuantificó usando el software *Image J* (1.345 NIH).

En las H&E de tumores, el estroma se cuantificó usando el software *Image J* (1.345 NIH).

IX- ANTICUERPOS UTILIZADOS.

A continuación se detallan todos los anticuerpos primarios utilizados. Para *western blot* todos los anticuerpos primarios fueron incubados en PBS-T con leche al 5%. La concentración de los Ac utilizados para *western blot* se detalla en la Tabla 2-2. Para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, todos los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron 1/100 en SFB 10% en PBS 1X.

Ac 1º	Dilución WB	Característica	Ac 2º
RP -C19	1/500	Policlonal .Santa Cruz Biotech. SC-538	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)
RP -Ab6	1/500	Monoclonal Neomarkers. hPRa6-MS-196-P	Anti-ratón. VECTOR (In) Amersham (WB)
RP -Ab7	1/500	Monoclonal Neomarkers. hPRa7 MS-197-P	Anti-ratón. VECTOR (In) Amersham (WB)
REα -MC20	1/500	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-542	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)
PTEN	1/1000	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-7974	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)
Akt total	1/1000	Policlonal Abcam Ab-32199	Anti-rconejo Amersham (WB)
p-Akt	1/1000	Policlonal Cell Signaling 9271	Anti-rconejo Amersham (WB)
Dnmt 1	1/500	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-20701	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)
Dnmt 3a	1/500	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC- 20703	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)

Dnmt 3b	1/500	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC- 20704	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)
RARβ	1/500	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-14028	Anti-conejo. Amersham (WB)
p16	1/500	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-1207	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)
Rb	1/500	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-50	Anti-conejo. VECTOR (In) Amersham (WB)
p-ERK1/2	1/1000	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-7383	Anti- conejo Amersham (WB)
ERK ½	1/2000	Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-94	Anti- conejo Amersham (WB)
E-caderina	1/2000	Policlonal BD transduction lab. 610182	Anti-rconejo Amersham (WB)
Actina	1/500	Policlonal Neomarkers. SC-1616-r	Anti- conejo Amersham (WB)
MMP9		Policlonal Santa Cruz Biotech. SC-6840	Anti- Goat VECTOR (In)

Tabla 2-2. Anticuerpos utilizados para *western blot* (WB), Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia (In). Se detallan las diluciones y características de cada anticuerpo.

RESULTADOS

PARTE I

OBTENCIÓN DE VARIANTES CON RESISTENCIA ADQUIRIDA

Dentro del modelo de carcinomas mamarios inducidos por MPA, a partir de tumores hormono-dependientes (HD) se habían desarrollado espontáneamente diversas variantes hormono-independientes (HI). Algunas de ellas, resultaron sensibles a la terapia con antiprogestágenos (C4-HI, 59-2-HI, 32-2-HI y C7-2-HI), mientras que otras mostraron resistencia constitutiva (C4-2-HI, 59-HI, 32-HI y C7-HI) a dicho tratamiento.

Con el objetivo de generar diferentes variantes tumorales con resistencia adquirida a los antiprogestágenos, tratamos a los tumores HI sensibles a los antiprogestágenos con RU-486, durante el tiempo necesario para generar, por presión selectiva, sus respectivas variantes resistentes:

- **Familia tumoral C4.**

A partir de los tumores C4-HI, se generó por presión selectiva, la variante resistente al RU-486 (C4-HIR). Los ratones portadores de tumores C4-HI se trataron con el antiprogestágeno (*pellet* de 6 mg) durante un mes. Durante los primeros 15 días de tratamiento mostraron un patrón de regresión típico del tumor C4-HI, hasta que uno de los tumores dejó de responder. Este tumor fue transplantado a ratones tratados con el antiprogestágeno, generándose así la variante resistente denominada C4-HIR. La misma fue mantenida por pasajes singeneicos, realizados cada 30 días, en ratones hembras vírgenes BALB/c de dos meses de edad a las que se les administró el RU-486 cada vez que el tumor alcanzara un tamaño de 25 mm^2 aproximadamente.

Asimismo, uno de los objetivos de mi tesina de Licenciatura había sido investigar si la resistencia era reversible. Efectivamente, a partir de la variante C4-HIR, logramos revertir la resistencia luego de 7 pasajes consecutivos en ausencia del antiprogestágeno, obteniendo la variante C4-HIR revertante (C4-HIRev). Finalmente, por presión selectiva de los tumores C4-HIRev con el antiprogestágeno RU-486, se obtuvieron las nuevas variantes con resistencia adquirida C4-HIRR.

Además, en la familia de tumores C4, contamos con la variante con resistencia constitutiva al tratamiento con antiprogestágenos (C4-2-HI), que se generó espontáneamente a partir de tumores C4-HD.

En la Figura 3-1, se muestra en forma esquemática cómo se obtuvo cada variante tumoral de la familia C4 utilizada en este trabajo de tesis.

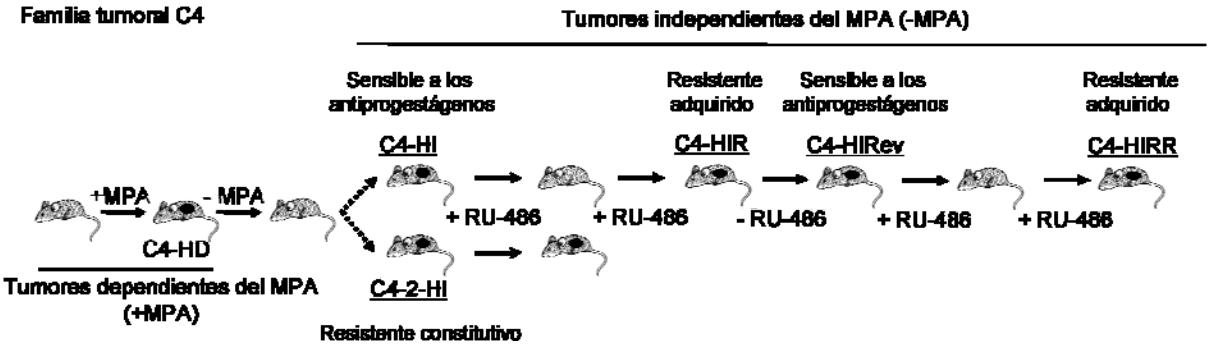


Figura 3-1. Esquema que muestra las distintas variantes de la familia C4.

- **Familia tumoral 59.**

A partir de los tumores 59-2-HI, se generó por presión selectiva la variante resistente al antiprogestágeno 59-2-HIR. Los ratones portadores de los tumores HI fueron tratados con RU-486 (*pellets* de 6 mg; sc) durante dos meses. Durante los primeros 30 días de tratamiento mostraron un patrón de regresión característico del tumor (Vanzulli *et al.* 2002), hasta que uno de los tumores dejó de responder al RU-486. Este tumor se transplantó a ratones tratados con la antihormona, generándose así la variante resistente al RU-486. Dicha variante se mantuvo por pasajes singeneicos realizados cada 30 días, en ratones hembras vírgenes de dos meses de edad a las que se les administró el RU-486 cada vez que el tumor alcanzara un tamaño de 25 mm^2 aproximadamente.

Asimismo en la familia 59, contamos con la variante con resistencia constitutiva al RU-486 (59-HI), que se generó espontáneamente a partir de tumores 59-HD. En la Figura 3-2, se muestra en forma esquemática cómo se obtuvo cada variante tumoral de la familia 59 utilizada en este trabajo de tesis.

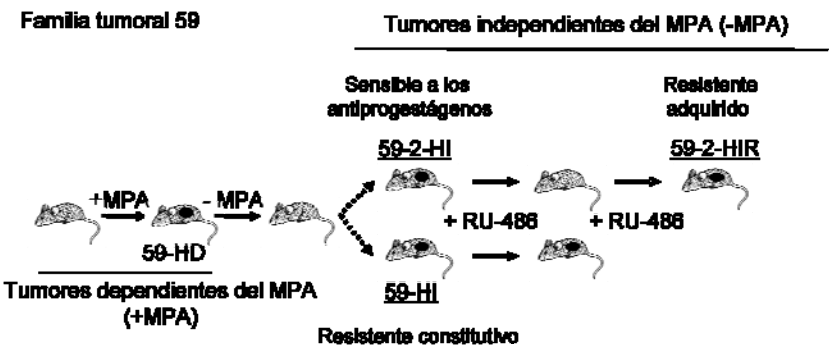


Figura 3-2. Esquema que muestra las distintas variantes de la familia 59.

- **Familia tumoral C7.**

A partir de los tumores C7-HD se había originado la variante C7-HI, que si bien en un principio era respondedora a antiprogestágenos, en forma espontánea y sin presión selectiva, evolucionó hacia una resistencia constitutiva. Por lo tanto cuando se descongeló un pasaje temprano, a este tumor se lo denominó C7-2-HI para no confundirlo con el que ya circulaba como resistente constitutivo. En este trabajo de tesis generamos por presión selectiva la variante tumoral resistente al antiprogestágeno C7-2-HIR. Los ratones portadores de los tumores C7-2-HI fueron tratados durante 4 meses aproximadamente con *pellets* de RU-486 de 6 mg que se renovaron mensualmente. Durante los primeros 3 meses de tratamiento, los tumores mostraron un patrón de regresión característico, hasta que uno de ellos dejó de responder al antiprogestágeno. Este tumor se transplantó en ratones tratados con la antihormona, generándose así la variante resistente al RU-486. Dicha variante se mantuvo por pasajes singeneicos, realizados cada 90 días, en ratones hembras vírgenes BALB/c de dos meses de edad a las que se les administró el RU-486 cada vez que el tumor alcanzara un tamaño de 25 mm^2 aproximadamente. A diferencia de lo ocurrido en las familias tumorales C4 y 59, la obtención de una variante tumoral estable con resistencia adquirida en esta familia, llevó 1 año y medio aproximadamente. En la Figura 3-3, se muestra en forma esquemática cómo se obtuvo cada variante tumoral de la familia C7 utilizada en este trabajo de tesis.

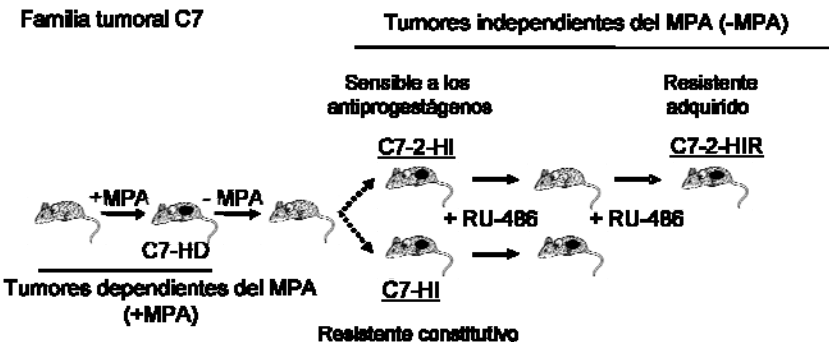


Figura 3-3. Esquema que muestra las distintas variantes de la familia C7.

- **Familia tumoral 32.**

A partir de los tumores 32-2-HI, de la misma manera que en los casos anteriores, se generó por presión selectiva la variante resistente al antiprogestágeno 32-2-HIR. Durante los primeros 30 días de tratamiento, los tumores mostraron un patrón de regresión característico, hasta que uno de ellos dejó de responder al RU-486. Este tumor fue transplantado en ratones tratados con el antiprogestágeno, generándose así la variante resistente. Dicha variante, fue mantenida por pasajes singeneicos, realizados cada 30 días, en ratones hembras vírgenes BALB/c de dos meses de edad a las que se les administró el RU-486 cada vez que el tumor alcanzara un tamaño de 25 mm^2 aproximadamente.

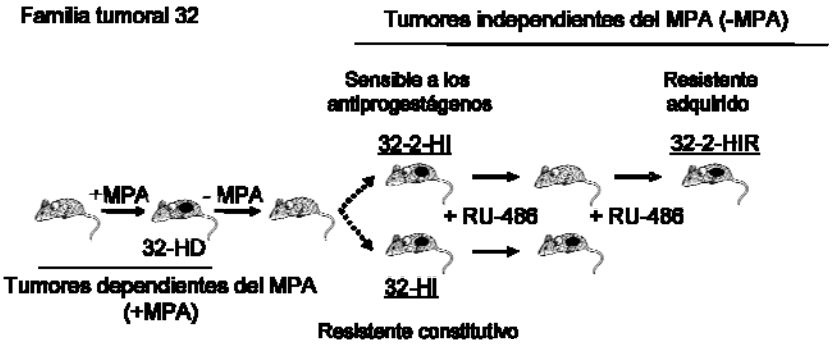


Figura 3-4. Esquema que muestra las distintas variantes de la familia 32.

De las 4 familias estudiadas, los únicos tumores que mostraron una regresión completa son los 32-2-HI. Esto nos motivó a elegir dicha variante para investigar la posibilidad de obtener una remisión completa del tumor con el RU-486, sin recaídas, y evaluar asimismo la posible toxicidad del tratamiento a largo plazo.

Seguimiento de ratones portadores de tumores 32-2-HI durante un año de tratamiento con el antiprogestágeno RU-486.

En un experimento preliminar, realizado con 2 ratones, los tumores regresionaron completamente con el RU-486 administrado en forma de *pellet* de 6 mg, y renovados cada mes. De esta manera, los ratones permanecieron libres de tumor durante un año (no se muestra). En el segundo experimento, que se muestra en la Figura 3-5, utilizamos 12 ratones. Todos fueron tratados con el RU-486 (*pellet* de 6 mg) hasta presentar completa regresión tumoral. Luego de 2 meses de tratamiento, sólo 6 ratones continuaron recibiendo la terapia (*pellets* 6 mg renovados cada mes), mientras que los otros 6 no. Este procedimiento se llevó a cabo para estudiar si había recurrencia de la enfermedad. Transcurridos 275 días, los ratones que no estaban tratados seguían libres de tumor y se sacrificaron. Los ratones que recibían la terapia fueron sacrificados al día 365 estando también libres de tumor (Figura 3-5). En ambos casos se realizaron autopsias completas de los animales para confirmar que los mismos estaban libres de enfermedad (tumores de mama y metástasis), y para estudiar el estado de los órganos después de tan prolongada exposición al RU-486. Como control, se autopsiaron 3 hembras BALB/c vírgenes de un año de edad. No se observaron signos de toxicidad en los órganos estudiados (bazo, hígado, riñón y pulmón). Luego, nos interesó estudiar el efecto del RU-486 a largo plazo en las glándulas mamarias, para ello decidimos, comparar las glándulas mamarias de ratones tratados durante un año con el antiprogestágeno y las glándulas mamarias de hembras vírgenes de un año de edad no tratadas (controles). En la Figura 3-6, se muestran cortes histológicos de la mama número 4 de ratones tratados y no tratados con RU-486. En las hembras vírgenes de un año de edad observamos mamas con características de hembras añosas que no atravesaron las etapas de gestación y lactancia, formadas por abundante tejido fibro-adiposo con escaso componente epitelial. El árbol mamario esta constituido por conductos y unidades ductulares predominantemente, y mínimas a ausentes estructuras lóbulo-alveolares. En la mayoría de las hembras tratadas durante un año con RU-486 no

observamos grandes diferencias con respecto a las no tratadas. La relación estroma – parénquima epitelial es similar. Al igual que en las hembras control, se observa fibrosis periductal propia del envejecimiento. Los conductos están tapizados por células epiteliales de mayor diámetro con más citoplasma y con una disposición de mayor ordenamiento celular. Esto parecería indicar que existe en estas glándulas mamarias mayor actividad celular. Se observan además infiltrados linfocitarios no focalizados lo que indicaría que no se trata de un área secuelar de regresión tumoral, aunque no podemos descartar que no sean producto de la respuesta inmune frente al tumor que fue inicialmente implantado. El patrón de involución en estas mamas no es tan claro como en las mamas de las hembras vírgenes no tratadas. Esto podría deberse a la presencia de linfocitos que secretan quemoquinas capaces de generar un microambiente más estimulado.

Finalemente, podemos decir que no se observaron signos de diseminación metastásica en los demás órganos estudiados.

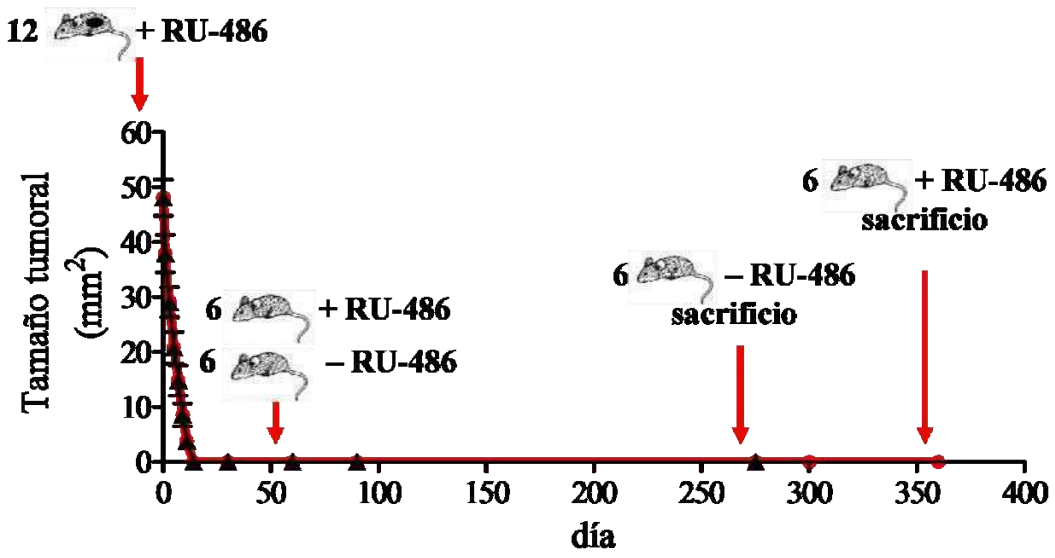


Figura 3-5. Efecto del RU-486 a largo plazo. Se trataron 12 hembras BALB/c portadoras de un tumor 32-2-HI creciendo sc con RU-486 (*pellet* de 6 mg) durante 2 meses. Luego 6 hembras continuaron con el tratamiento hasta el día 365, renovando los *pellet*s cada mes, y 6 hembras sin tratamiento fueron sacrificadas al día 275. Los 12 ratones permanecieron libres de enfermedad hasta el día del sacrificio.

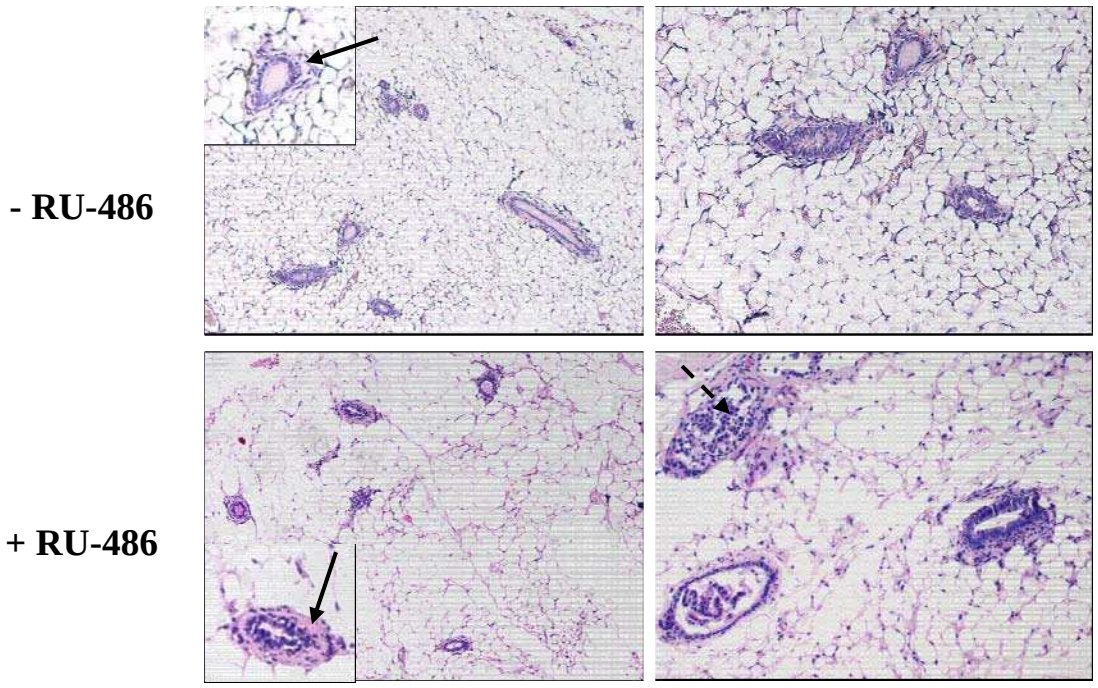


Figura 3-6. Glándulas mamarias de hembras vírgenes BALB/c de un año de edad (arriba) vs. glándulas mamarias de hembras vírgenes BALB/c tratadas con RU-486 (*pellet* 6 mg) durante un año en las cuales el tumor regresionó (abajo). Las glándulas mamarias de las hembras vírgenes de un año de edad presentan características de hembras añosas que no atravesaron las etapas de gestación y lactancia. Las glándulas mamarias de las hembras tratadas con el antiprogestágeno durante un año (*pellet* 6 mg) presentan características similares. En ambos casos se observa fibrosis periductal (⟶) y en las tratadas infiltrados linfocitarios (- - - ▸) izq. 100 X; der 200 X.

PARTE II

VALIDACIÓN DE LOS EFECTOS DEL RU-486 CON EL ANTIPROGESTAGENO ZK 230211 *IN VIVO.*

Utilizamos el ZK 230211 para investigar si los tumores con resistencia adquirida al RU-486 eran también resistentes a otro antiprogestágeno con un mecanismo de acción diferente. Para ello tratamos los tumores C4-HI y C4-HIR con los dos antiprogestágenos, utilizando en ambos casos una dosis de 12 mg/kg/día. Como se muestra en la Figura 3-7, obtuvimos el mismo grado de inhibición del crecimiento tumoral en la variante sensible C4-HI, e igual grado de resistencia a ambos antiprogestágenos en la variante con resistencia adquirida C4-HIR.

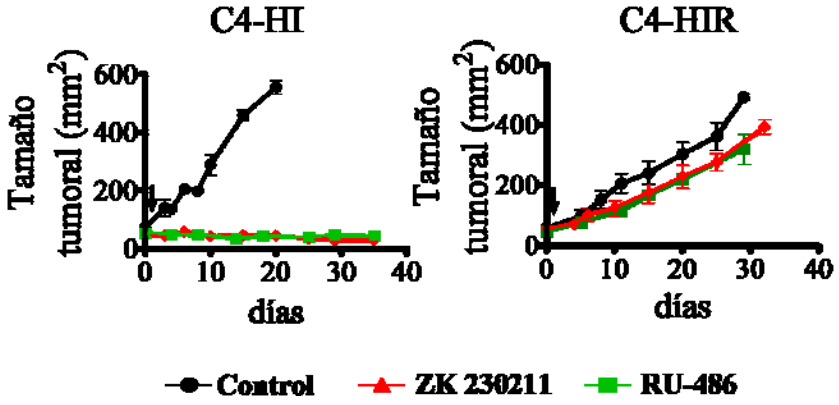
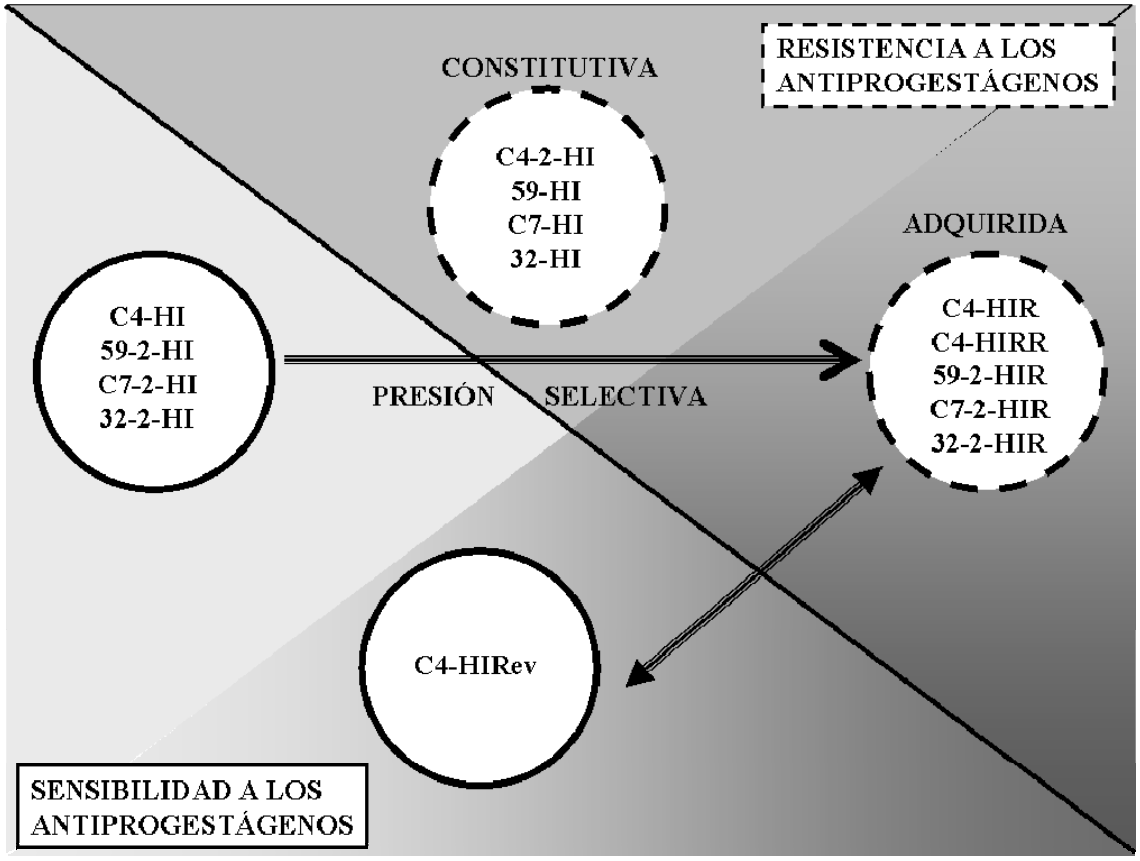


Figura 3-7. El RU-486 y el ZK 230211 tienen efectos similares en los tumores sensibles C4-HI y en los resistentes adquiridos C4-HIR. Los tumores C4-HI y los C4-HIR mostraron una respuesta similar a ambos antiprogestágenos. Se transplantaron los tumores en forma sc y cuando alcanzaron un tamaño de 50 mm^2 se comenzaron los tratamientos (⟶) con vehículo, RU-486 o ZK 230211. Ambos antiprogestágenos fueron administrados diariamente con una dosis de 12 mg/kg/día. Se midieron con calibre y el área tumoral fue graficada, considerando día 0 el día que se comenzaron los tratamientos.

Resumiendo, hemos generado 4 variantes con resistencia adquirida al RU-486. Dichas variantes provienen de diferentes tumores. Por lo tanto, si bien el *background* genético en las 4 es el mismo por tratarse de animales endocriados, los tumores son diferentes por lo que resulta una herramienta interesante para el estudio de los mecanismos de adquisición de hormono-resistencia. Hemos demostrado además, que estos tumores muestran resistencia a su vez a otro antiprogestágeno diferente (ZK 230211). Asimismo, demostramos que en algunos tumores es posible obtener remisiones completas aún después de haber suspendido el tratamiento con antiprogestágenos por más de 200 días. La falta de toxicidad encontrada en ratones tratados durante un año con el RU-486 nos indica su potencial como droga antineoplásica.



PARTE III

CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES TUMORALES SENSIBLES Y RESISTENTES AL RU-486.

EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES.

Resultados previos de nuestro laboratorio sugerían un cambio en el perfil de expresión de isoformas del RP en los tumores resistentes al RU-486, respecto a los sensibles a dicho tratamiento. El objetivo de estos experimentos fue estudiar el perfil de expresión de isoformas del RP en todas las variantes tumorales con resistencia adquirida o constitutiva al RU-486 comparándolas siempre con las sensibles. En principio, los experimentos se realizaron en las familias C4 y 59, y sólo datos seleccionados serán validados en las nuevas variantes resistentes de las familias C7 y 32.

Con el objetivo de estudiar si existe un patrón de expresión en las isoformas del RP, que diferencie a las variantes tumorales sensibles al RU-486 de las resistentes, analizamos por IF y *western blot* los niveles de expresión de RPA y RPB. Observamos que en las variantes sensibles a los antiprogestágenos de la familia C4 (C4-HI, y C4-HIRev) , 59 (59-2-HI) y 32 (32-2-HI) los niveles de expresión de RPA son mayores o iguales que los de RPB, mientras que en las 2 variantes resistentes constitutivas C4-2-HI, 59-HI y en las resistentes adquiridas de las tres familias (C4-HIR, 59-2-HIR, C4-HIRR, 32-2-HIR), los niveles de RPB son mayores que los de RPA como se muestra en los resultados que se describen a continuación.

En la Figura 3-8, se muestran imágenes representativas de cortes de tejido tumoral obtenidos por crióstato. En verde se observa la marcación nuclear del RPA por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo (Ac.) C-19. En los tumores C4-HI y C4-HIRev., ambos sensibles a antiprogestágenos, la marcación resultó mayor ($p<0,001$) que en el tumor resistente C4-HIR.

En la Figura 3-9a, se muestran las curvas de crecimiento representativas de los tumores de la familia C4 creciendo en animales tratados con RU-486 (*pellet* 6 mg s.c.) o en los controles. En la Figura 3-9b, se muestra un *western blot* con el Ac. C19 para RP y el MC20 para REα comparando las 5 variantes tumorales de la familia C4. Se cuantificaron las bandas correspondientes a RPA y RPB y se calculó la relación RPA/RPB. Las dos variantes sensibles, C4-HI y C4-HIRev, presentaron una relación RPA/RPB>1, mientras que las resistentes C4-2-HI, C4-HIR y C4-HIRR mostraron una proporción RPA/RPB<1 ($p<0,001$). La expresión de REα siguió el mismo patrón que RPA en los tumores C4-HI, C4-HIR y C4-HIRev, pero no en los C4-HIRR, donde pese a que se observan muy bajos niveles de expresión de RPA, se detecta REα.

En la Figura 3-10, observamos que estos resultados se reproducen en la familia 59, donde los tumores resistentes 59-HI (resistente constitutivo) y 59-2-HIR (resistente adquirido) expresan mayores niveles de RPB que de RPA. Al igual que en la familia C4, el REα sigue el mismo patrón de expresión que RPA.

En las Figuras 3-11 y 3-12, observamos las curvas de crecimiento tumoral de las variantes con resistencia adquirida, obtenidas recientemente, la C7-2-HIR y 32-2-HIR. En la variante 32-2-HIR el patrón de isoformas observado por *western blot* es similar al del resto de los tumores resistentes, predominando la expresión de RPB. A diferencia de los tumores con resistencia adquirida C4-HIR y 59-2-HIR, los niveles de REα resultaron mayores que en la variante sensible 32-2-HI ($p<0,001$; Figura 3-12).

Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que son aquellos tumores que expresan mayor RPA los que responden a la terapia con antiprogestágenos.

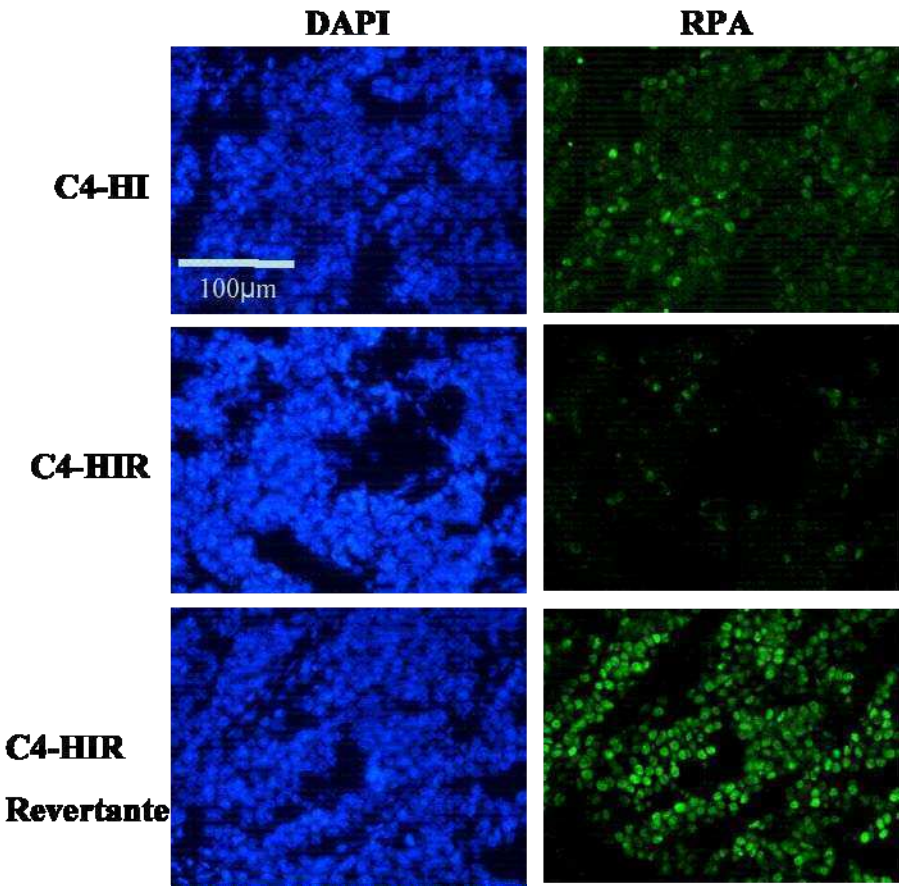


Figura 3-8. Los tumores C4-HI y C4-HIRev, sensibles al RU-486, expresan mayores niveles de RPA que los resistentes adquiridos C4-HIR. IF en cortes de crióstato utilizando el Ac. específico para RPA (C19) en los tumores sensibles C4-HI, resistentes C4-HIR y los revertantes C4-HIRev. Verde: RPA (FITC). Azul: núcleos teñidos con DAPI.

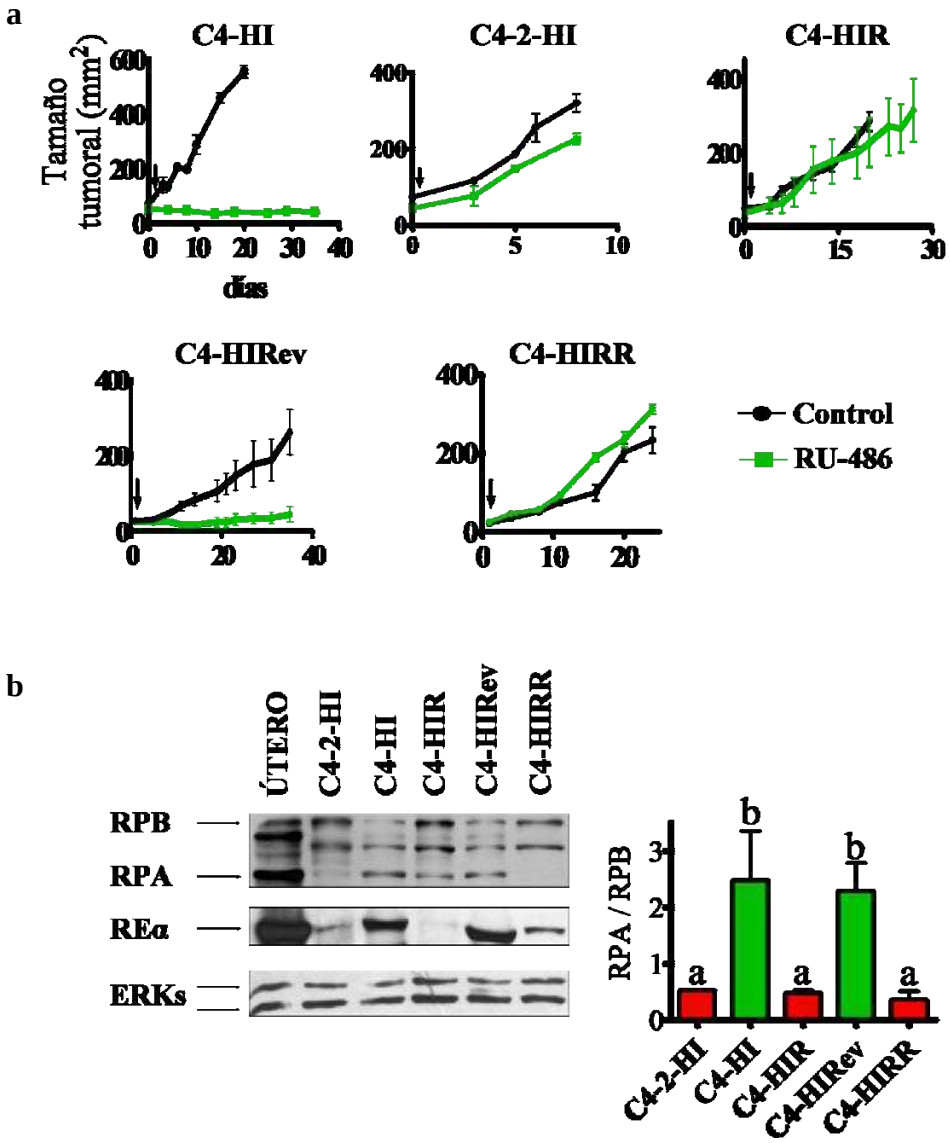
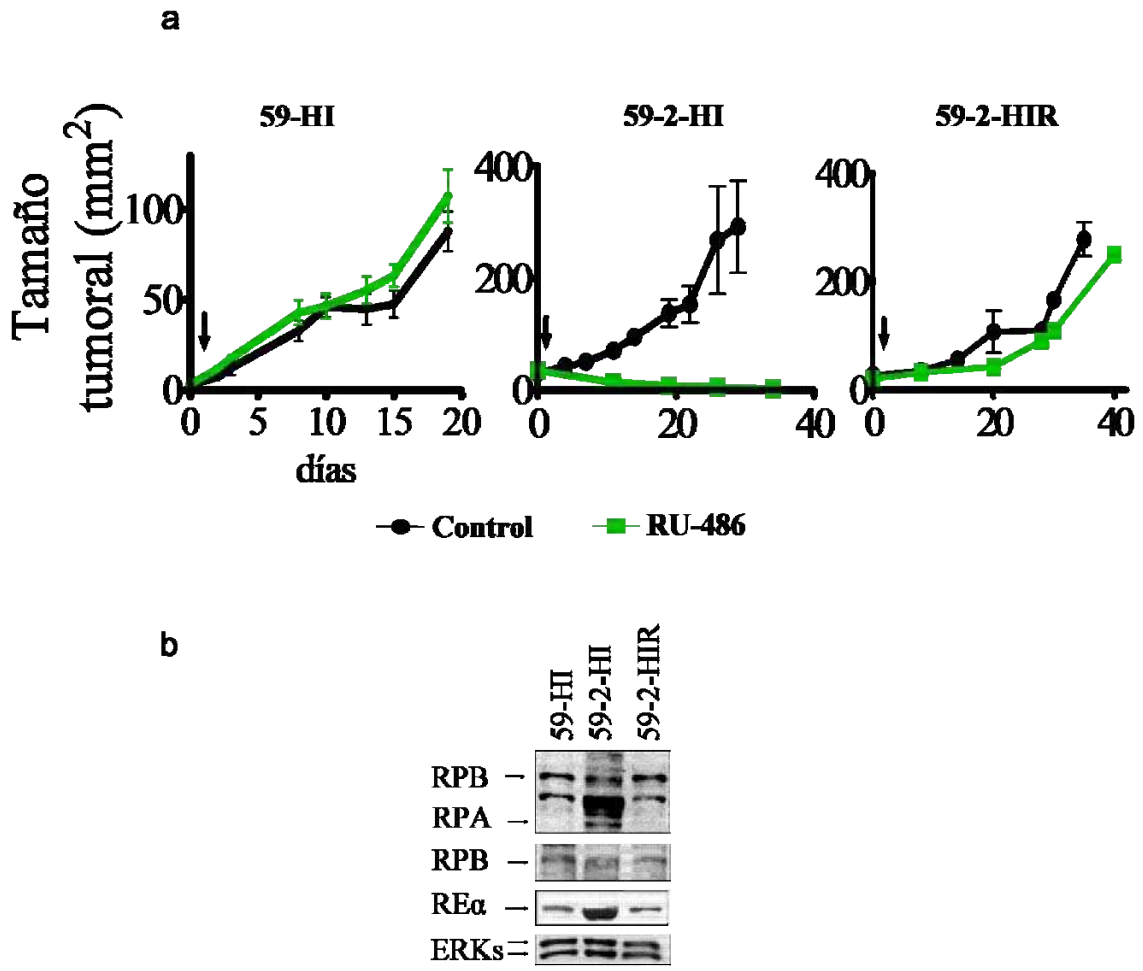


Figura 3-9. Los carcinomas mamarios de la familia tumoral C4 resistentes al RU-486 expresan mayores niveles de RPB que de RPA. a) Curvas de crecimiento tumoral representativas de las variantes sensibles (C4-HI y C4-HIRev), resistente constitutivo (C4-2-HI) y resistentes adquiridos (C4-HIR y C4-HIRR) a antiprogestágenos. Se transplantaron los tumores en forma sc y cuando alcanzaron un tamaño de 50 mm^2 se comenzaron los tratamientos (⟶) con vehículo o RU-486. **b)** Analizamos por *western blot* con el Ac. C19, la expresión del RP, y con el Ac. MC20 la expresión del REα en extractos nucleares obtenidos de cada variante tumoral crecida sin tratamiento hormonal. Las bandas correspondientes a RPA (83 kDa) y RPB (115 kDa) fueron cuantificadas y se calculó la relación RPA/RPB. Las dos variantes sensibles (verde) muestran una relación RPA/RPB >1 mientras que los tres tumores resistentes (rojo) muestran RPA/RPB<1; a *vs*. b $p<0,001$. Como control de carga se utilizaron las ERKs. En los mismos extractos se evaluó también por *western blot* la expresión de REα. Se muestra un *western blot* representativo de cuatro.



<u>Figura 3-10</u>. Los tumores resistentes de la familia tumoral 59 expresan mayores niveles de RPB que de RPA. a) Curvas de crecimiento tumoral representativas de las variantes tumorales sensibles (59-2-HI), resistente constitutiva (59-HI) y resistente adquirida (59-2-HIR) al antiprogestágeno RU-486. Se transplantaron los tumores en forma s.c. y cuando alcanzaron un tamaño de 50 mm^2 se comenzaron los tratamientos (⟶) con vehículo o RU-486 **b)** Analizamos por *western blot* con el Ac. C19 la expresión del RP y con el Ac. MC20 la expresión del REα en extractos nucleares obtenidos de cada variante tumoral sin tratamiento hormonal. La variante sensible 59-2-HI expresa mayores niveles de RPA que de RPB mientras en las dos variantes resistentes 59-HI y 59-2-HIR se observa lo contrario. Como control de carga se utilizaron las ERKs. En este caso no se cuantificaron las bandas, dada la ausencia casi total de PRA en los tumores resistentes. Los mismos extractos se usaron para investigar la expresión de REα, observándose un patrón similar al de RPA.

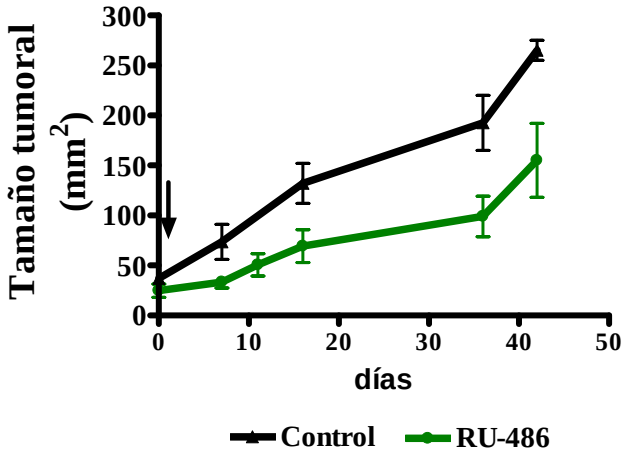


Figura 3-11. Curva de crecimiento tumoral representativa de la variante con resistencia adquirida C7-2-HIR. Se transplantaron los tumores en forma s.c. y cuando alcanzaron un tamaño de 50 mm^2 se comenzaron los tratamientos (⟶) con vehículo o RU-486.

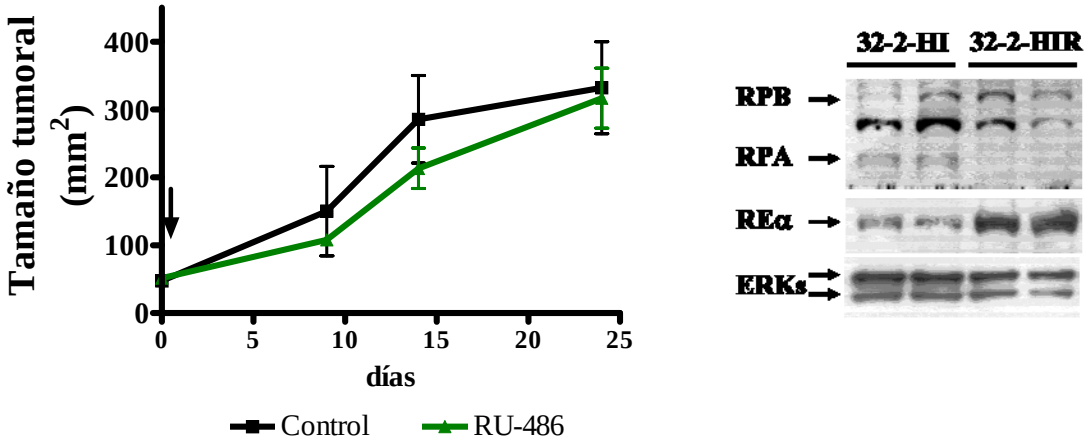
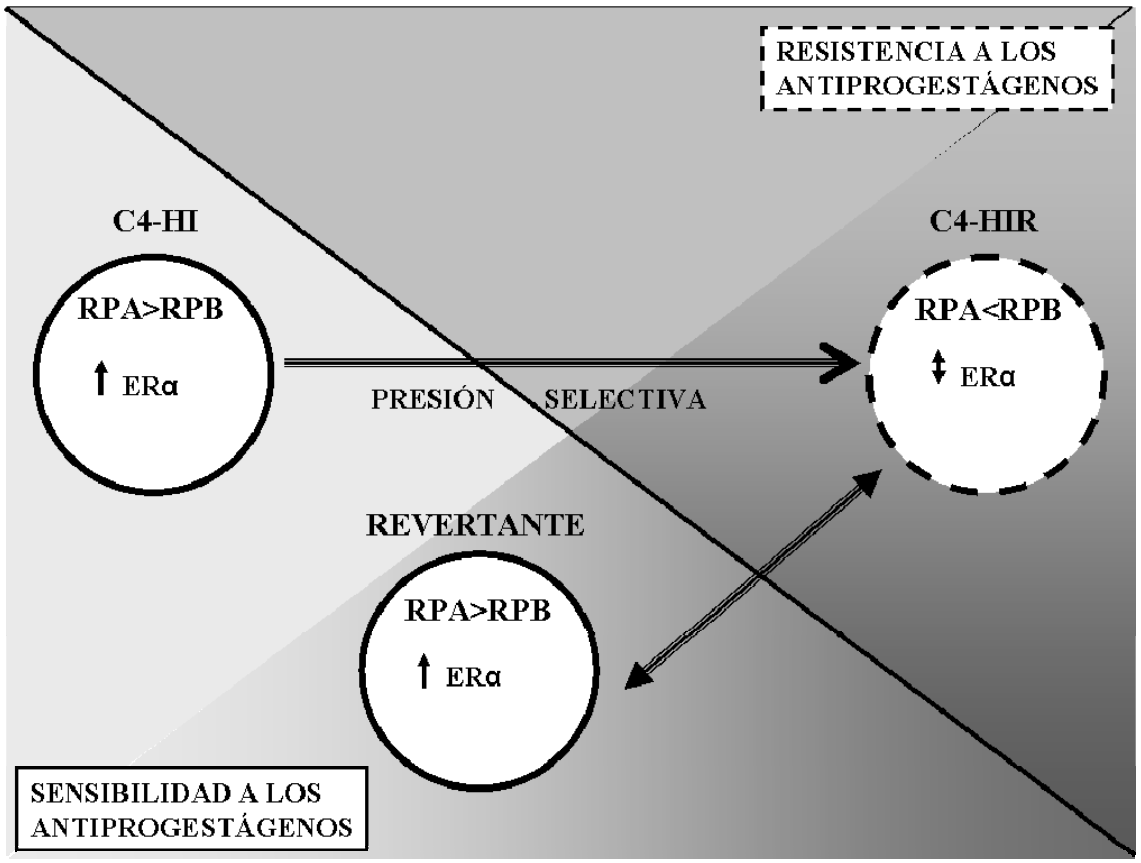


Figura 3-12. Curva de crecimiento tumoral representativa de la variante con resistencia adquirida 32-2-HIR, tumores que expresan mayores niveles de RPB que de RPA. Se transplantaron los tumores en forma s.c. y cuando alcanzaron un tamaño de 50 mm^2 se comenzaron los tratamientos (⟶) con vehículo o RU-486. Analizamos por *western blot* con el Ac. C19 la expresión del RP y con el Ac. MC20 la expresión del REα en extractos nucleares de las dos variantes tumorales sin tratamiento hormonal. Observamos que la variante con resistencia adquirida 32-2-HIR expresa mayores niveles de RPB que de RPA mientras que la variante sensible 32-2-HI muestra el patrón opuesto. Como control de carga se utilizaron las ERKs.

Hemos demostrado una asociación entre la respuesta al RU-486 y alta expresión de RPA: los tumores sensibles son aquellos cuya relación RPA/RPB≥1 y los resistentes, tanto constitutivos como adquiridos, aquellos cuya relación RPA/RPB<1. Por otra parte observamos que la expresión de REα muestra cierto paralelismo con la expresión de RPA en los tumores C4-HIR, 59-2-HIR, C4-2-HI y 59-HI, pero no en los C4-HIRR y 32-2-HIR.



PARTE IV

CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES C4-HI, C4-HIR, C4-HIRev.

POTENCIAL METASTÁSICO, TASA DE CRECIMIENTO, ACTIVACIÓN DE ERK Y AKT.

Con el objetivo de estudiar si existe relación entre la adquisición de la resistencia a la terapia con antiprogestágenos y la progresión de la enfermedad, analizamos en la variante sensible (C4-HI), la resistente adquirida (C4-HIR) y la revertante (C4-HIRev): a) el potencial metastático b) la tasa de crecimiento, c) la activación de las quinasas ERK1/2 y AKT.

a) Potencial metastásico.

Estudiamos en los ratones BALB/c portadores de estas tres variantes tumorales, la presencia de metástasis axilares en las autopsias de los animales, confirmando los resultados por análisis histológico. Como se detalla en la Figura 3-13a, a los 55 días de haber inoculado los tumores, los ratones portadores de tumores C4-HI presentaron un 30% de metástasis axilares, mientras que los C4-HIR y los C4-HIRev un 86% y 90% respectivamente. Esto significa, que pese a que la resistencia a los antiprogestágenos es reversible como así también el patrón de expresión de isoformas, no ocurre lo mismo con el potencial metastático que no revierte, indicando que es un evento unidireccional. Analizamos la expresión de la metaloproteinasa MMP-9 por IF, ya que se sabe que esta proteína participa en los procesos de invasión degradando la matriz extracelular. Observamos en la Figura 3-13b, que los tumores con mayor capacidad metastásica muestran mayor expresión de MMP-9.

b) Tasa de crecimiento

Curiosamente, los tumores C4-HIR y C4-HIRev, con mayor potencial metastático, presentaron una tasa de crecimiento menor ($p<0,01$; Figura 3-13a). Este mismo resultado se observó en la familia 59, donde los tumores resistentes 59-HI y 59-2-HIR mostraron una tasa de crecimiento menor que los tumores sensibles 59-2-HI (no se muestra).

c) Activación de AKT y ERK

Las vías de AKT y MAPK han sido vinculadas con la activación ligando independiente de los receptores para hormonas esteroides en tumores resistentes a la terapia hormonal y también con la activación de cascadas metastásicas. Por dicho motivo, y teniendo en cuenta que en estos tumores el aumento de malignidad no es reversible como lo es la respuesta a hormonas, decidimos investigar cómo se activan las vías de señalización de AKT y ERK en los distintos estadios de respuesta hormonal.

Para ello analizamos los niveles de fosforilación de AKT (estudiando sus sitios de fosforilación serina 473 y treonina 308) y de ERK1/2 en extractos tumorales de las distintas variantes. Observamos en la Figura 3-14, que los tumores C4-HI presentan menor activación de ERK1/2 que los tumores C4-HIR y C4-HIRev ($p<0,001$). El mismo patrón de activación se observa en la familia 59, donde los tumores 59-2-HI muestran menor activación de ERK que los 59-HI y que los 59-2-HIR (Figura 3-14b).

Cuando estudiamos la activación de AKT (fosfo-AKT; p-AKT) se observa que en la familia C4 ocurre lo opuesto que ocurría con los niveles de fosfo-ERK (p-ERK); son los tumores sensibles C4-HI los que muestran mayores niveles de p-Ser 473 AKT y p-Thr 408 AKT ($p<0,001$; Figura 3-14c).

a

	C4-HI	C4-HIR	C4-HIRev
Metástasis axilar	30% (n=10)[a]	86% (n=7)[b]	90% (n=10)[b]
Tasa de crecimiento mm²/ día	25 ± 1.2 [a]	13 ± 1.2 [b]	14 ±1,3 [b]

b

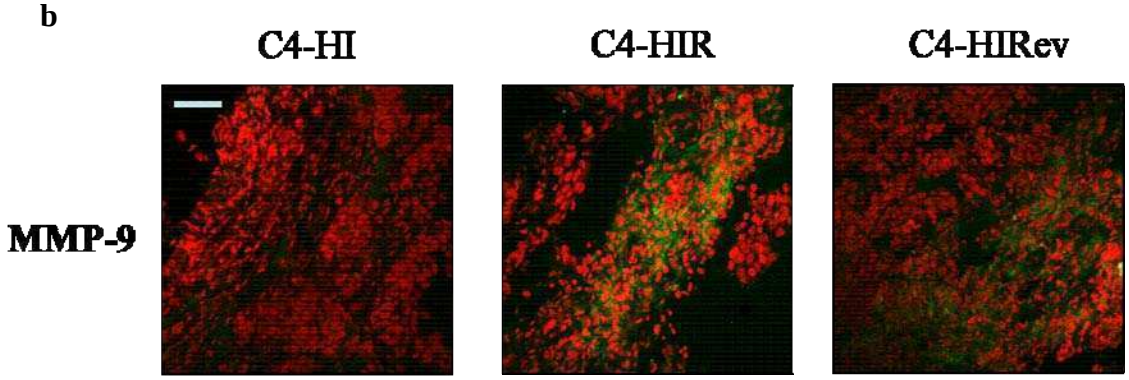


Figura 3-13. El fenotipo metastático no es reversible. a) Metástasis axilares: porcentaje de animales con metástasis axilares luego de una autopsia a los 55 días de realizado el transplante singeneico del tumor; a *vs*. b $p<0,01$. La tasa de crecimiento tumoral, expresado en mm^2/día, es mayor en los tumores C4-HI, y menor en los C4-HIR y C4-HIRev; a *vs* b $p<0,001$. **b)** Expresión de MMP-9 por IF. Se usaron cortes de criostato incubados con un anticuerpo primario Ac α-MMP9 y el secundario anti cabra acoplado a FITC (verde). Los núcleos se tiñeron con IP (rojo) Los tumores con mayor porcentaje de metástasis axilares (C4-HIR y C4-HIRev) presentan mayores niveles de MMP-9. Barra: 100 μm.

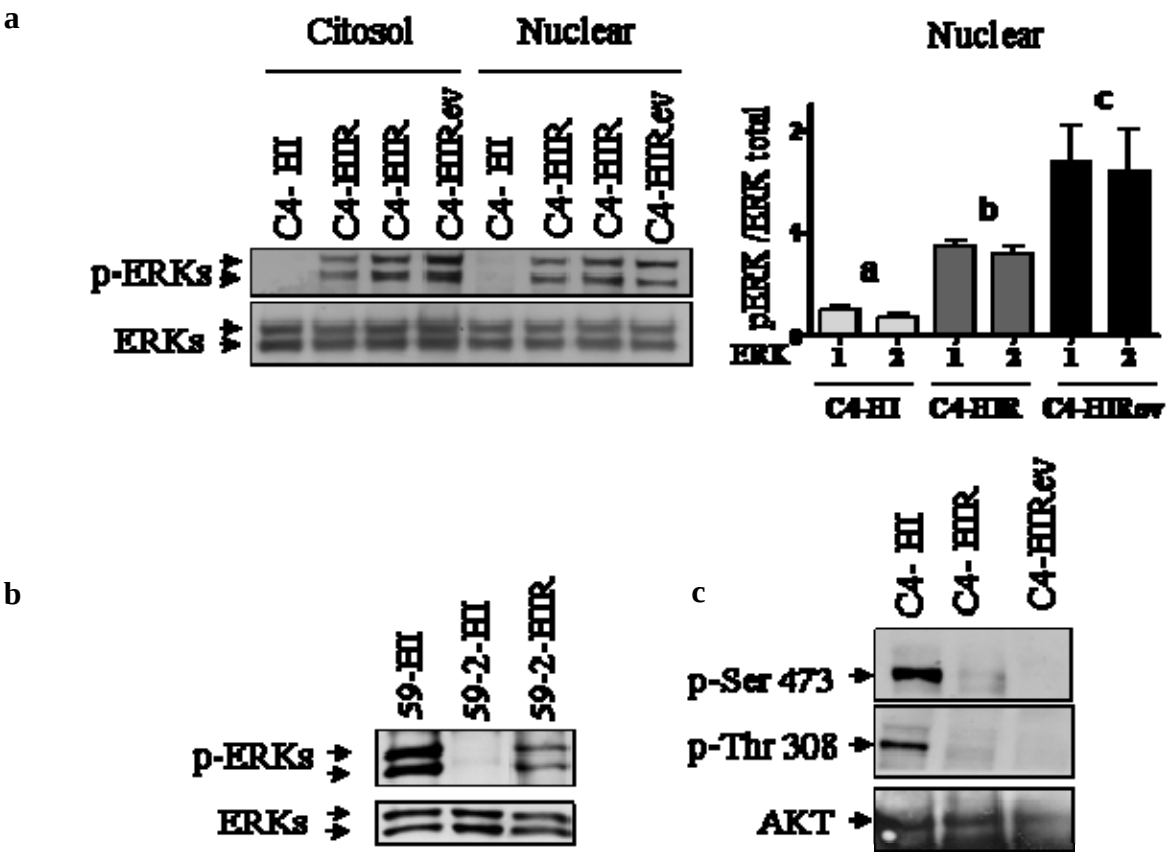
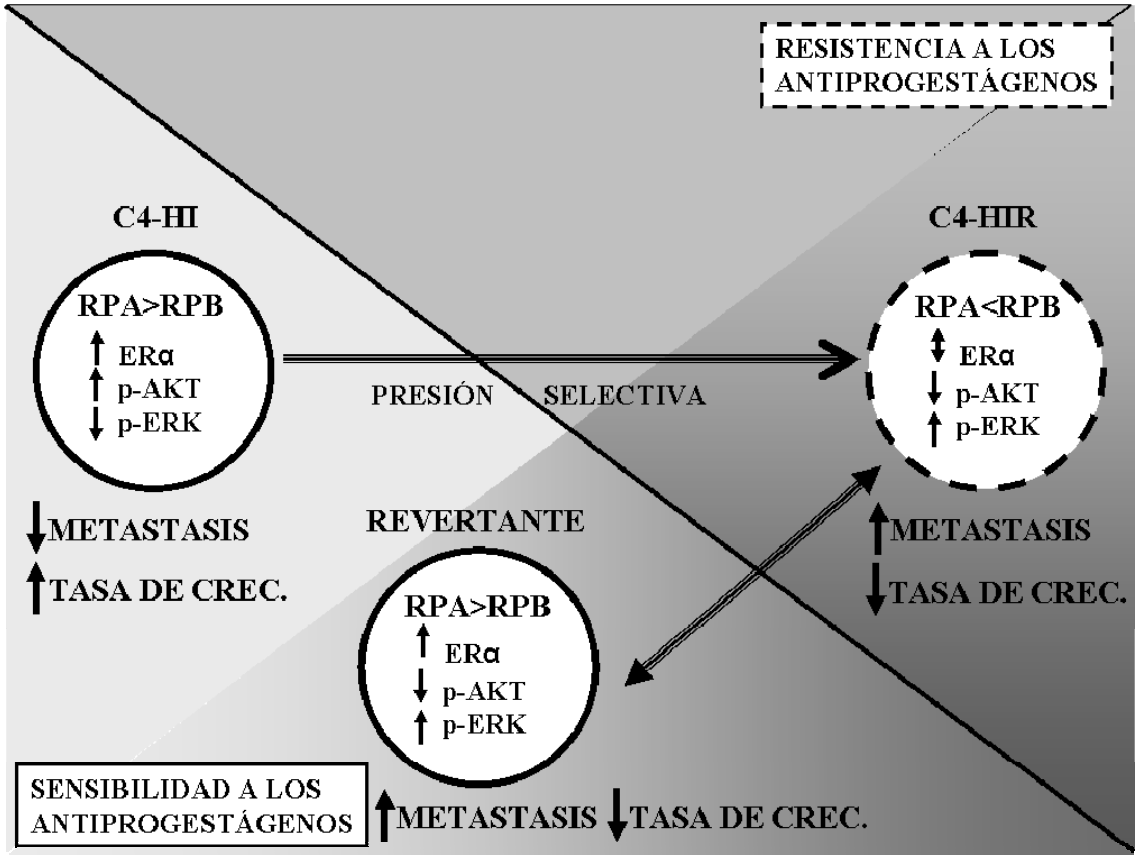


Figura 3-14. La activación de las quinasas ERKs y AKT evaluada por *Western blot* es independiente de la capacidad de los tumores de responder a la terapia hormonal. a) Niveles de activación de ERK en la fracción citosólica y nuclear en la familia C4. En los tumores C4-HIR y C4-HIRev se observan altos niveles de pERK1/2 (1 y 2; a vs. b y c p<0,001). **b)** Niveles de activación de ERK en la fracción nuclear en la familia 59. Los dos tumores resistentes muestran mayores niveles de p-ERK (p<0,001). c) La activación de AKT correlaciona con la menor capacidad metastásica. Se observan altos niveles de p-Ser 473 y p-Thr 408 sólo en la variante sensible C4-HI. En todos los casos se muestra un *western blot* representativo de 3.

Podemos resumir los resultados expuestos en la PARTE IV en el siguiente esquema:

C4-HI	↑ **pAKT**	↓ **pERK**	↓ **metastasis**	↑ **tasa de crecimiento**
C4-HIR	↓ **pAKT**	↑ **pERK**	↑ **metastasis**	↓ **tasa de crecimiento**
C4-HIRev	↓ **pAKT**	↑ **pERK**	↑ **metastasis**	↓ **tasa de crecimiento**

Demostramos con estos resultados que en este modelo de resistencia, la progresión a un fenotipo más agresivo es independiente de la respuesta hormonal. Asimismo, la activación de las quinasas ERK o AKT es independiente de la capacidad de los tumores de responder a la terapia hormonal, pero sí correlaciona con la capacidad metastásica, teniendo los tumores más agresivos más activada la vía de ERK y menos activada la vía de AKT. Además cabe mencionarse que como AKT se encuentra más activada en los tumores que presentaron mayor tasa de crecimiento, podría sugerirse también una relación entre estos dos fenómenos.



PARTE V

REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA POR TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS.

Resultados previos obtenidos durante la tesina de licenciatura mostraron que el tratamiento con E2 (*pellet* 6 mg) durante 48 hs, inducía la expresión de RPA en los tumores con resistencia adquirida C4-HIR (Figura 3-15). Si nuestra hipótesis que sostiene que la presencia de RPA es predictiva de la respuesta al tratamiento con RU-486 es correcta, el tratamiento combinado de E2 y RU-486 debería inducir la regresión de los tumores con resistencia adquirida. Por ello decidimos estudiar si los tratamientos combinados de RU-486 + E2 y RU-486 + TAM inhiben el crecimiento tumoral en las variantes resistentes y si es posible demorar la aparición de resistencia en la variante sensible C4-HI.

Terapias combinadas en los tumores sensibles C4-HI.

Como se observa en la Figura 3-16a, en los tumores C4-HI el tratamiento combinado con RU-486 (12 mg/kg/día) + E2 (*pellet* 5 mg), no ejerció un efecto aditivo con respecto a las terapias simples durante los primeros 30 días. Sin embargo, transcurrido ese lapso, la terapia combinada siguió ejerciendo efectos inhibitorios mientras que los tumores con terapias simples comenzaron a crecer. En la Figura 3-16c, se muestran imágenes de tumores al final del experimento.

El tratamiento combinado con RU-486 (12 mg/kg/día) + TAM (5 mg/kg/día) resultó más efectivo que el tratamiento con TAM solo, pero no resultó mas eficiente que la terapia con RU-486.

En un segundo experimento sacrificamos los animales a los 20 días de tratamiento y pesamos los tumores. Como se observa en la Figura 3-16a, en concordancia con el primer experimento, no se observaron diferencias entre los grupos experimentales a los 20 días de tratamiento.

Terapias combinadas en los tumores son resistencia adquirida C4-HIR y 59-2-HIR.

En los tumores C4-HIR, las terapias combinadas de RU-486 (12 mg/kg/día) + E2 (*pellet* 5 mg) y RU-486 + TAM (5 mg/kg/día) revirtieron la resistencia al antiprogestágeno. Como en el caso anterior, sacrificamos los animales 20 días *post* tratamiento y pesamos los tumores. El peso de los tumores C4-HIR que recibieron tratamientos combinados fue significativamente menor ($p<0,001$) que el de los controles o aquellos que recibieron tratamientos simples (Figura 3-16b). En la Figura 3-

16c, se muestran imágenes de tumores al final del experimento tratados con E2, RU-486 y RU-486 + E2.

Para ver si este resultado se reproducía en otra familia tumoral, ensayamos la terapia combinada de RU-486 (*pellet* 6 mg) + E2 (*pellet* 5 mg) en los tumores con resistencia adquirida 59-2-HIR, pertenecientes a la familia 59. En estos tumores, como se ve en la Figura 3-17, la terapia combinada fue más eficiente que las terapias únicas (E2 + RU-486 *vs*. E2, $p<0,01$; E2 + RU-486 *vs*. RU-486, $p<0,05$), pero no se observó el mismo grado de inhibición que en los tumores C4-HIR.

Morfología de los tumores C4-HI y C4-HIR luego de recibir terapias combinadas.

Cuando analizamos en cortes histológicos la morfología de los tumores C4-HI y C4-HIR al finalizar los tratamientos combinados (E2 + RU-486 y TAM + RU-486) observamos, como se muestra en la Figura 3-18, que en ambos casos se evidencia un claro patrón de regresión. En los tumores C4-HI la regresión es casi completa, con presencia de unas pocas células tumorales, rodeadas de abundante matriz extracelular y fibroblastos. Estos tumores regresionan principalmente por un proceso de diferenciación, como fue descripto previamente en la tesis de la Dra. S. Vanzulli.

En los tumores C4-HIR observamos principalmente un aumento de estroma reactivo y disminución de nidos epiteliales como ya fue descripto anteriormente para tumores C7-2-HI, 32-2-HI y 59-2-HI (Vanzulli *et al.* 2002).

Terapias combinadas en los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI.

Estudiamos si este mismo efecto de las terapias podía observarse en los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI. Como se observa en la Figura 3-19, estos tumores se mostraron resistentes tanto a las terapias simples con E2 (*pellet* 5 mg) ó RU-486 (12 mg/kg/día), como a la combinada con E2 + RU-486. La resistencia constitutiva entonces, no puede manipularse con el tratamiento hormonal como la resistencia adquirida. Cuando analizamos la expresión de RPA luego de 48 hs de tratamiento con E2 no observamos cambios en la expresión de esta isoforma (no se muestra).

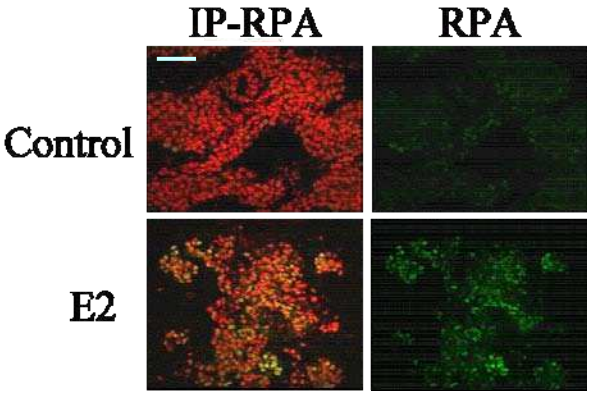


Figura 3-15. El tratamiento con E2 por 48 hs. aumenta la expresión de RPA en los tumores con resistencia adquirida C4-HIR. Se usaron cortes de crióstato incubados con el anticuerpo primario Ac. C19 y el secundario anti conejo acoplado a FITC (verde). Los núcleos se tiñeron con IP (rojo). Barra: 100 μm.

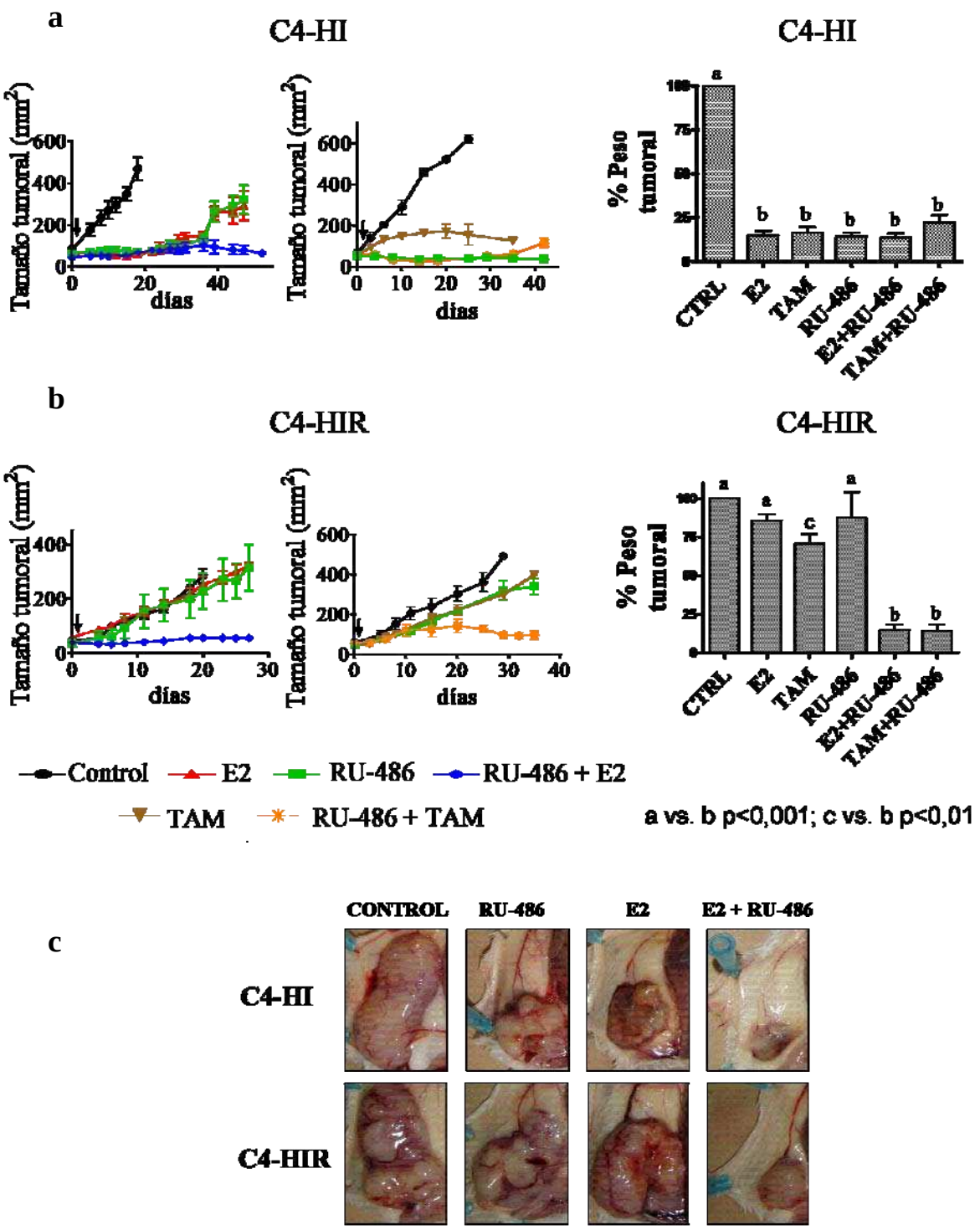


Figura 3-16. El tratamiento con E2 o TAM resensibiliza los tumores con resistencia adquirida al RU-486. Curvas de crecimiento de C4-HI a) y C4-HIR b). Se trataron los ratones portadores de tumor con E2 (*pellet* 5 mg), RU-486 (12 mg/kg/día sc), E2 + RU-486, TAM (5 mg/kg/día sc) ó TAM + RU-486. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores medían 50 mm^2 (⟶). Los controles se trataron con solución fisiológica. El área tumoral se midió con un calibre. Peso tumoral: En un experimento similar, los animales se sacrificaron al día 20 *post* tratamientos y se pesaron los tumores. La media del peso tumoral control fue considerado como 100%. En los tumores C4-HIR los tratamientos combinados disminuyeron el peso tumoral final significativamente en comparación a los tratamientos simples ($p<0,001$). En las imágenes c), se muestran los tumores C4-HI y C4-HIR con los tratamientos simples y combinados al final de los tratamientos.

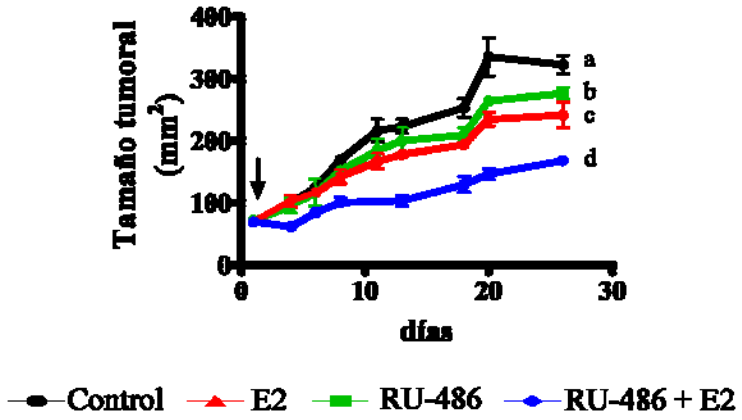


Figura 3-17. El tratamiento con E2 *in vivo* induce la resensibilización parcial al RU-486 en los tumores con resistencia adquirida 59-2-HIR. Curvas de crecimiento: Los animales fueron tratados con E2 (*pellet* 5 mg), RU-486 (*pellet* 6 mg), o E2 + RU-486. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores medían 50 mm^2 aproximadamente (⟶). Los controles fueron tratados con solución fisiológica. El área tumoral se midió con un calibre (a *vs.* d $p<0,001$; b *vs.* d $p<0,05$; c *vs.* d $p<0,01$).

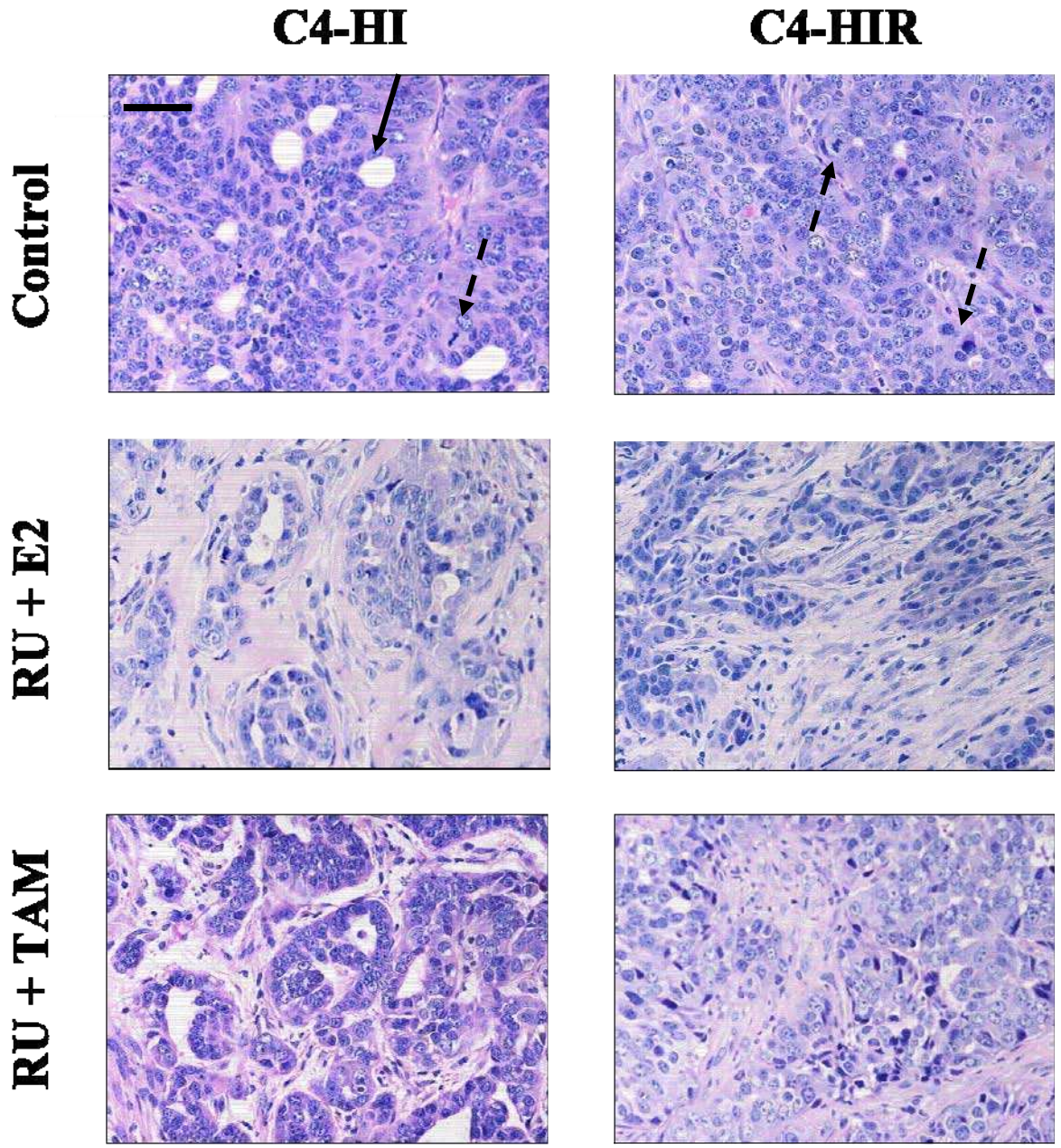


Figura 3-18. El tratamiento con E2 o TAM resensibiliza los tumores al tratmiento con RU-486: Estudio histológico de los tumores C4-HI y C4-HIR al final de los tratamientos. Tumor C4-HI, Control: diferenciación glandular (⟶) y la presencia de algunas mitosis (– – →). Se observa poco estroma. E2 + RU-486: Estructuras glandulares bien definidas rodeadas de estroma formado principalmente por colágeno. TAM + RU-486: Glándulas irregulares rodeadas de células epiteliales. Tumor C4-HIR. Control: proliferación maligna con muy pocas estructuras glandulares irregulares. Abundante atipía y mitosis (– – →). Poco estroma. E2 + RU-486: Células neoplásicas agrupadas rodeadas de un estroma denso formado principalmente por matriz extracelular. Se observa en algunas regiones diferenciación glandular. TAM + RU-486: Poca diferenciación con presencia de glándulas irregulares compuestas por una población de células heterogénea. Estroma denso y abundante. Barra: 50 μm.

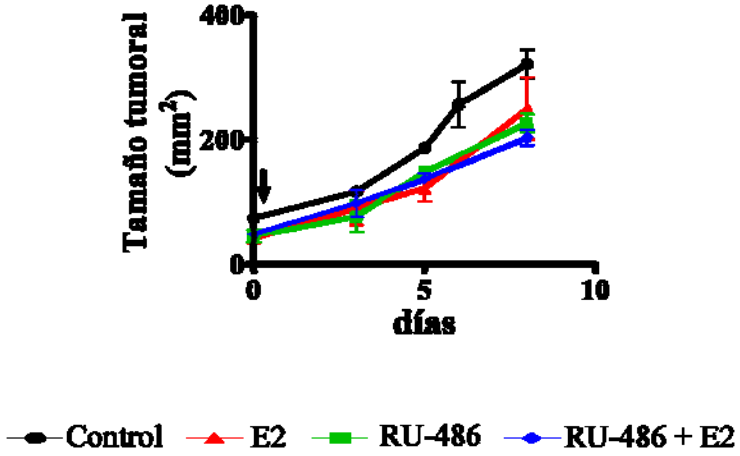
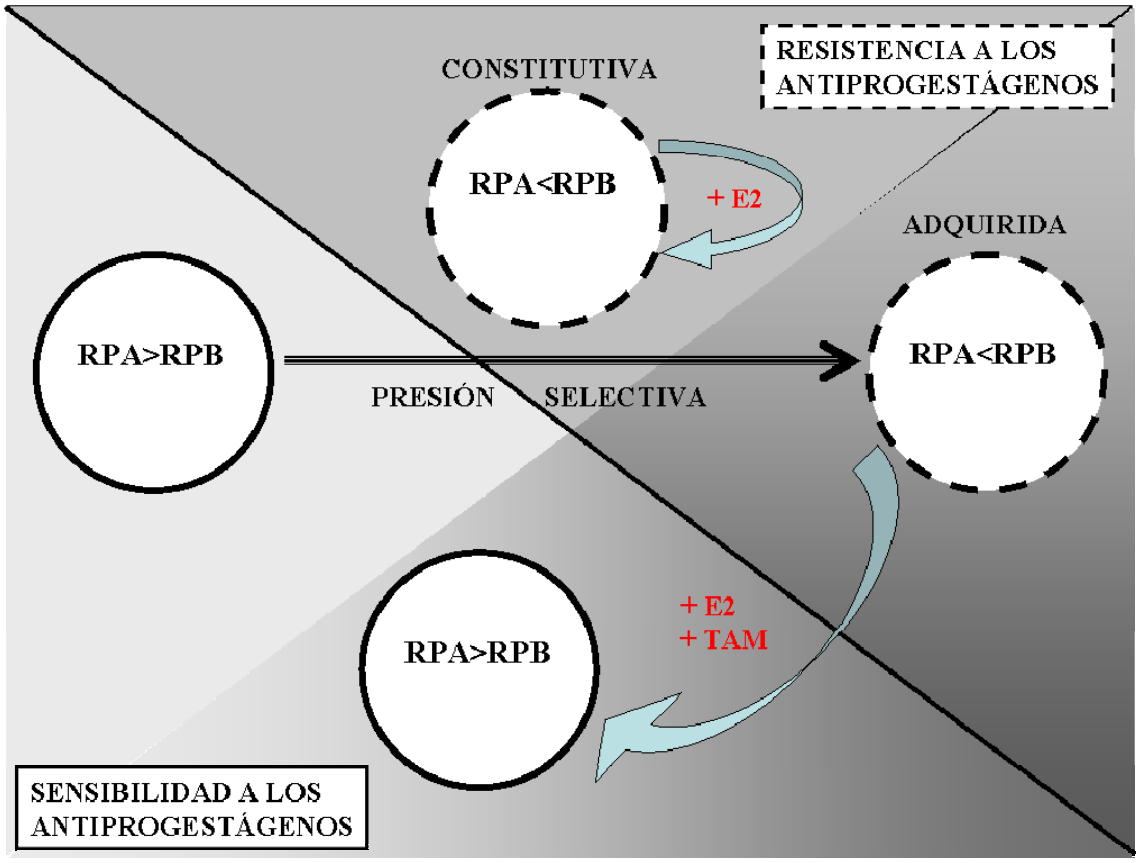


Figura 3-19. El tratamiento con E2 *in vivo* no recupera la sensibilidad al RU-486 en tumores C4-2-HI. Curvas de crecimiento: Los animales fueron tratados con E2 (*pellet* 5 mg), RU-486 (*pellet* 6 mg.), o E2 + RU-486. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores medían 50mm^2 aproximadamente (⟶). Los controles fueron tratados con solución fisiológica. El área tumoral se midió con un calibre.

Resumiendo, hemos observado que la resistencia adquirida a los antiprogestágenos, pero no la resistencia constitutiva, puede ser revertida con la terapia combinada de RU-486 + E2 y RU-486 + TAM. Estos resultados avalan la hipótesis propuesta que la presencia de la isoforma A del RP acompaña la respuesta inhibitoria a los antiprogestágenos.

Los resultados nos indican también que la regulación de la expresión de RPA en los tumores con resistencia adquirida C4-HIR y en los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI, es diferente.



PARTE VI

CULTIVOS PRIMARIOS

Cultivo en plástico

En nuestro laboratorio demostramos que los fibroblastos asociados a carcinomas (CAFs) provenientes de tumores C4-HI son capaces de activar al RP e inducir la proliferación de células epiteliales (EPI) C4-HI y C4-HD *in vitro* (Giulianelli *et al.* 2008a) indicando que el estroma juega un rol muy importante en el crecimiento tumoral en este modelo. Para evaluar si los CAFs contribuyen al fenotipo resistente, realizamos cultivos primarios de los tumores sensibles y resistentes y evaluamos: a) crecimiento *in vitro*, b) respuesta hormonal de las células epiteliales, c) respuesta hormonal de las células epiteliales en cocultivo con CAFs, d) expresión de receptores hormonales.

Asimismo estudiamos la capacidad migratoria de las EPI mediante el ensayo de la herida para evaluar si mantienen *in vitro* el fenotipo metastásico observado *in vivo.*

a) Crecimiento *in vitro.*

Realizamos cultivos primarios en plástico de células epiteliales purificadas de los tumores C4-2-HI (resistente constitutivo), C4-HI (sensible), C4-HIR (resistente adquirido). En la Figura 3-20, observamos imágenes obtenidas por microscopía con contraste de fase de las células epiteliales creciendo en plástico con SFB 10%. Las células de las 3 variantes tumorales son diferentes. Las células epiteliales C4-HI crecen originalmente en cúmulos y cuando alcanzan la confluencia, las células presentan una morfología poliédrica homogénea característica de células epiteliales en cultivo. Las células epiteliales C4-HIR y C4-2-HI presentan una morfología asimétrica observándose células de diferentes tamaños y de formas irregulares. En los cultivos de C4-HIR se observan muchas células multinucleadas. Las células C4-2-HI por otra parte, se caracterizan por presentar múltiples vacuolas. No conocemos todavía el porqué de estas diferencias.

b) Respuesta hormonal de las células epiteliales.

Primero analizamos si el fenotipo resistente se mantenía al cultivar las células *in vitro*. Para ello realizamos estudios de proliferación celular mediante la incorporación de ^{3}H-timidina. Las EPI purificadas se sembraron en placas de 96 hoyos y fueron tratadas con MPA 10^{-9} M sólo o combinado con RU-486 10^{-8} M o ZK 230211 10^{-8} M. En la Figura 3-21, observamos que las células C4-HI se estimularon significativamente con el MPA 10^{-9} M ($p<0,001$) y este efecto fue inhibido tanto por el RU-486 10^{-8} M

como por el ZK 230211 10^{-8} M ($p<0,001$), en concordancia con resultados ya publicados (Giulianelli *et al.* 2008a). Resultados similares se obtuvieron utilizando RU-486 y ZK 230211 10^{-7} y 10^{-9} M (no se muestra). Como se esperaba, no se observaron cambios en la proliferación de las células C4-2-HI con los distintos tratamientos. Sorprendentemente, en las células C4-HIR, observamos que la resistencia se pierde cuando las células son aisladas del tumor y crecidas en plástico, presentando un comportamiento muy similar a las células C4-HI: se estimularon con el MPA 10^{-9} M ($p<0,001$) y se inhibieron con el RU-486 y con el ZK 230211 10^{-8} M ($p<0,001$). De la misma manera, este experimento lo realizamos con cultivos primarios de tumores 59-2-HIR para ver si se reproducía en otra variante tumoral diferente. En la Figura 3-22, observamos que las EPI purificadas 59-2-HIR también pierden la resistencia al RU-486 ya que la proliferación celular aumenta con el tratamiento con MPA 10^{-9} M y se inhibe con el tratamiento con RU-486 ó ZK 230211 10^{-8} M.

c) Respuesta hormonal de las células epiteliales en cocultivo con CAFs.

Estudiamos a continuación si los CAFs participan en la adquisición de la hormono resistencia. Para ello realizamos estudios de proliferación en cultivos mixtos de EPI y CAFs provenientes de una misma variante tumoral (Ej: EPI C4-HI, CAF C4-HI) o con un componente de la variante sensible y el otro de la resistente (Ej: EPI C4-HI, CAF C4-HIR). En la Figura 3-23, se muestra que el cocultivo de las EPI C4-HI y C4-HIR con CAF C4-HIR no modificó la respuesta a los antiprogestágenos (Figura 3-21). En ambos casos el MPA 10^{-9} M estimuló la proliferación celular y el RU-486 10^{-8} M inhibió este efecto, sugiriendo que no serían los CAFs C4-HIR responsables de mantener el fenotipo resistente.

d) Expresión de receptores hormonales.

Estudiamos los niveles de expresión de RP en las EPI purificadas de los tumores C4-HI, C4-HIR y C4-2-HI creciendo en plástico. Los niveles de RPA y RPB fueron analizados por *western blot* (Figura 3-24a, 3-24c) e inmunofluorescencia (Figura 3-24b). La relación RPA/RPB en las EPI C4-HIR *in vitro* es similar a la que existe en las EPI C4-HI (Figura 3-24a, 3-24c). Sin embargo, las células aisladas, de los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI además de man tener la resistencia en cultivo, como mostramos anteriormente (Figura 3-21), mantienen bajos o indetectables los niveles de RPA (Figura 3-24b, 3-24c). Podemos concluir entonces que la pérdida de resistencia de

las células C4-HIR cuando son cultivadas en plástico correlaciona con la re-expresión de RPA.

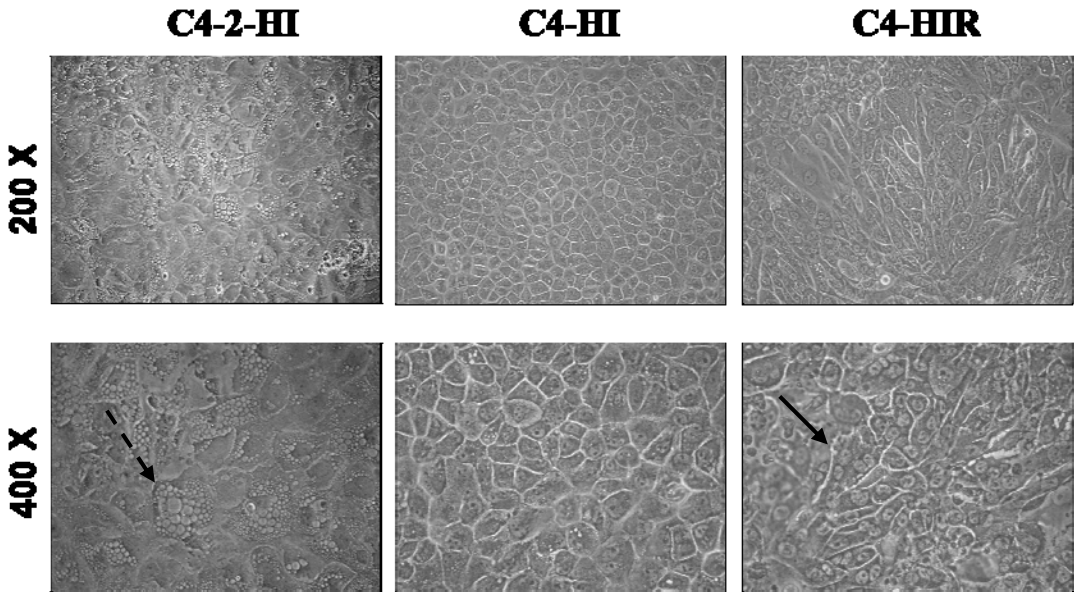


Figura 3-20. Células epiteliales purificadas de tumores C4-2-HI, C4-HI y C4-HIR creciendo en plástico. Cultivos primarios de EPI de las tres variantes tumorales se sembraron en placas de plástico con medio de cultivo con SFB 10%, que fue renovado día por medio. Cuando las células alcanzaron la confluencia se tomaron fotografías de contraste de fase. Las células C4-HI crecen de forma homogénea, mientras que las C4-2-HI y C4-HIR crecen de manera más desorganizada y presentan formas irregulares. En las C4-HIR se pueden observar células multinucleadas (⟶) y en las C4-2-HI múltiples vacuolas (- - - - ▸).

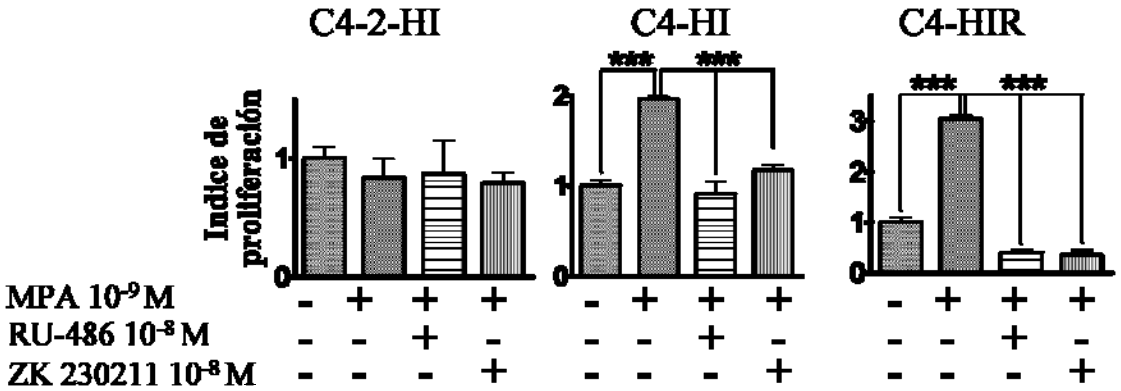


Figura 3-21. Las células provenientes de los tumores C4-HIR con resistencia adquirida a los antiprogestágenos revierten su resistencia en cultivos *in vitro*. Cultivos primarios de células epiteliales purificadas de los tumores C4-2-HI, C4-HI y C4-HIR se sembraron en placas de 96 hoyos con medio de cultivo con SFB 10%. Una vez adheridas, se reemplazó por medio con SFBch 1%. Las células se trataron por 48 hs con MPA 10^{-9} M, MPA 10^{-9} M + RU-486 10^{-8} M ó MPA 10^{-9} M + ZK 230211 10^{-8} M. La proliferación se analizó por incorporación de ^{3}H-timidina. El índice de proliferación se calculó como cpm experimental/cpm control (media ± ES). Se muestra un experimento representativo de tres utilizando octuplicados. Las células derivadas de tumores C4-HIR adquieren sensibilidad al MPA y a los antiprogestágenos cuando crecen *in vitro* ($p<0,001$).

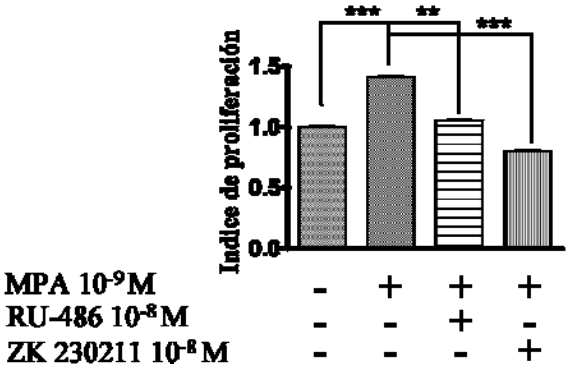


Figura 3-22. Las células provenientes de los tumores 59-2-HIR con resistencia adquirida a los antiprogestágenos revierten su resistencia en cultivo *in vitro*. Cultivos primarios de células epiteliales purificadas de los tumores 59-2-HIR se sembraron en placas de 96 hoyos. Una vez adheridas, el medio de cultivo con SFB 10% se reemplazó por medio con SFBch 1%. Las células se trataron por 48 hs con MPA 10^{-9}M, MPA 10^{-9}M + RU-486 10^{-8}M ó MPA 10^{-9} M + ZK 230211 10^{-8}M. La proliferación se analizó por incorporación de ^{3}H-timidina. El índice de proliferación se calculó como cpm experimental/cpm control (media ± ES). Se muestra un experimento representativo de otros tres utilizando octuplicados. Las células provenientes de los tumores 59-2-HIR adquieren sensibilidad al MPA y a los antiprogestágenos cuando crecen *in vitro* (***p<0.001, **p<0.05).

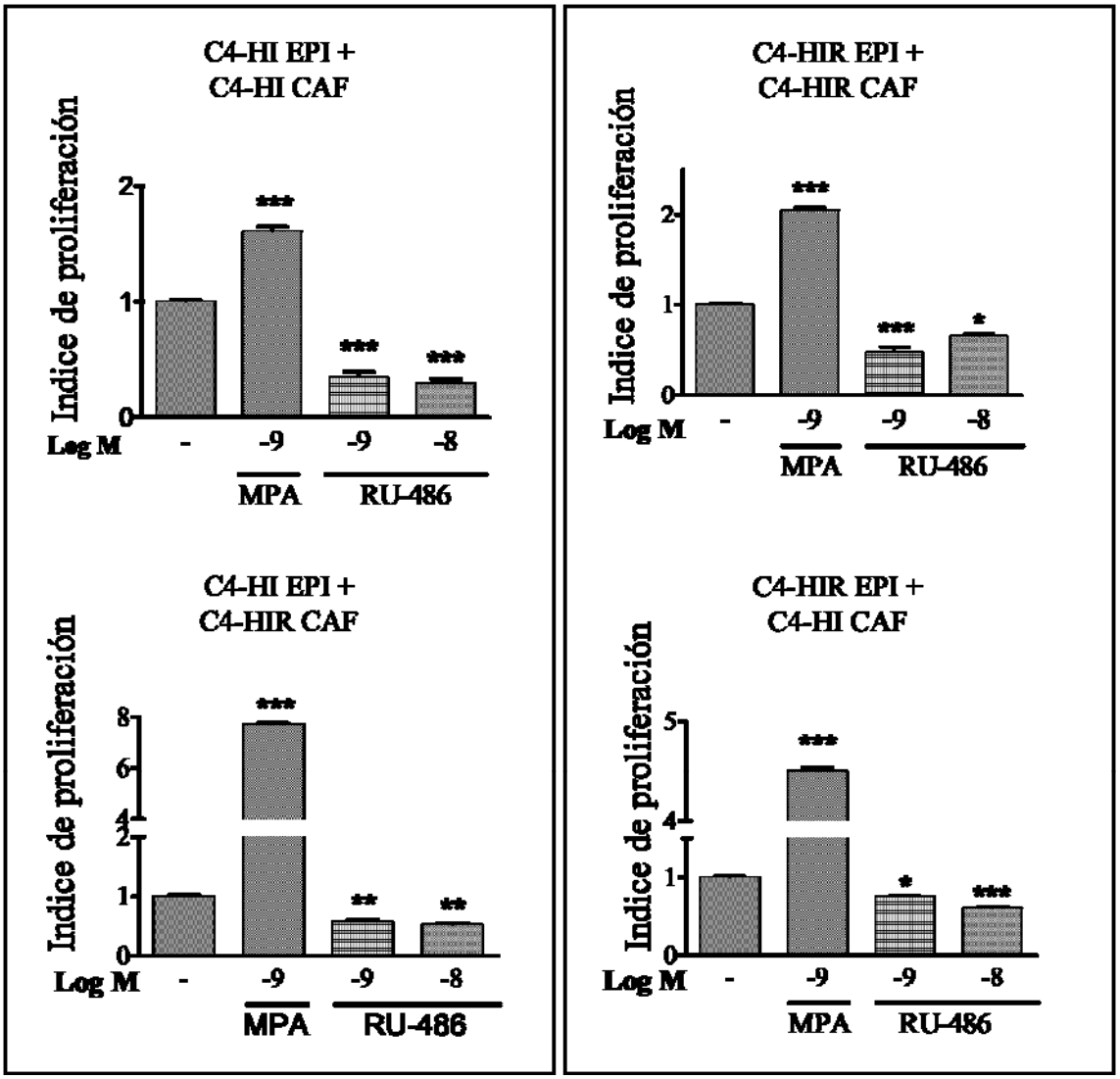


Figura 3-23. Respuesta a progestágenos y antiprogestágenos de células epiteliales (EPI) purificadas de tumores C4-HI y C4-HIR en co-cultivo con CAFs derivados de los mismos tumores. EPI (5000 células/ml) se sembraron en co-cultivo con el mismo numero de CAFs en medio con SFB 10%.Ya adheridos, los cultivos se incubaron por 48 hs con SFBch 1% con o sin MPA 10^{-9} M y RU-486 10^{-9} y 10^{-8} M. La proliferación se analizó por incorporación de ^{3}H-timidina. El índice de proliferación se calculó como cpm experimental/cpm control (media ± ES). Se muestra un experimento representativo de otros tres. No se observaron diferencias significativas cuando EPI C4-HI o C4-HIR fueron co-cultivadas con CAFs C4-HI o C4-HIR. En todos los casos, el MPA incrementa la proliferación celular, mientras que el RU-486 tiene un efecto inhibitorio (*: $p<0,05$; **: $p<0,001$ y ***: $p<0,001$).

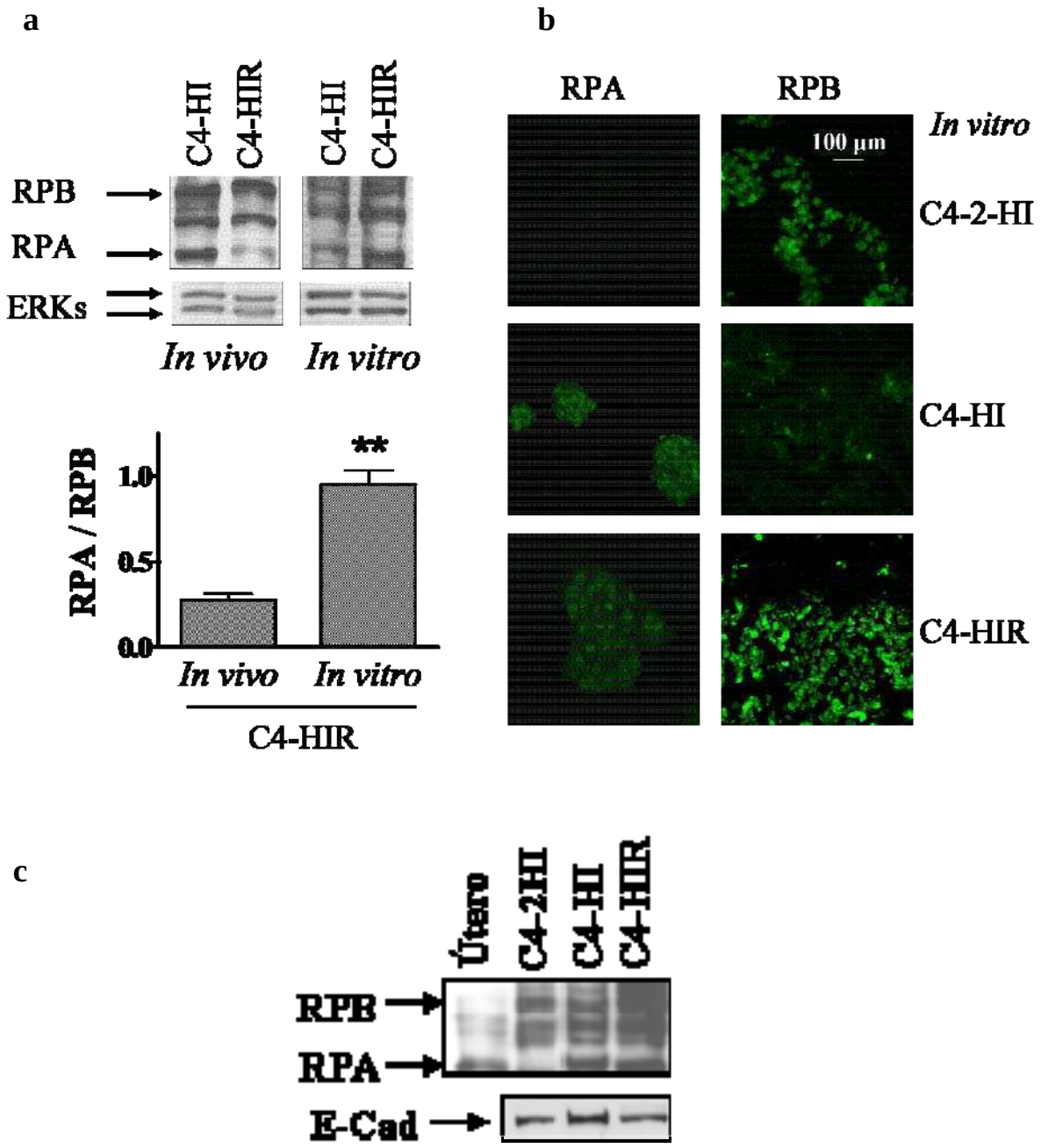
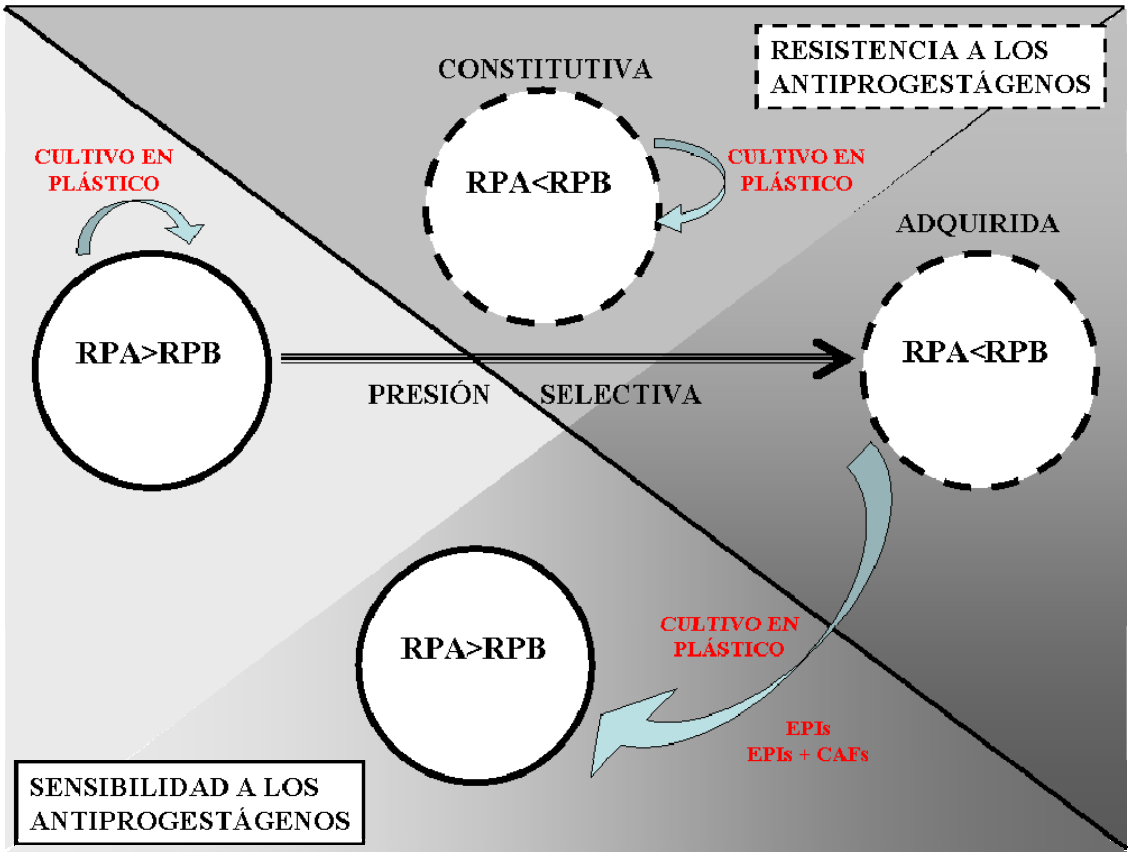


Figura 3-24. La pérdida de la resistencia adquirida in vitro está acompañada por la reexpresión de RPA. a) *Western blots* con el Ac C-19 para RPA (83kDa) y RPB (115 kDa) utilizando extractos nucleares de tumores o cultivos primarios de los mismos. Como control de carga se utilizaron las ERK totales. Cuantificamos la relación RPA/RPB en tres *western blots* diferentes utilizando distintas muestras. Las células C4-HIR creciendo en plástico revirtieron la relación RPA/RPB ($p<0,01$). b) IF para RPA (Ab-7) y RPB (Ab-6) en EPI de C4-2-HI, C4-HI y C4-HIR creciendo en plástico. Las células se sembraron en plástico, se arrestaron por 24 hs en SFBch 1%, y se fijaron e incubaron con los correspondientes Ac conjugados con FITC (verde) c) *western blot* con el Ac C-19 para RPA y RPB utilizando extractos de cultivos primarios de las variantes tumorales C4-2-HI, C4-HI y C4-HIR.

Estos resultados nos muestran que la resistencia adquirida, pero no la constitutiva, revierte cuando las células provenientes de tumores resistentes son aisladas del tejido y cultivadas en plástico. Asimismo observamos que las EPI aisladas de los tumores C4-HIR que recuperan la sensibilidad a los antiprogestágenos *in vitro,* expresan altos niveles de RPA. Esto indica nuevamente que la isoforma A del RP estaría mediando los efectos inhibitorios de los antiprogestágenos y que la expresión de RPA se regula de manera diferente en los tumores con resistencia adquirida, C4-HIR, y los resistentes constitutivos, C4-2-HI.



Estudio de migración de las células EPI C4-HI, C4-2-HI y C4-HIR: ensayo de la herida.

Hemos observado que los tumores C4-HIR son más metastásicos que los C4-HI, y que éste es un evento unidireccional, ya que pese a revertir la resistencia, los tumores C4-HIRev presentan alto porcentaje de metástasis. Estudiamos a continuación si los tumores resistentes revierten sus características metastásicas como revierten su respuesta hormonal cuando son cultivados en plástico. Para ello se realizó un ensayo de migración que correlaciona con la capacidad invasora de las células (Rodriguez *et al.* 2005), conocido como el ensayo de la herida. Realizamos este ensayo utilizando EPI purificadas de los tumores C4-HI, C4-2-HI y C4-HIR. Cuando las células en monocapa alcanzaron un 80% de confluencia aproximadamente realizamos "heridas" con un *tip* de 200 µl estéril y observamos las células al microscopio durante 7 días. Como se muestra en la Figura 3-25, las EPI de los tumores resistentes presentan mayor motilidad, ya que al séptimo día migraron poblando la "herida" mientras que en el caso de las EPI C4-HI, sólo unas pocas células migraron. Demostramos así que, aunque las células provenientes de tumores con resistencia adquirida revirtieron su respuesta hormonal al crecer en plástico, no revirtió su capacidad migratoria, sugiriendo nuevamente una disociación entre ambos fenómenos.

A diferencia de lo que observamos *in vitro*, los tumores C4-2-HI no son metastásicos *in vivo*. Es probable que esto se deba a que la tasa de crecimiento es tan alta que los tumores alcanzan un tamaño muy grande en muy corto tiempo, de manera que no llegan a generar la metástasis.

La morfología más desorganizada y heterogénea de los cultivos C4-2-HI y C4-HIR (mostrado en 3.20) podrían explicar el mayor comportamiento migratorio de ambos cultivos.

Finalmente analizamos la activación de ERK1/2 en las células en cultivo. Podemos observar que, al igual que lo observado en estudios *in vivo*, las EPI C4-HIR presentan mayor fosforilación basal de ERK 1/2 (Figura 3-26). Este grado de activación no depende de los CAFs ya que observamos el mismo resultado en los cultivos mixtos.

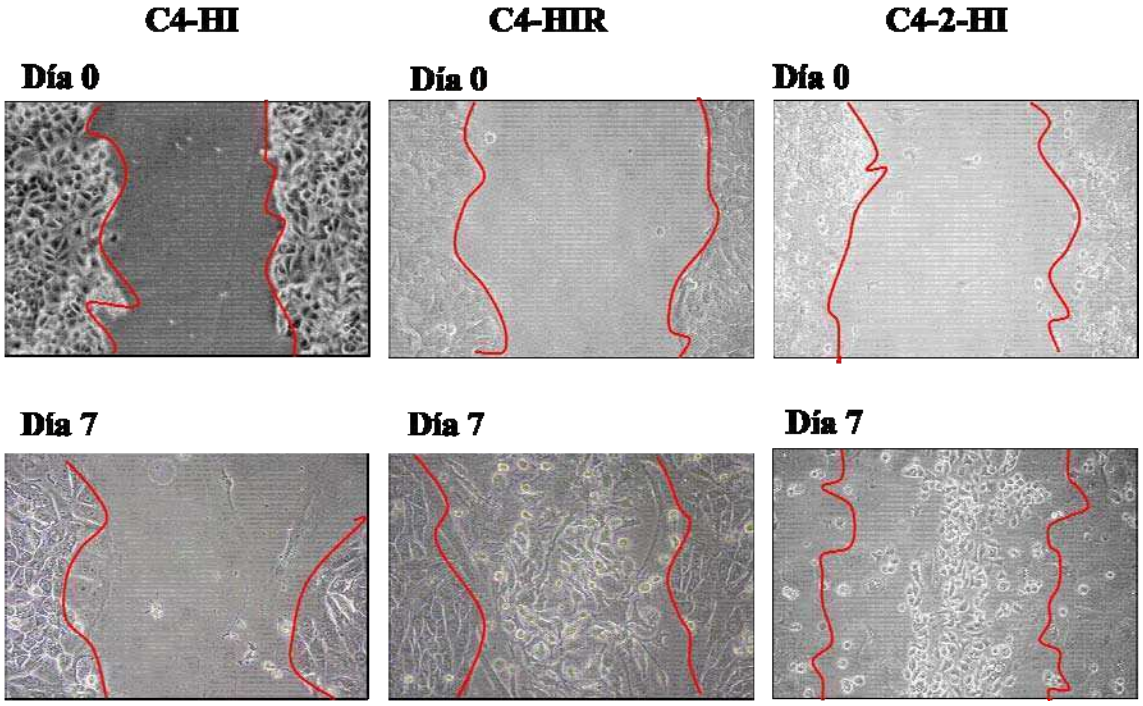


Figura 3-25. Ensayo de la herida. Las EPI C4-HIR y C4-2-HI tienen mayor capacidad migratoria que las EPI C4-HI. Se realizó la herida en células EPI purificadas de cultivos primarios de C4-HIR, C4-2-HI y C4-HI creciendo en plástico cuando presentaron un 80% de confluencia (día 0). Se estudió la migración celular durante 7 días, observando mayor migración en las EPI provenientes de los tumores resistentes C4-HIR y C4-2-HI. Aumento: 200X.

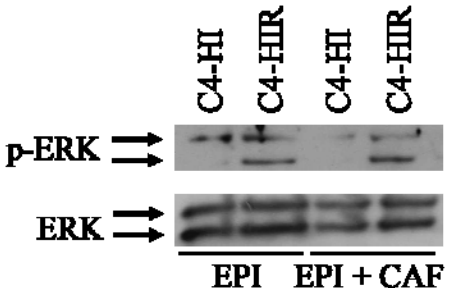
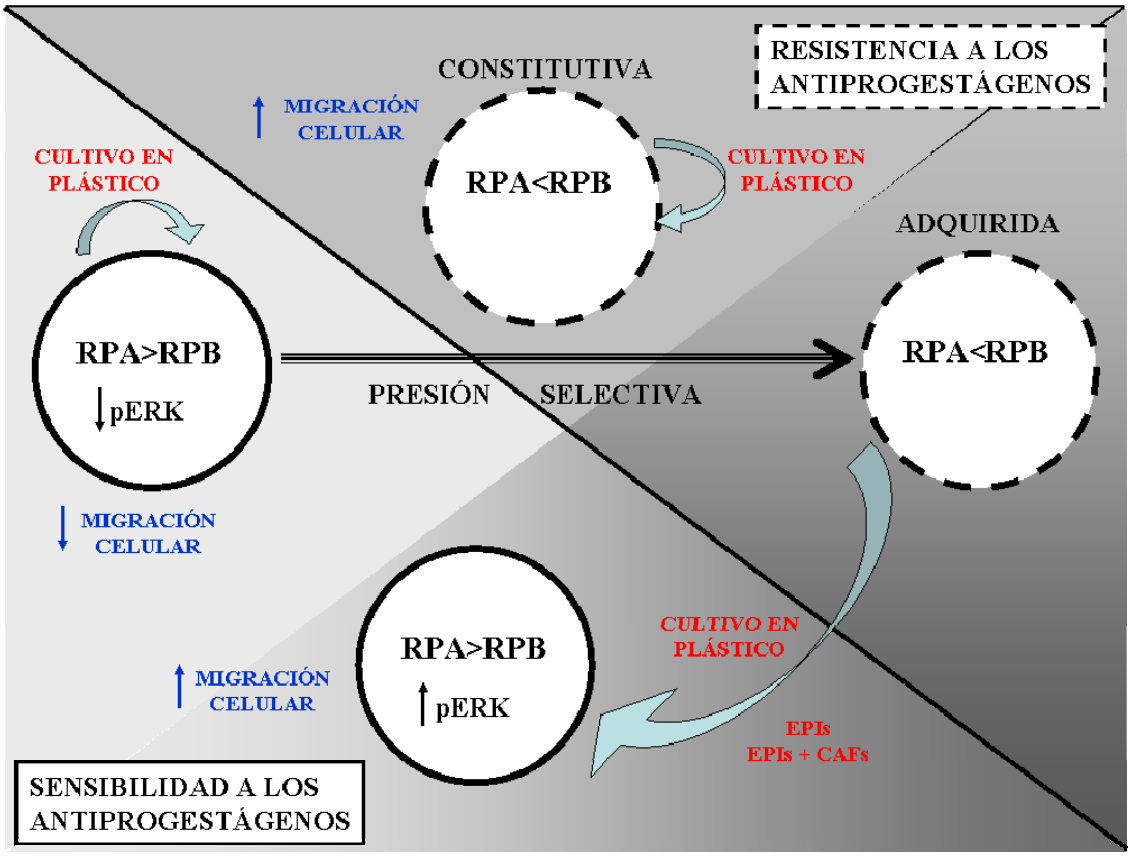


Figura 3-26. La fosforilación basal de las quinasas ERK1/2 es mayor en las EPI C4-HIR que en las EPI C4-HI y no depende de los CAFs. Analizamos la fosforilación de ERK 1/2 por *Western blot* en extractos nucleares de cultivos de EPI purificadas o creciendo en presencia de CAFs. En los cultivos primarios de EPI purificadas de C4-HIR se observa mayor fosforilación de ERK1/2 que en las EPI C4-HI. Este resultado no depende de los CAFs ya que se observa el mismo resultado en los co-cultivos. Se muestra un *western blot* representativo de tres.


RESISTENCIA A LOS ANTIPROGESTÁGENOS
CONSTITUTIVA
MIGRACIÓN CELULAR
RPA<RPB
CULTIVO EN PLÁSTICO
CULTIVO EN PLÁSTICO
ADQUIRIDA
RPA>RPB
pERK
PRESIÓN SELECTIVA
RPA<RPB
MIGRACIÓN CELULAR
RPA>RPB
pERK
CULTIVO EN PLÁSTICO
MIGRACIÓN CELULAR
EPIs
EPIs + CAFs
SENSIBILIDAD A LOS ANTIPROGESTÁGENOS

Cultivos en matrigel.

El entorno tumoral juega un rol importante en el comportamiento de las células tumorales, es por ello que suelen perderse importantes vías de señalización y comunicación intercelular en los cultivos en 2D sobre plástico. Muchas de estas señales pueden recuperarse al generar cultivos tridimensionales con matriz extracelular rica en laminina (matrigel).

Vimos que la resistencia de los tumores C4-HIR se pierde al cultivar las células en plástico. Esto podría deberse al mismo contacto con el plástico y a la falta de interacción, organización tridimensional entre las células. Por este motivo realizamos cultivos 3D en matrigel que mantienen la organización tisular propia de cada tumor, para ver si así puede mantenerse la respuesta hormonal que los tumores muestran *in vivo*.

Estudiamos: a) la morfología celular de cultivos primarios de EPI creciendo en matrigel, b) la respuesta hormonal mediante el ensayo de naranja de acridina.

a) Morfología celular de cultivos primarios de EPI creciendo en matrigel.

En la Figura 3-27, podemos observar que las EPI C4-HI forman estructuras multicelulares con una organización tipo ductal, mientras que las EPI C4-HIR Y C4-2-HI forman estructuras más indiferenciadas y desorganizadas.

b) Respuesta hormonal

Tratamos los cultivos primarios de EPI purificadas de tumores C4-2HI, C4-HI y C4-HIR creciendo en matrigel con medio de cultivo solo (control), con MPA 10^{-8} M, RU-486 10^{-8} M Y ZK 230211 10^{-8} M. Luego de los tratamientos observamos las células en un microscopio invertido. Como se observa en la Figura 3-28, las células C4-2-HI no presentan diferencias morfológicas frente a los diferentes tratamientos, mientras que en los cultivos C4-HI, se observan células desprendidas del cúmulo luego de 48 hs. de tratamiento con RU-486 o ZK 230211. Las células C4-HIR, aún en cultivos 3D en matrigel, presentan una imagen similar a las C4-HI.

Para verificar si las células desprendidas eran células muertas, estudiamos la respuesta hormonal mediante la técnica de naranja de acridina y bromuro de etidio que permite diferenciar células vivas (verdes) de células muertas (rojas). Como se muestra en la Figura 3-29, las EPI C4-2-HI muestran una tasa menor de muerte celular que el

control al tratarlas con antiprogestágenos ($p<0,05$), sugiriendo un efecto protector del RU-486. Por otra parte, los cultivos en 3D de EPIs C4-HI y C4-HIR muestran mayor número de células muertas al tratarlas con RU-486 ($p<0,001$).

Figura 3-27. Células EPI C4-2-HI, C4-HI y C4-HIR creciendo en matrigel. Las células C4-2-HI y las C4-HIR muestran mayor desorganización tisular, mientras que las C4-HI se organizan en cúmulos diferenciados.

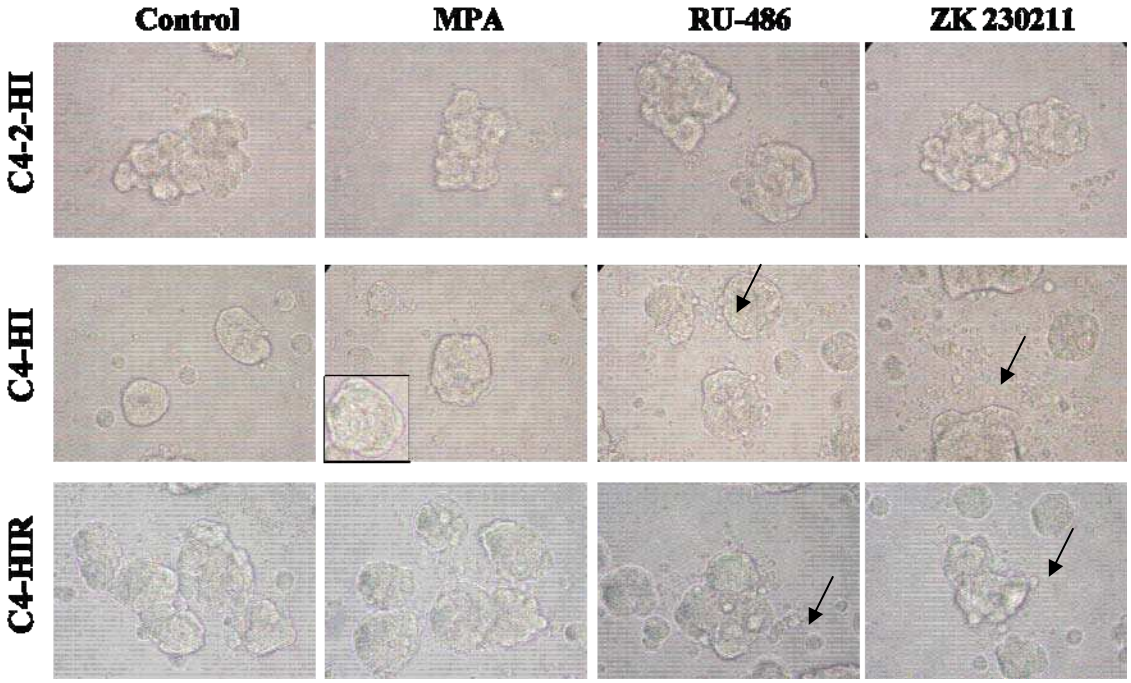


Figura 3-28. La resistencia hormonal de C4-HIR se pierde al cultivar las células en matrigel. Se trataron cultivos primarios de las células epiteliales C4-2-HI, C4-HI y C4-HIR creciendo en matrigel con medio de cultivo solo (control), MPA 10^{-9} M, RU-486 10^{-8} M y ZK 230211 10^{-8} M. Se muestran imágenes de contraste de fase. En las células C4-2-HI no se observan efectos con el RU-486 ni el ZK 230211. En las células C4-HI y en las C4-HIR se observa el desprendimiento de células con los tratamientos con RU-486 y ZK 230211 (⟶).

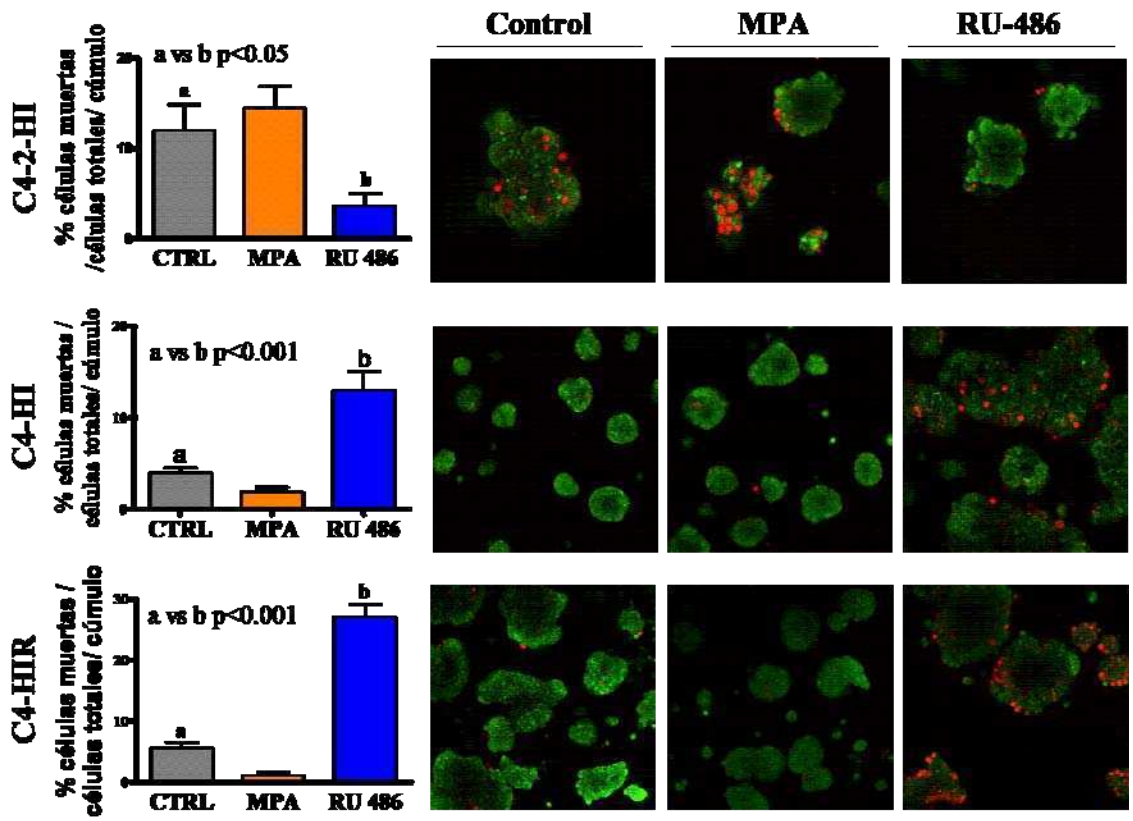
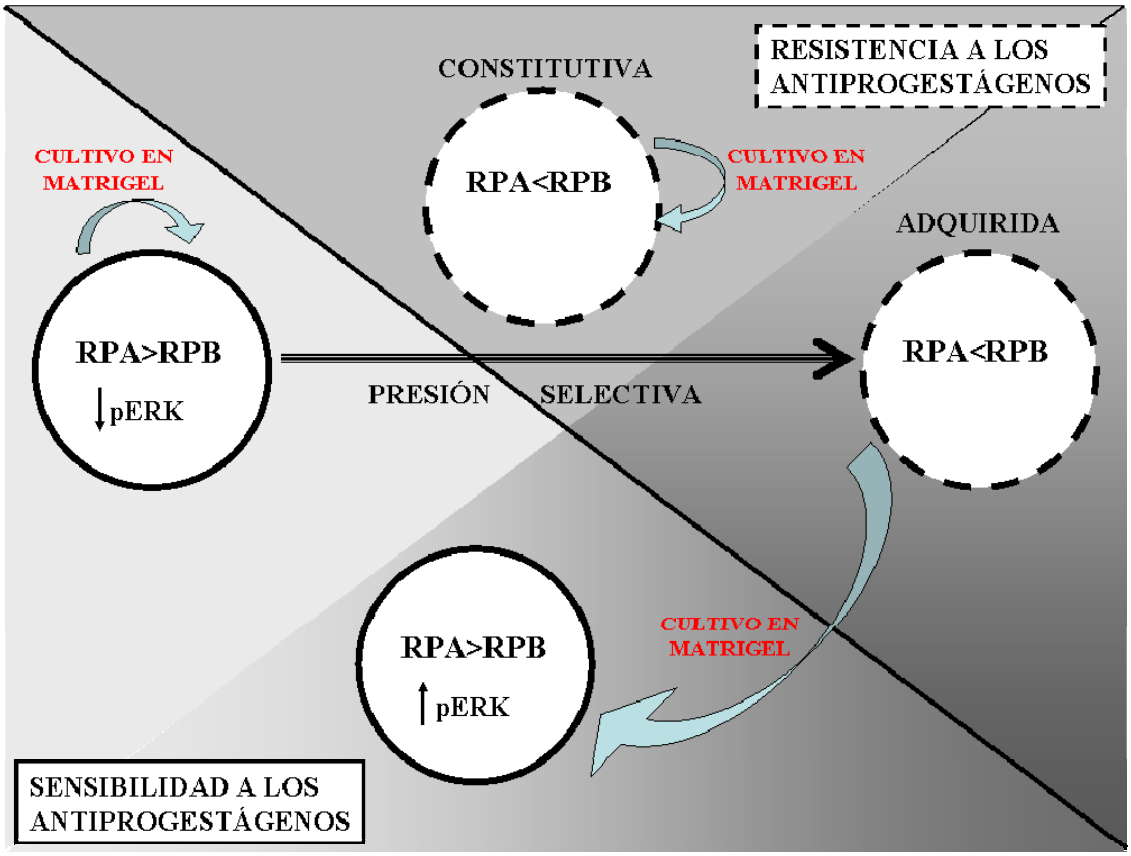


Figura 3-29. La resistencia hormonal de los cultivos C4-HIR no se recupera al cultivar las células en matrigel. Evaluación de muerte celular por la técnica de naranja de acridina y bromuro de etidio. Las células epiteliales C4-HI y C4-2-HI mantienen en matrigel su fenotipo sensible y resistente respectivamente, mientras que las células C4-HIR, resistentes *in vivo*, se vuelven sensibles al tratamiento con RU-486 cuando se las aisla del tejido y se las cultiva en matrigel. Se muestran imágenes de fluorescencia confocal de la tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio. En las células C4-2-HI no se observan efectos significativos con el MPA 10^{-9} M, pero se observa menos muerte celular con el RU-486 10^{-8} M (a *vs* b $p<0,05$). En las células C4-HI y en las C4-HIR se observa el efecto contrario, donde la muerte celular aumenta con el tratamiento con RU-486 (a *vs* b $p<0,001$). A la izquierda se muestra la cuantificación de células muertas (rojas)/células totales/cúmulo. Se realizaron tres experimentos independientes, y se cuantificaron 10 campos por experimento.

Este resultado sugiere que no es el mero contacto con el plástico el motivo de la pérdida de la resistencia adquirida de las células C4-HIR ya que el cultivo en 3D en matrigel no fue capaz de reestablecer la resistencia. De manera que el comportamiento de las células C4-HIR no pudo hasta aquí reproducirse en cultivo en plástico ni en matrigel, sugiriendo que otros factores del huésped son necesarios para mantener el fenotipo de este tumor.



PARTE VII

CÉLULAS EPITELIALES DE TUMORES CON RESISTENCIA ADQUIRIDA REINOCULADAS EN HEMBRAS BALB/c.

Para evaluar si la pérdida de resistencia de las células C4-HIR creciendo en plástico o matrigel era permanente, realizamos cultivos primarios en plástico de los tumores C4-HIR y, una vez crecidas las células, las levantamos y reinoculamos en el flanco derecho de hembras vírgenes BALB/c. Una vez prendidos los tumores, la mitad de los ratones recibieron el tratamiento control (solución fisiológica) y la otra mitad RU-486 (12 mg/kg/día; Figura 3-30)

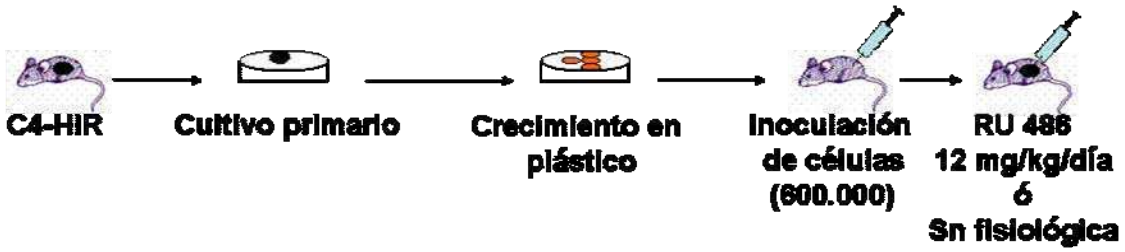


Figura 3-30. Esquema del protocolo de inoculación de células EPI C4-HIR en hembras BALB/c. 600.000 células epiteliales purificadas de tumores C4-HIR crecidas en plástico fueron inoculadas sc en el flanco derecho de hembras vírgenes BALB/c. Cuando lo tumores estaban prendidos, los ratones recibieron el tratamiento control o RU-486 (12 mg/kg/día).

En la Figura 3-31a, se muestra un experimento representativo de tres, donde los tumores tratados con solución fisiológica (controles) crecieron poco y muy lentamente, mientras que los tumores tratados con RU-486 tuvieron un crecimiento mayor ($p<0,001$). Estos últimos no sólo resultaron ser resistentes a la terapia hormonal sino que mostraron un patrón de "adicción" al RU-486. Observamos además un mayor porcentaje de mitosis en los tumores creciendo con RU-486 ($p<0,001$; Figura 3-31b). Los tumores control fueron transplantados (pasaje II) a 6 ratones, 3 se trataron con solución fisiológica y 3 con RU-486, obteniendo un resultado similar (no se muestra). Este experimento se repitió 2 veces más. El experimento II se mantuvo durante 3 pasajes, y el III sólo uno. Se obtuvieron resultados similares en todos los casos.

A continuación estudiamos el patrón de expresión de RP en los tumores C4-HIR reinoculados del grupo control. En la Figura 3-31c, observamos que los tumores reinoculados expresan mayores niveles de RPB que RPA por *western blot* ($p<0,001$), tal como se observaba en el tumor C4-HIR original. Este resultado se repitió en los 3 experimentos.

Realizamos el mismo protocolo con los tumores 59-2-HIR. Como se muestra en la Figura 3-32, al igual que en el caso de las EPI C4-HIR, las células recuperaron la resistencia al antiprogestágeno al ser reinoculadas en hembras vírgenes BALB/c.

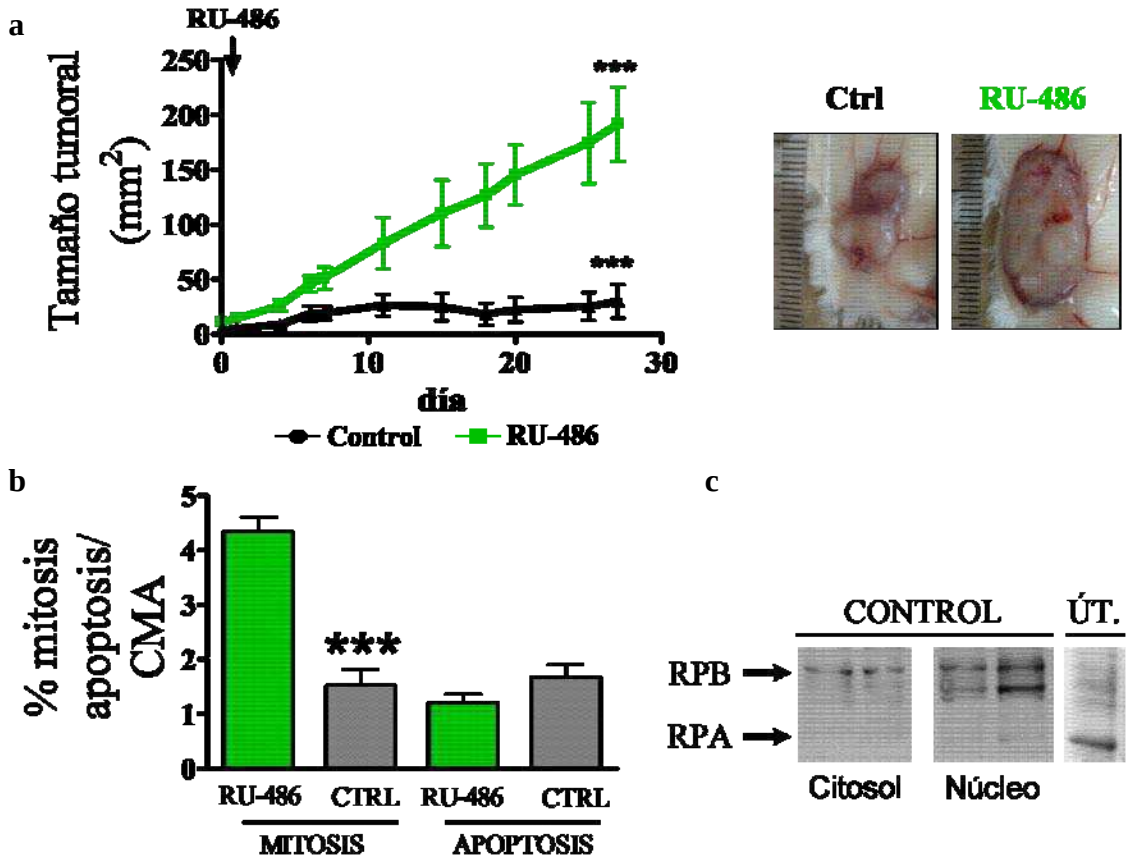


Figura 3-31. Las células epiteliales de los tumores C4-HIR crecidas en plástico recuperan la resistencia al RU-486 cuando son reinoculadas en hembras BALB/c. 600.000 células EPI de un cultivo primario de C4-HIR crecidas en plástico se reinocularon sc en hembras BALB/c. **a)** Cuando los tumores estaban palpables fueron tratados con solución control o con RU-486 (12 mg/kg/día). Los tumores mostraron un patrón adictivo al RU-486, ya que crecieron más con el antiprogestágeno que sin él ($p<0,001$). **b)** En cortes histológicos (H&E) contamos mitosis y apoptosis en los tumores control y los tratados. No se detectaron diferencias en el porcentaje de apoptosis pero si en las mitosis, que resultó mayor en los tumores tratados con RU-486 que en los controles (*** $p<0,001$; CMA: campo de mayor aumento). **c)** *western blot* para RP con el Ac. C-19 en extractos nucleares y citosólicos ÜT: útero.

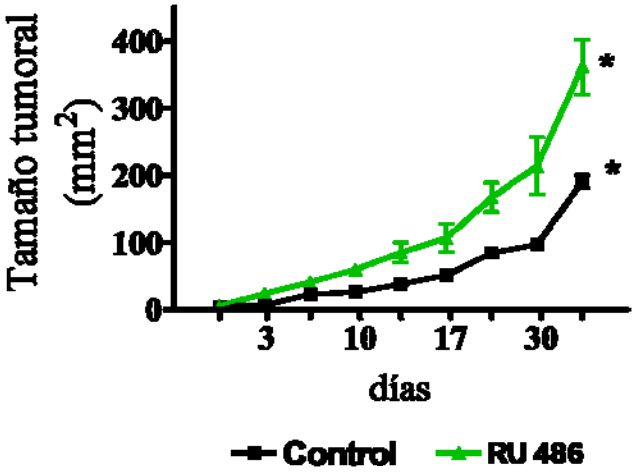
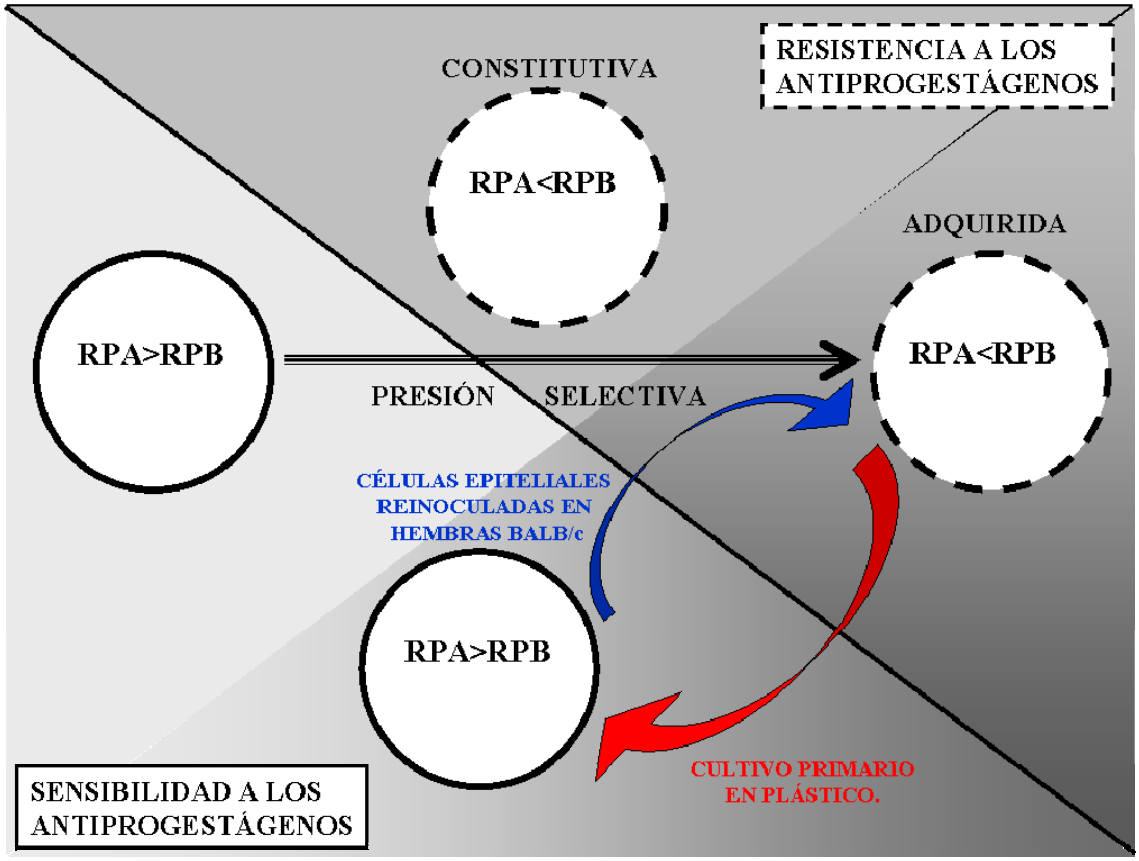


Figura 3-32. Las células epiteliales de los tumores 59-2-HIR crecidas en plástico recuperan la resistencia al RU-486 cuando son reinoculadas en hembras BALB/c. 600.000 células EPI de un cultivo primario de 59-2-HIR crecidas en plástico se reinocularon sc en hembras BALB/c. Cuando los tumores estaban palpables fueron tratados con solución control o con RU-486 (12 mg/kg/día). Los tumores mostraron un patrón adictivo al RU-486, ya que crecieron más con el antiprogestágeno respecto al control ($p<0,01$).

Los tumores con resistencia adquirida C4-HIR y 59-2-HIR que pierden la resistencia cuando son cultivados en plástico, recuperan el fenotipo resistente cuando las células epiteliales se inoculan en ratones hembras BALB/c. Cuando analizamos el patrón de expresión de RP en estos nuevos tumores, observamos que expresan mayores niveles de RPB que de RPA. Nuevamente observamos que la expresión de RPA disminuye en los tumores resistentes a los antiprogestágenos.



PARTE VIII

METILACIÓN DE *RPA*

Con los resultados previamente expuestos concluimos que la resistencia a los antiprogestágenos está asociada a bajos niveles de expresión de RPA y mayores de RPB, y que en los tumores con resistencia adquirida, C4-HIR y 59-2-HIR la regulación de la expresión de RPA es diferente a la de los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI y 59-HI ya que en estos últimos: a) la expresión no es modulable por E2 y b) la expresión no cambia cuando células aisladas son cultivadas en plástico o matrigel.

Esta reversión de la resistencia hormonal nos hizo pensar que efectos epigenéticos podrían regular la expresión de RPA en los tumores resistentes. Nos propusimos entonces investigar si el promotor de *RPA* está silenciado por metilación en los tumores resistentes. Para ello: a) definimos las islas CpG en la secuencia promotora y del primer exón del *RP* y diseñamos *primers* específicos y b) analizamos por PCR específica para metilación (*Methylation specific PCR*, MSP) el grado de metilación de *RPA* en tumores sensibles, resistentes adquiridos y constitutivos de las familias C4 y 59.

a) Islas CpG en la secuencia del *RP* y diseño de *primers*.

En la Figura 3-33, observamos un esquema del promotor de *RP* con la ubicación de las CGs en ambas isoformas. Una vez definidas las islas CpG diseñamos 4 pares de *primers* específicos con el software *Methyl primer Express v1.0*, 3 de ellos contenidos en el promotor de *RPA* y un par contenido dentro de la secuencia promotora de *RPB*. En este último caso sólo se utilizó un par de *primers* ya que la densidad de CGs es muy baja como para definir una isla CpG.

b) Análisis de la metilación de *RPA* por MSP.

En la Figura 3-34a, vemos el resultado de la MSP para las tres variantes tumorales de las familias C4 y 59. Como se esperaba, en los tumores sensibles C4-HI Y 59-2-HI los sitios CpG estudiados no están metilados. Curiosamente, en los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI y 59-HI, estos mismos sitios CpG se encuentran metilados, mientras que en los dos tumores con resistencia adquirida C4-HIR y 59-2-HIR, no. Pese a que observamos metilación con el par de primers PR1 incluido en el promotor de *RPB*, no puede considerarse como mecanismo regulador de la expresión de esta isoforma ya que la densidad de CpGs es tan baja que no podemos definir la presencia de una isla CpG (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/index.html; [30]). Utilizamos como control de ADN metilado, ADN de linfocitos de ratón tratado con la enzima *SssI* metiltransferasa, y como control de ADN no metilado se utilizó el ADN de

linfocitos sin tratar que se encuentra constitutivamente desmetilado (Zysman *et al.* 2002; Figura 3-34b).

Los productos de la PCR utilizando el par de primers PR4 con el ADN de los tumores sensibles, resistentes constitutivos y adquiridos, fueron clonados y secuenciados para analizar el grado de metilación de la isla CpG contenida en el producto de PCR. En la Figura 3-34c, se muestra que en los dos tumores sensibles (C4-HI y 59-2-HI) y en los dos con resistencia adquirida (C4-HIR y 59-2-HIR) el 100% de los sitios CpG se encuentra desmetilado mientras que en los C4-2-HI hay un 89,9 ± 2,2% de metilación y un 88,8 ± 3,2% en los 59-HI. Se muestra un diagrama ilustrativo de este resultado.

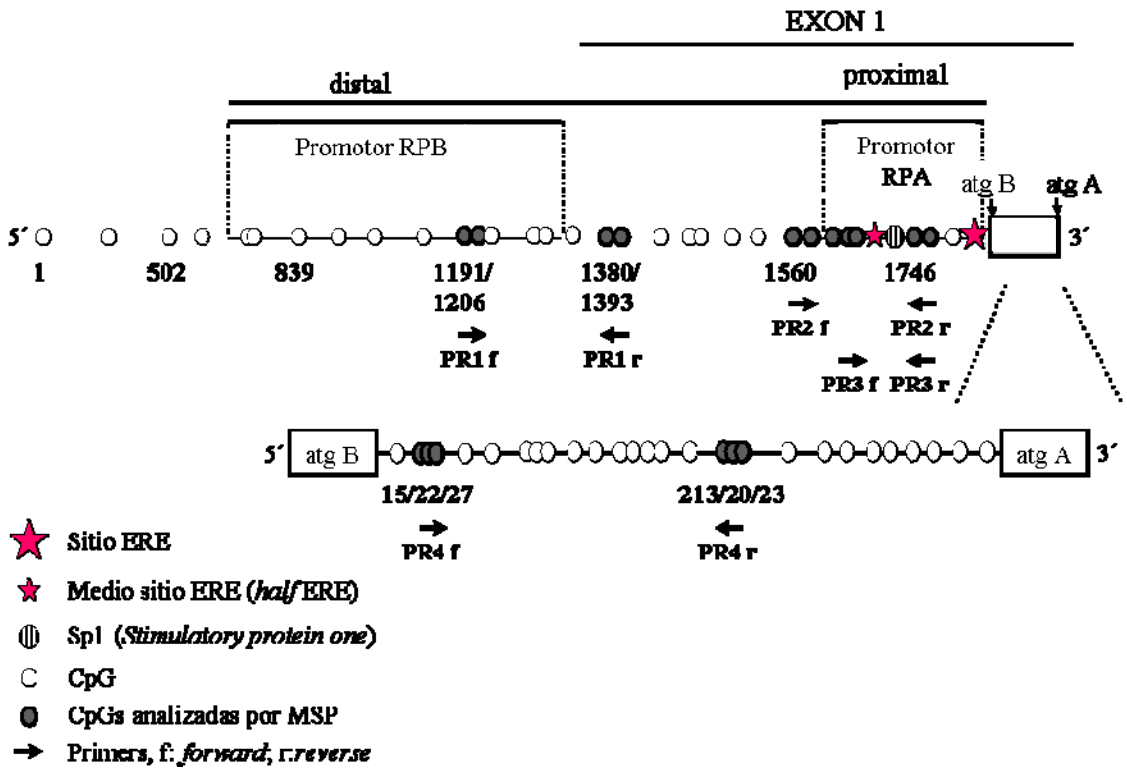


Figura 3-33. Diagrama de los promotores de *RPA* y *RPB* y los 4 pares de *primers* utilizados. ERE: elemento respondedor de estrógenos. Sp1: *stimulatory protein one.* Se enumeran las CpG de manera de visualizar la distancia entre ellas.

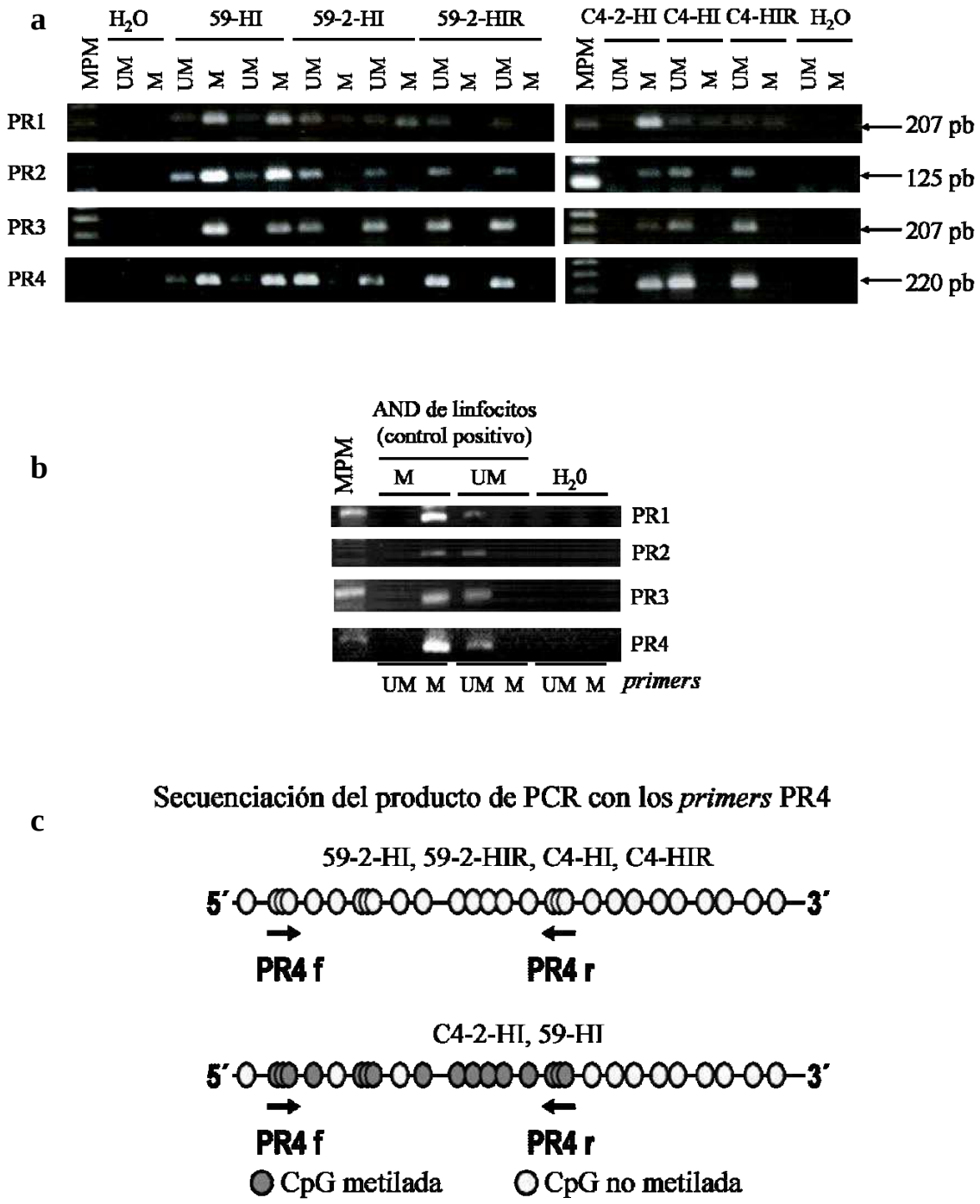
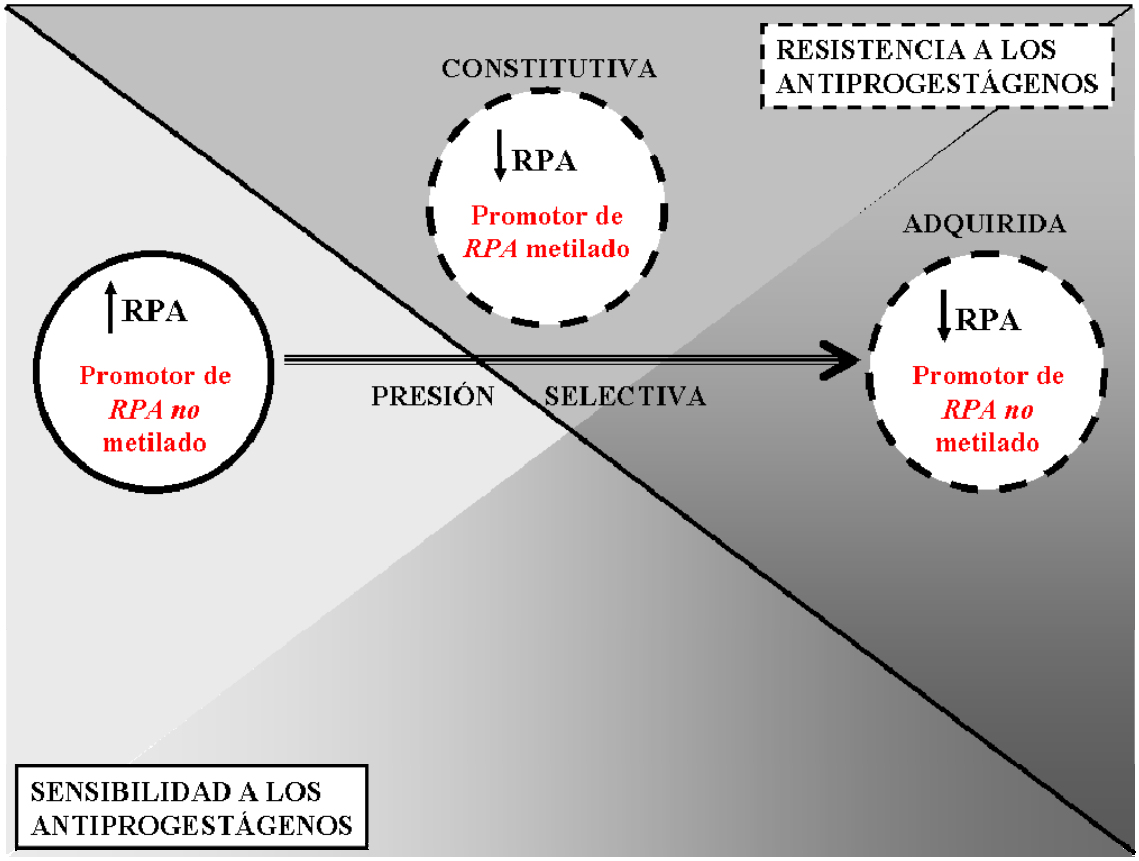


Figura 3-34. Metilación del promotor de *RP* detectado por la técnica de MSP: Los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI y 59-HI tienen esta secuencia metilada. *Continúa*

a) Muestras de ADN tratadas con bisulfito de los tumores sensibles (C4-HI y 59-2-HI), de los resistentes adquiridos (C4-HIR y 59-2-HIR) y de los resistentes constitutivos (C4-2-HI y 59-HI) se amplificaron por PCR con *primers* específicos. Se incluyeron controles sin ADN (H_20). Sólo los tumores con resistencia constitutiva mostraron bandas al utilizar los *primers* para ADN metilado (M). **b)** Utilizamos ADN normal de linfocitos de ratón como control de ADN desmetilado (UM), y este mismo ADN tratado con la enzima metiltransferasa *SssI* como control de ADN metilado (M). **c)** Los productos de PCR amplificados con el par de *primers* PR4 (M y UM) de tres muestras diferentes los tumores sensibles (C4-HI, 59-2-HI), resistentes constitutivos (C4-2-HI, 59-HI) y adquiridos (C4-HIR, 59-2-HIR) fueron clonados en bacterias competentes E. Coli TOP-10 y 5 colonias de cada muestra fueron secuenciadas (Macregen Inc., Korea). Se muestra un diagrama ilustrativo de los sitios CpG metilados y no metilados en estas muestras. En los dos tumores sensibles (C4-HI y 59-2-HI) y en los dos con resistencia adquirida (C4-HIR y 59-2-HIR) el 100% de los sitios CpG está desmetilado mientras que en los C4-2-HI hay un 89,9 ± 2,2% de metilación y un 88,8 ± 3,2% en los 59-HI.

Concluimos con estos resultados que la metilación del promotor de *RPA* explica el silenciamiento de esta isoforma en los tumores con resistencia constitutiva a los antiprogestagenos.



PARTE IX

REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA CONSTITUTIVA A LOS ANTIPROGESTÁGENOS: REEXPRESIÓN DE RPA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON EL AGENTE DESMETILANTE 5AZAdC.

La expresión de RPA está regulada por metilación de su promotor en los tumores con resistencia constitutiva. Nos propusimos entonces investigar si era posible inducir la expresión de esta isoforma en los tumores C4-2-HI y 59-HI con el agente desmetilante 5 aza 2´deoxicitidina (5azadC) y sensibilizarlos a la terapia con el RU-486. Para esto realizamos a) tratamiento *in vitro* con 5azadC de las EPI con resistencia constitutiva C4-2-HI y 59-HI b) tratamiento *in vivo* con 5azadC y RU-486 de los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI y 59-HI. Además para confirmar que el efecto del RU-486 es vía RPA, c) estudiamos la expresión del RG en tumores con resistencia constitutiva al RU-486, tratados con 5azadC.

a) Tratamiento *in vitro* con 5azadC de las células EPI con resistencia constitutiva.

La relación entre los niveles de expresión de RPA y la sensibilidad a los antiprogestágenos que hemos observado en los resultados previos sugieren que si logramos reexpresar RPA en los tumores con resistencia constitutiva, éstos podrían sensibilizarse a la terapia con el RU-486. Para esto tratamos las EPI purificadas de tumores C4-2-HI y 59-HI con 5azadC y evaluamos los niveles de expresión de RPA y la respuesta a los antiprogestágenos.

Cultivos primarios de los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI y 59-HI fueron tratados con 5azadC (5.10^{-7} y 5.10^{-6} M respectivamente) por 96 hs. Observamos en la Figura 3-35, un aumento en los niveles de expresión de RPA ($p<0,001$) por IF (Figura 3-35a) y por *western blot* (Figura 3-35b), pero no se detectan cambios significativos en la expresión de RPB utilizando un anticuerpo específico para esta isoforma (Ab-6). . La diferencia en las dosis utilizadas de 5azadC se debe a que en los cultivos primarios provenientes de los tumores 59-HI tratados con una dosis de 5.10^{-7} M de 5azadC no obtuvimos resultados significativos que sí pudieron reproducirse con una dosis mayor. Como control de este experimento tratamos con 5azadC células EPI purificadas de tumores C4-HI y 59-2-HI que expresan RPA. Cuando analizamos la expresión de esta isoforma de RP, observamos que no se modifica con el tratamiento con el agente desmetilante (no se muestra).

Para estudiar si la reexpresión de RPA induce la sensibilización a los antiprogestágenos, tratamos las células con RU-486 5.10^{-7} M + 5azadC (5.10^{-7} M para C4-2-HI; 5.10^{-6} M para 59-HI) y evaluamos la proliferación celular por incorporación de ^{3}H-timidina. Como muestra la Figura 3-35c, sólo el tratamiento combinado de

5azadC + RU-486 resultó inhibitorio de la proliferación celular ($p<0,001$), pero no los tratamientos individuales.

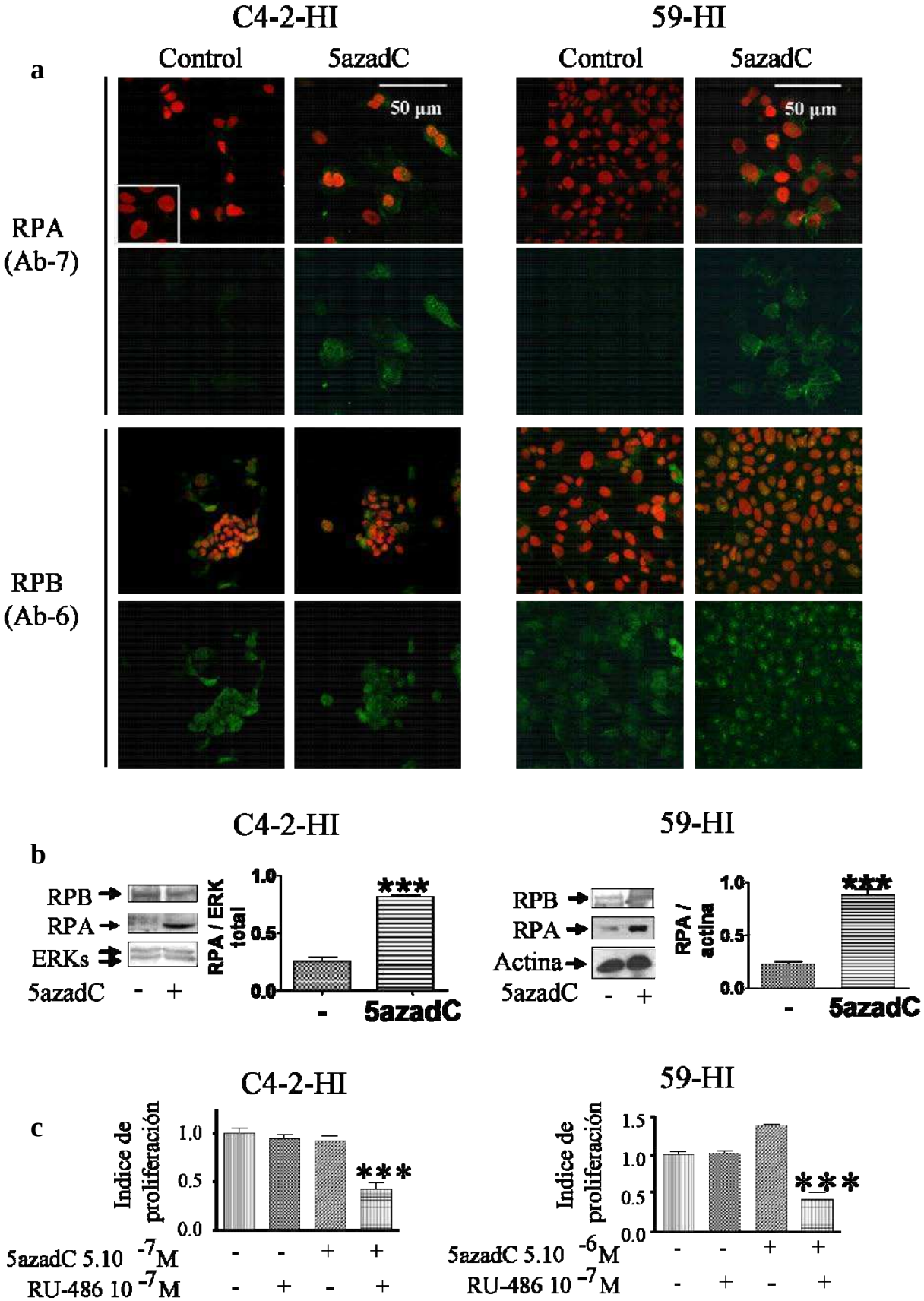


Figura 3-35. Tratamiento con 5azadC y RU-486 de cultivos primarios de tumores con resistencia constitutiva. *Continúa*

a) Expresión de RPA (Ab-7) y RPB (Ab-6) en células control o tratadas con 5azadC. Las células se hicieron crecer en *chamber slides* con medio con SFB 10% y fueron tratadas durante 96 hs con 5azadC (C4-2-HI: 5.10^{-7} M; 59-HI: 5.10^{-6} M) o SFB 10% (control) y procesadas para inmunofluorescencia. Verde: FITC- RPA, ROJO: núcleos teñidos con IP. **b)** La expresión de RPA y RPB fue estudiada por *western blot* en extractos totales de cultivos primarios de los tumores con resistencia constitutiva tratados con o sin 5azadC utilizando, los Ac. Ab-7 y Ab-6, como se describió previamente. RPA se cuantificó en 3 *western blots* utilizando extractos diferentes. Detectamos un incremento de RPA en las células tratadas con el agente desmetilante ($p<0,001$). **c)** Efecto del 5azadC y el RU-486 en estudios de proliferación celular por incorporación de ^{3}H-timidina. Las células se sembraron en placas de 96 hoyos y fueron tratadas con SFB 10%, 5azadC, RU-486 o ambos, en presencia de SFB 10% por 48hs. Sólo el tratamiento combinado de 5azadC y RU-486 inhibió la proliferación celular (*** $p<0,001$ tratamientos *vs* control). El índice de proliferación se calculó como cpm tratamientos/ cpm control (media ± ES). Se muestra un experimento representativo de tres, utilizando octuplicados en cada uno de ellos.

b) Tratamiento *in vivo* con 5azadC y RU-486 de los tumores con resistencia constitutiva.

Tratamos animales portadores de los tumores C4-2-HI y 59-HI con la solución vehículo (DMSO: H_20, 1:1), con 5azadC (0,75 mg/kg/día por medio para C4-2-HI; 1 mg/kg/día por medio para 59-HI), RU-486 (12 mg/kg/día) ó 5azadC + RU-486. Inicialmente los tumores 59-HI recibieron una dosis de 5azadC de 0,75mg/kg/día por medio, pero la inhibición del crecimiento no fue significativa, es por esto que decidimos aumentar la dosis a 1mg/kg/día por medio. Como se observa en las curvas de crecimiento de la Figura 3-36, en ambos casos la terapia combinada inhibió el crecimiento tumoral, siendo esta inhibición más marcada en los tumores C4-2-HI. A la derecha de cada curva de crecimiento se muestran imágenes de los tumores al final de los tratamientos. Analizamos cortes histológicos de los tumores al finalizar las terapias y observamos, como se muestra en la Figura 3-37, que la inhibición generada por el agente desmetilante y el antiprogestágeno se vio acompañada de un incremento del componente estromal ($p<0,001$), aumento de la apoptosis y disminución de la mitosis (Tabla 3-1). Este último resultado se encuentra reflejado por los altos niveles de expresión de la proteína apoptótica BAX y los bajos niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-xl detectados por inmunohistoquímica en cortes de tumor obtenidos al final de los tratamientos (Figura 3-38).

Cuando analizamos la expresión de RPA por *western blot* observamos un incremento tanto en la fracción nuclear como en la citoplasmática en los tumores C4-2-HI ($p<0,01$). Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica (Figura 3-39a). Por otra parte, en los tumores 59-HI observamos por inmunohistoquímica un incremento en la fracción citoplasmática y perinuclear ($p<0,01$; Figura 3-39b). Es probable que esto último se deba a la falta de ligando, y por este motivo RPA se acumularía en el citoplasma.

Asimismo, con ayuda de la patóloga Dra. Silvia Vanzulli (Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires) realizamos análisis histológicos de hígado, riñón y bazo en ratones tratados con el agente desmetilante sin detectarse signos de toxicidad (no se muestra).

Como control de este experimento, tratamos ratones transplantados con los tumores C4-HIR que, pese a expresar bajos niveles de RPA, no regulan la expresión de esta isoforma por metilación de su promotor, con 5azadC (0,75 mg/kg/día por medio), RU-486 (12 mg/kg/día) ó 5azadC + RU-486. En la figura 3-40, se muestra que, como se

esperaba, no hubo inhibición del crecimiento tumoral con el tratamiento combinado de 5azadC + RU-486. En la misma figura se muestran imágenes de los tumores al final de los tratamientos.

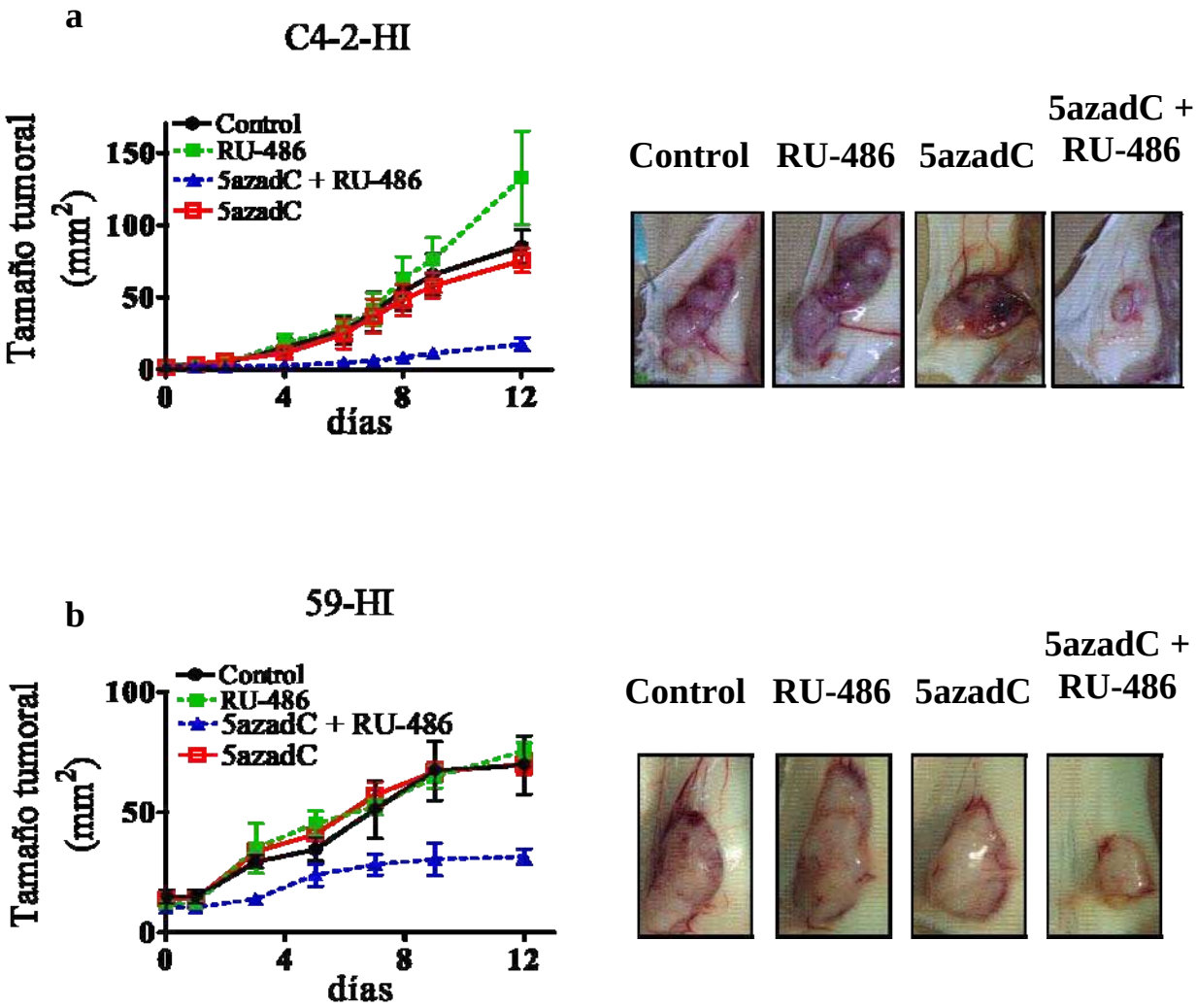


Figura 3-36. El tratamiento combinado con 5azadC y RU-486 resultó inhibitorio del crecimiento tumoral en tumores C4-2-HI y 59-HI. Curvas de crecimiento de los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI (a) y 59-HI (b) tratados con 5azadC (0,75 mg/kg/día por medio, 1 mg/kg/día por medio respectivamente; ip) y RU-486 (12 mg/kg/día; sc). Los tumores se transplantaron en ratones hembras BALB/c. Cuando los tumores estaban palpables (5/grupo) se los trató con solución control (DMSO:H_20, 1:1), RU-486 y/o 5azadC. El tamaño de los tumores fue medido día por medio con un calibre. Se observa inhibición tumoral sólo con el tratamiento combinado. A la derecha se muestran imágenes de un tumor representativo de cada tratamiento al final del tratamiento.

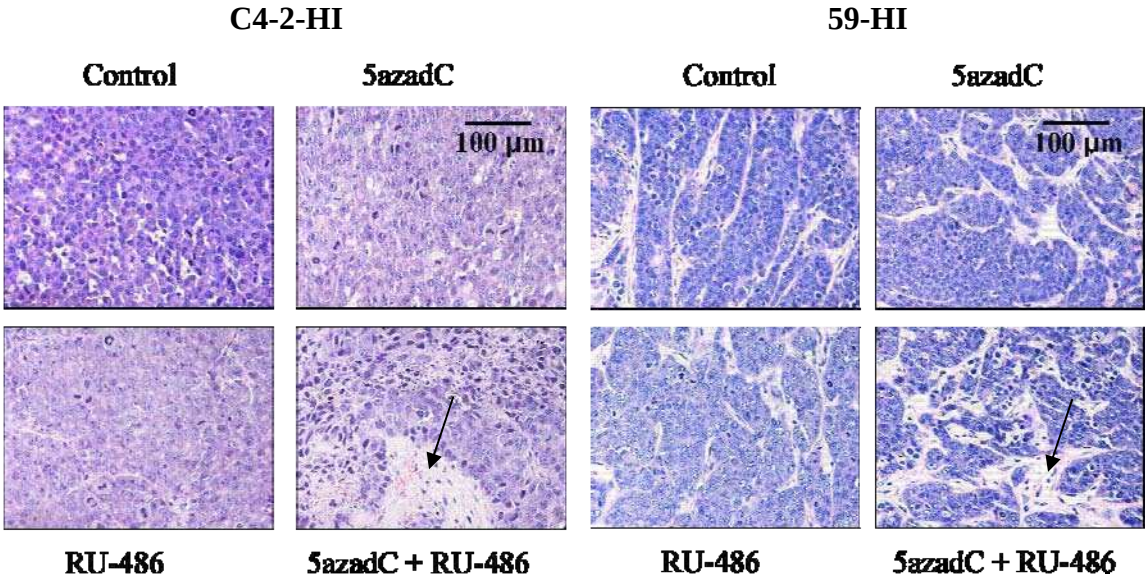


Figura 3-37. El tratamiento con 5azadC y RU-486 inhibe el crecimiento tumoral de C4-2-HI y 59-HI y esta inhibición se ve acompañada por un incremento estromal. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con H&E que muestran un cambio en la histoarquitectura mostrando un incremento en el componente estromal (⟶) en los tumores tratados con 5azadC + RU-486 (p<0,001).

	59-HI Media± ES		C4-2-HI Media± ES	
	Control	**5azadC + RU-486**	**Control**	**5azadC + RU-486**
Indice apoptótico	1 ± 0,19	3, 67 ± 0, 09 ***	1± 0,22	3, 31 ± 0,02 ***
Indice mitótico	1 ± 0, 069	0,49 ± 0,21*	1± 0,08	0,38 ± 0,1*

Tabla 3-1. Indice apoptótico y mitótico observados en los tumores con resistencia constitutiva 59-HI y C4-3-HI tratados con RU-486 + 5azadC. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 tratado *vs.* control.

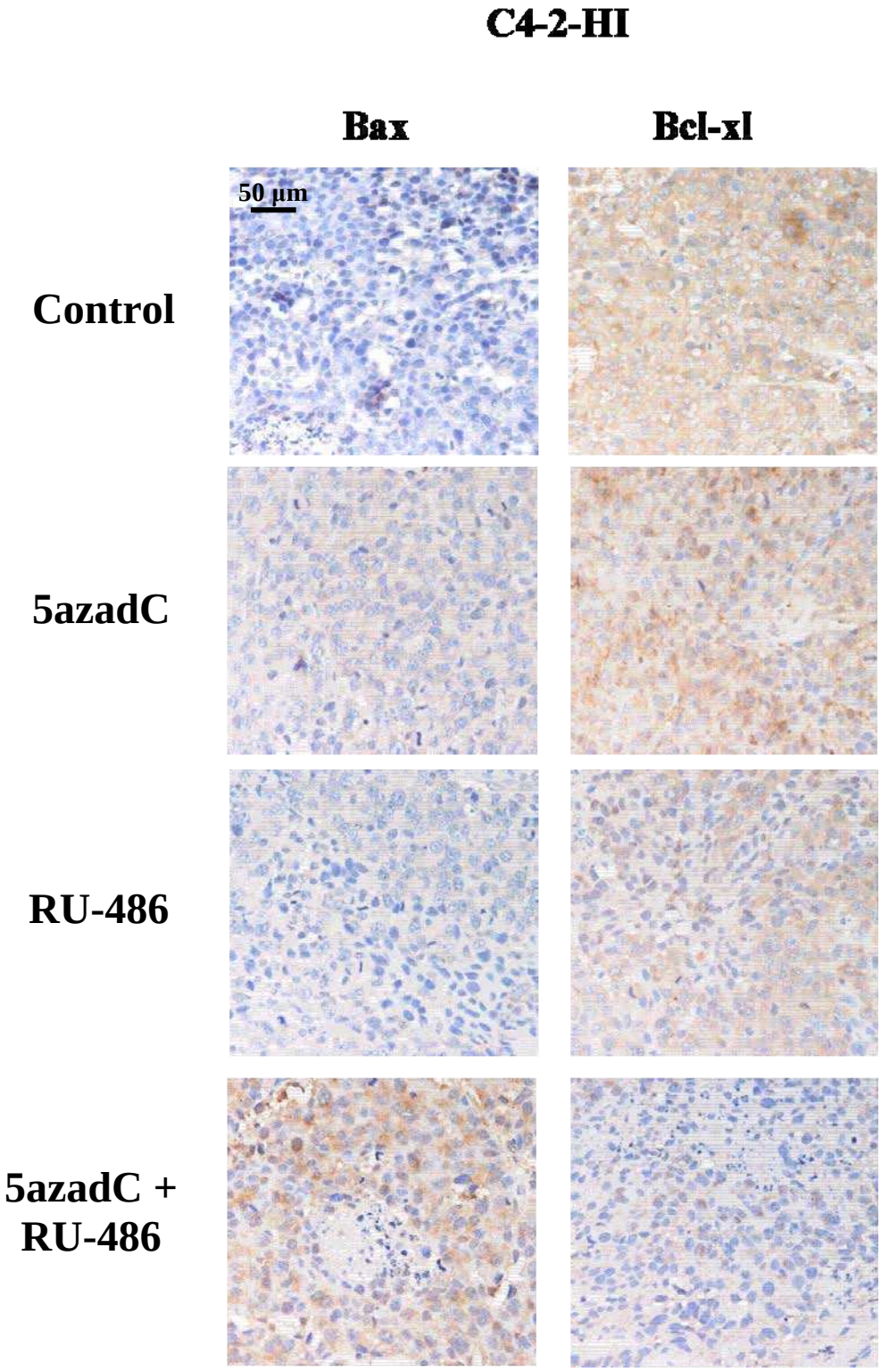


Figura 3-38. Los niveles de Bax aumentan y los de Bcl-xl disminuyen sólo en aquellos tumores tratados con 5azadC + RU-486. Se estudió la expresión de Bax y Bcl-xl por inmunohistoquímica en cortes en parafina de los tumores control, tratados con 5azadC, RU-486 ó 5azadC + RU-486. Se observa mayor tinción para Bax y menor para Bcl-xl sólo en los tumores que recibieron el tratamiento combinado.

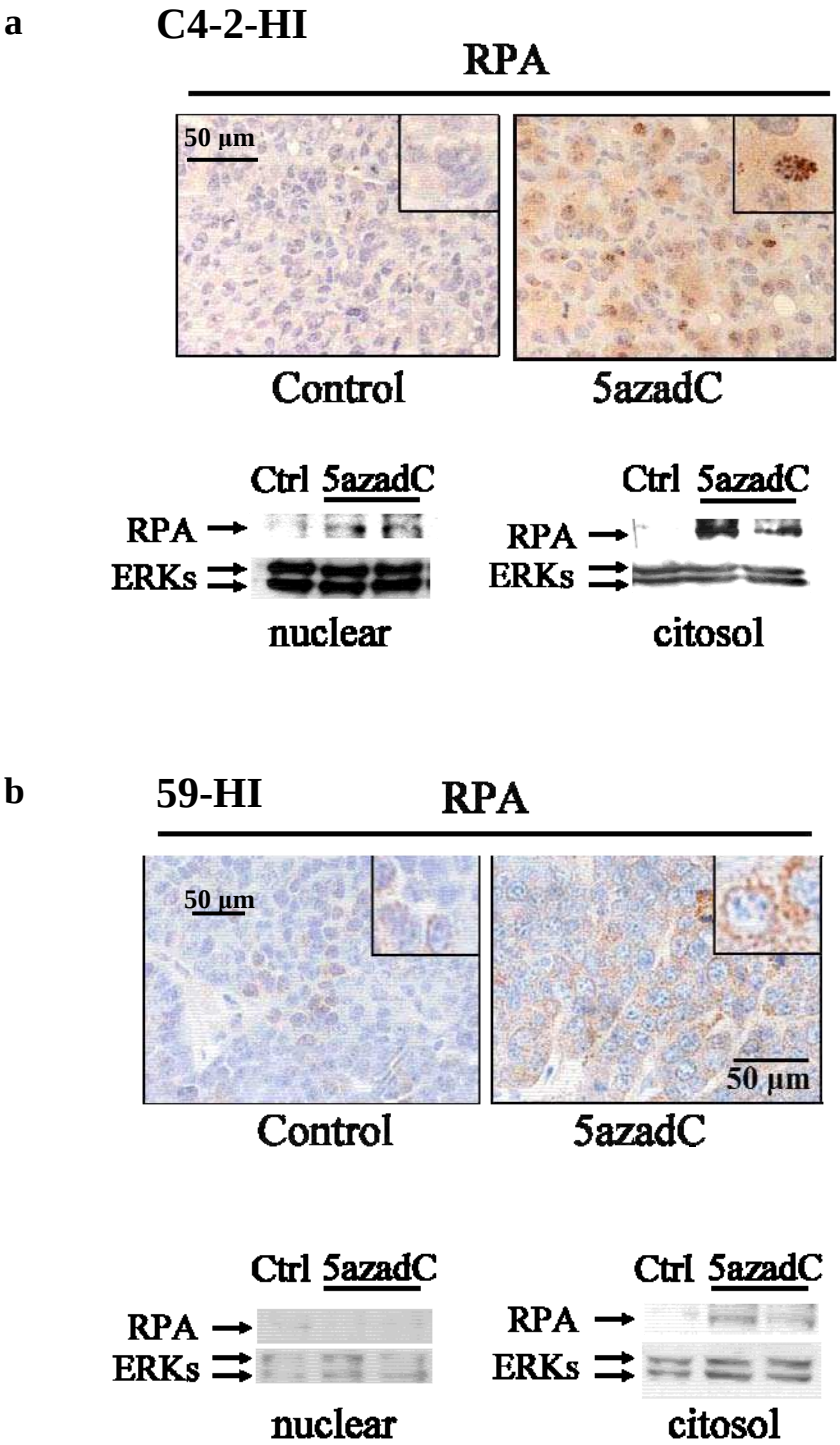


Figura 3-39. Inmunohistoquímica y *Western blot* para RPA en los tumores C4-2-HI (a) y 59-HI (b) tratados con 5azadC. *Continúa.*

Inmunohistoquímica. Se estudió la expresión de RPA utilizando el Anticuerpo policlonal C19. Los tumores tratados con 5azadC re-expresan RPA. En los tumores C4-2-HI se observa tinción en citoplasma y núcleo mientras que en los 59-HI se observa marca perinuclear. *western blot* para RPA. En los tumores C4-2-HI tratados con 5azadC se observa un incremento en RPA en la fracción citosólica ($p<0,01$) y en la nuclear ($p<0,005$), mientras que en los tumores 59-HI tratados con 5azadC el incremento se observa sólo en la fracción citosólica ($p<0,01$). Se muestra un *western blot* representativo de tres. Las ERKs fueron utilizadas como control de carga. Barra: 50 μm.

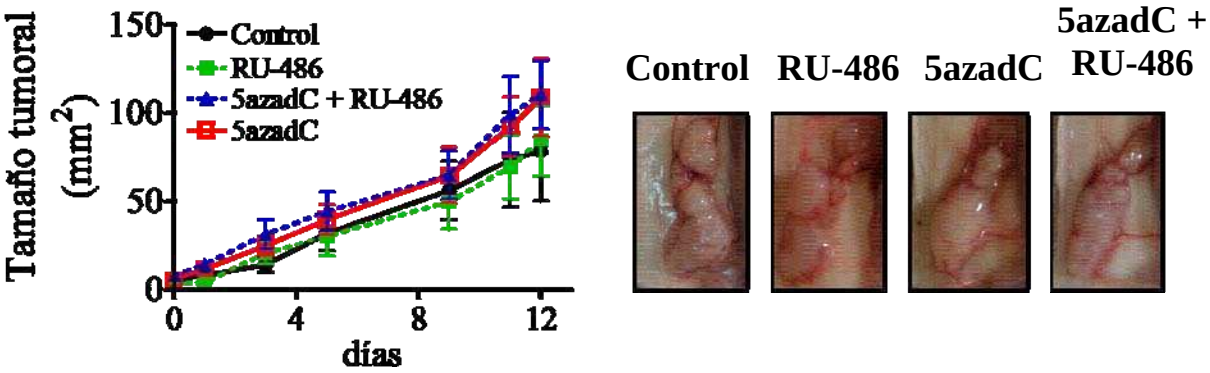
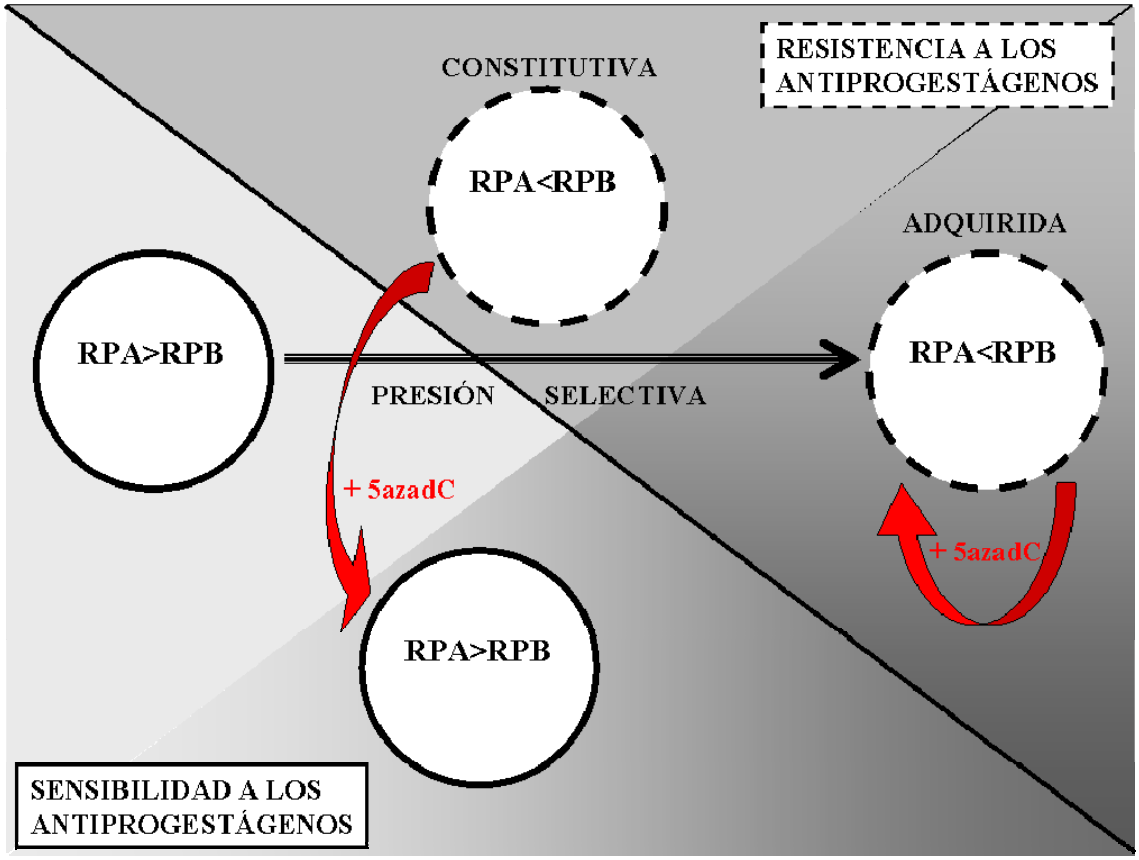


Figura 3-40. Los tumores con resistencia adquirida C4-HIR no revierten el fenotipo resistente cuando son tratados con el agente desmetilante 5azadC. Cuando los tumores eran palpables, se comenzó con los tratamientos. Los animales (5/grupo) fueron tratados con la solución control (DMSO:H_20, 1:1), RU-486 (12 mg/kg/día sc.) y/ó 5azadC (0,75 mg/kg/día por medio, ip.). Los tumores se midieron día por medio con un calibre. Ninguno de los tratamientos inhibió el crecimiento tumoral. A la derecha se muestran imágenes de un tumor representativo de cada grupo al final del tratamiento.

Estos resultados nos muestran nuevamente que RPA sería responsable de mediar los efectos inhibitorios del RU-486, ya que en los tumores con resistencia constitutiva, la reexpresión de esta isoforma mediante el tratamiento con el agente desmetilante 5azadC sensibiliza a los tumores C4-2-HI y 59-HI a la terapia con el antiprogestágeno.



c) Expresión del receptor de glucocorticoides (RG) en tumores con resistencia constitutiva al RU 486 tratados con 5azadC.

Para investigar si el tratamiento con 5azadC afecta la expresión del RG, y para descartar un efecto posible del RU-486 mediado por el RG, nos propusimos a) estudiar la expresión del RG en tumores C4-2-HI tratados o no con 5azadC *in vitro* e *in vivo* y b) estudiar la respuesta de los tumores C4-2-HI al tratamiento con 5azadC y el antiprogestágeno aglepristona, que presenta menor actividad antiglucocorticoide que el RU-486.

a) Expresión del RG en tumores C4-2-HI tratados o no con 5azadC *in vitro* e *in vivo*.

En la Figura 3-43a, observamos por inmunofluorescencia *in vitro*, una reducción en la expresión del RG en células C4-2-HI luego del tratamiento con el agente desmetilante ($p<0,001$). Cuando estudiamos la expresión del RG en extractos nucleares y citosólicos del tumor por *western blot*, obtuvimos el mismo resultado (Figura 3-43b), descartando así cualquier posible efecto mediado por el RG.

b) Respuesta de los tumores C4-2-HI al tratamiento con 5azadC y aglepristona.

Estudiamos *in vivo* la terapia combinada con el antiprogestágeno aglepristona, que presenta muy baja actividad antiglucocorticoide (Agle; depot de 3 mg/semana) y 5azadC (0,75 mg/kg/día). Como se muestra en la Figura 3-44, la combinación de aglepristona y 5azadC inhibió el crecimiento tumoral ($p<0,001$), al igual que el RU-486 y 5azadC, sugiriendo que el efecto observado es a través de RPA.

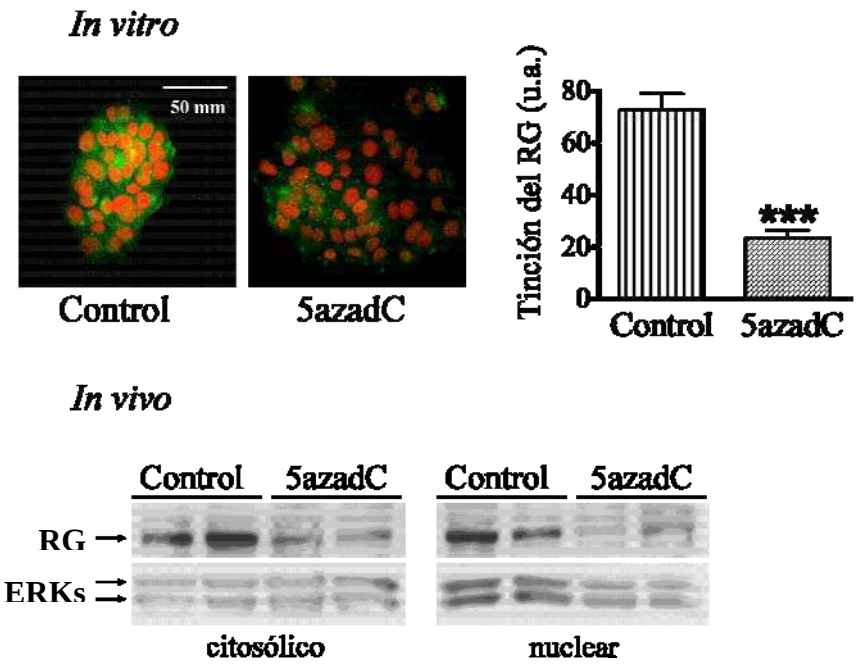


Figura 3-43. La expresión del RG disminuye con el tratamiento con 5azadC *in vitro e in vivo* en los tumores C4-2-HI. a) Expresión del RG en células control o tratadas con 5azadC. Las células se hicieron crecer en *chamber slides* en medio de cultivo con SFB 10%, se trataron durante 96 hs con 5azadC (5.10^{-7} M) o SFB 10% (control) y se procesaron para inmunofluorescencia. Verde: FITC- RG, Rojo: núcleos teñidos con IP. Las células tratadas con 5azadC expresan niveles menores de RG (***p<0,001). **b)** *western blot* para RG en extractos citosólicos y nucleares de tumores C4-2-HI.

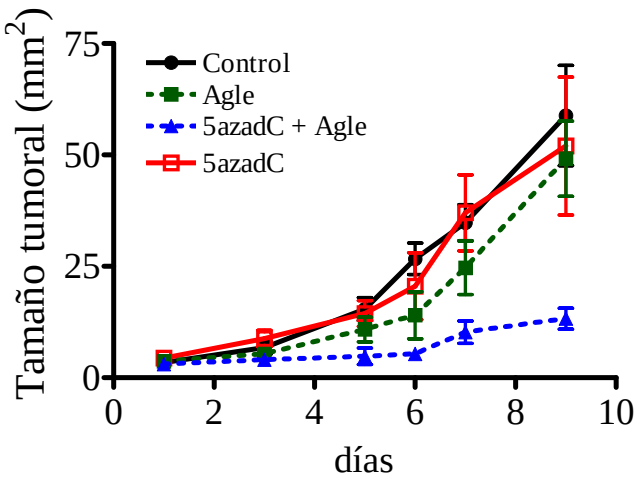


Figura 3-44. Curva de crecimiento de los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI tratados con 5azadC y aglepristona. Los tumores se transplantaron en ratones hembras BALB/c. Cuando los tumores estaban palpables (5/grupo) se los trató con la solución vehículo (DMSO:$H_2$0 1:1), aglepristona (depot de 3 mg/semana) y/o 5azadC (0,75 mg/kg/día; ip). El tamaño de los tumores fue medido día por medio con un calibre. Se observa inhibición tumoral sólo con el tratamiento combinado (p<0,001).

Estos resultados sugieren que los efectos inhibitorios generados por el antiprogestágeno RU-486 estarían mediados por RPA y no por los RG, ya que mientras que los tumores expresan bajos niveles de RPA, sí expresan RG. Si fuesen los RG los que intervienen en la respuesta inhibitoria deberíamos ver inhibición en los tumores tratados sólo con el antiprogestágeno. Asimismo, la disminución en los niveles del RG y el aumento de RPA con el tratamiento con 5azadC nos indica también que el efecto inhibitorio de 5azadC + RU-486 estaría mediado por RPA.

PARTE X

ANÁLISIS DE LA EXPRESION DE LAS DNA METILTRANSFERASAS: Dnmt1, Dnmt 3a, Dnmt 3b

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE E-Caderina, p16, PTEN, Rb y RARβ

Análisis de la expresión de las dna metiltransferasas: Dnmt1, Dnmt 3a, Dnmt 3b

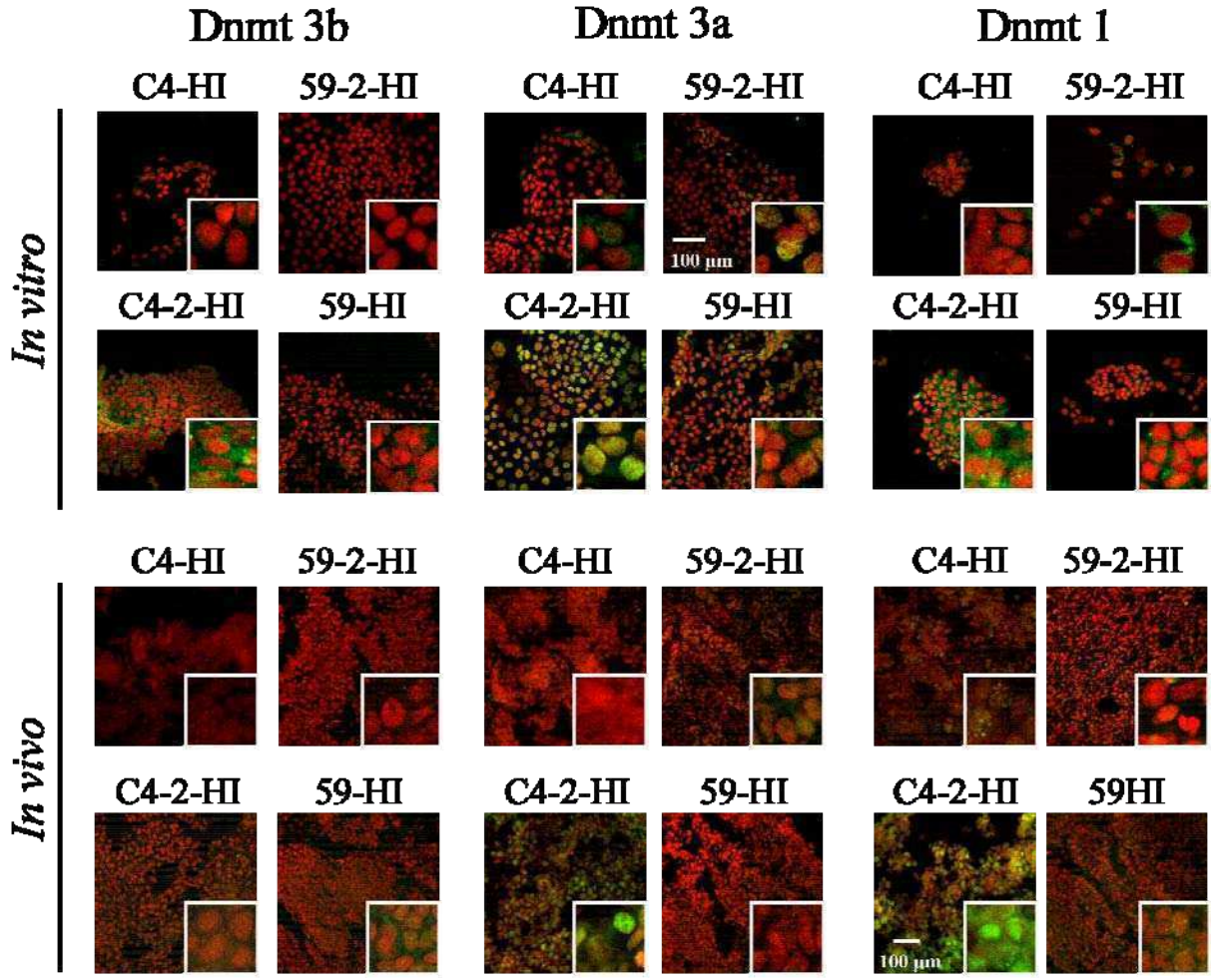
Las Dnmt regulan la metilación de las islas CpG, es por este motivo que decidimos estudiar si las mismas están reguladas diferencialmente en los tumores sensibles y en los resistentes constitutivos a los antiprogestágenos.

En la Figura 3-41a, observamos por IF que las EPI C4-2-HI creciendo en plástico expresan mayores niveles de Dnmt1 ($p<0,001$) y de Dnmt3a y 3b ($p<0,05$) que las células C4-HI, y, que las EPI 59-HI expresan mayores niveles de Dnmt3b que las 59-2-HI ($p<0,001$).

Cuando estudiamos estas mismas proteínas en cortes de crióstato obtuvimos resultados similares a los de los cultivos primarios, excepto que los 59-HI no sólo muestran mayores niveles de la Dnmt3b sino también de la Dnmt1, sugiriendo que el microambiente tumoral podría estar también regulando la expresión de estas metilasas (Figura 3-41a). Estos resultados se corroboraron por *western blot* utilizando extractos nucleares de los tumores (Figura 3-41b).

Nuestros resultados sugieren que los mayores niveles de Dnmt1 y 3b estarían relacionados con la metilación de RPA en los tumores con resistencia constitutiva. La mejor respuesta al tratamiento con 5azadC observada *in vivo* de los tumores C4-2-HI respecto a los 59-HI podría deberse a que presentan mayores niveles de las tres Dnmts.

a



b

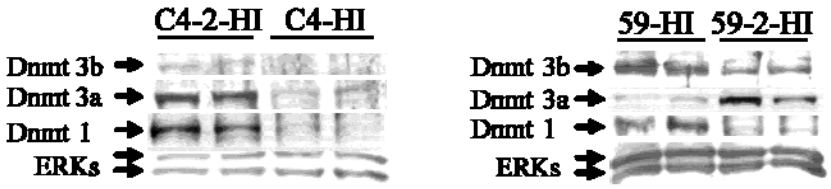


Figura 3-41. Expresión de las Dnmts en los tumores con resistencia constitutiva comparados con los tumores respondedores. *Continúa.*

a) Arriba: Inmunofluorescencia en cultivos primarios. Las células creciendo en *chamber slides* con SFB 10% se fijaron e incubaron con los correspondientes anticuerpos para Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Verde: Dnmt 1/2/3 - FITC Rojo: núcleos-IP. Las células resistentes C4-2-HI expresan mayores niveles de Dnmt3a y 3b ($p<0,05$) y Dnmt1 ($p<0,001$) que las sensibles C4-HI. Las células resistentes 59-HI expresan mayores niveles de Dnmt3b que las sensibles 59-2-HI ($p<0,001$) Abajo: Inmunofluorescencia de los tumores. Cortes de crióstato de las mismas muestras que fueron analizadas por MSP se fijaron e incubaron con los correspondientes anticuerpos para Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Verde: Dnmt 1/2/3 - FITC Rojo: núcleos-IP. Las células C4-2-HI expresan mayores niveles de Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt1 que las C4-HI ($p<0,001$). Las células 59-HI expresan mayores niveles de Dnmt3b y Dnmt1 que las 59-2-HI ($p<0,001$). **b)** *western blot* para las Dnmts utilizando extractos proteicos nucleares de las tres variantes tumorales. La intensidad de las bandas se cuantificó en dos *Western blots* diferentes en relación al control de carga. Los tumores C4-2-HI expresan mayores niveles de Dnmt3a ($p<0,001$) Dnmt 3b ($p<0,05$) y Dnmt1 ($p<0,05$) que los tumores C4-HI. Los tumores 59-HI expresan mayores niveles de Dnmt1 ($p<0,01$) y Dnmt3b ($p<0,001$) que los tumores 59-2-HI. Las ERKs totales se utilizaron como control de carga.

Patrón de expresión de E-Caderina, p16, PTEN, Rb y RARβ en tumores con resistencia constitutiva al RU-486.

Para estudiar si los altos niveles de expresión de las Dnmts, en tumores con resistencia constitutiva al RU-486, eran responsables de silenciar otros genes que también se sabe pueden estar regulados por metilación, nos propusimos investigar la expresión de E-Caderina, p16, PTEN, Rb y RARβ. Como observamos en la Figura 3-42a, la expresión de esas proteínas no sigue el mismo patrón de regulación que el RPA, indicando diferencias específicas de tumor y demostrando que el silenciamiento de RPA en tumores con resistencia constitutiva es un fenómeno especifico. En la familia C4, parte de estos resultados se confirmaron por inmunohistoquímica y se muestran en la Figura 3-42b.

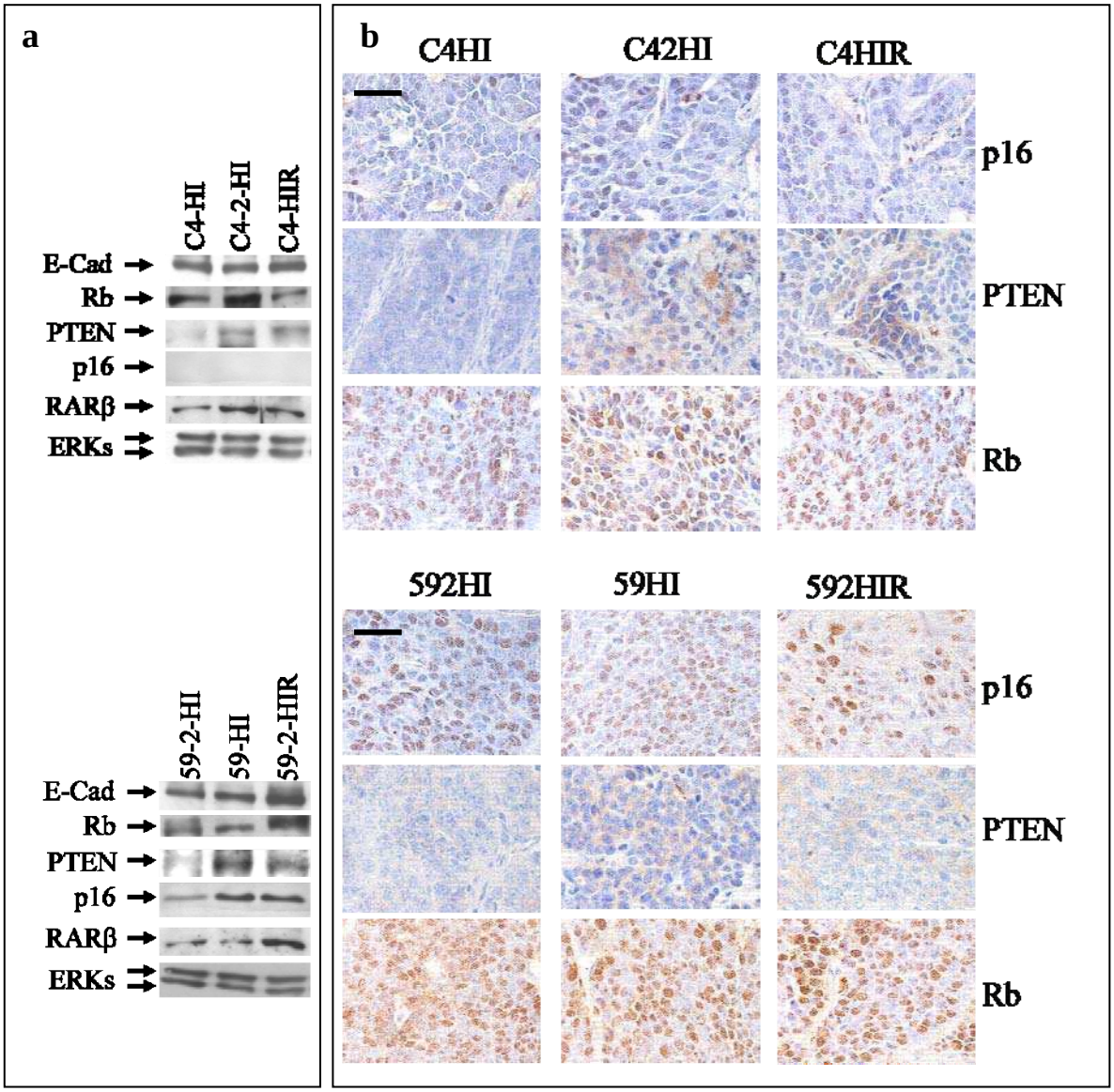
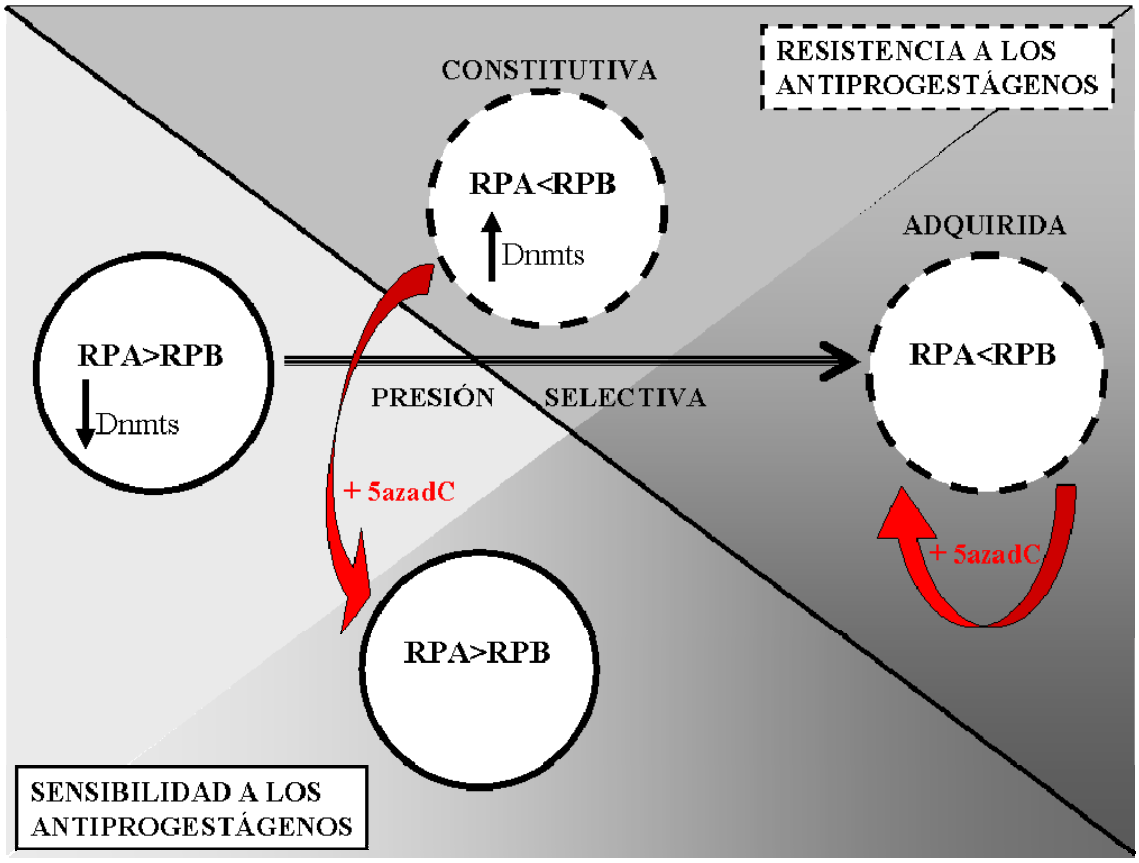


Figura 3-42. Expresión de otras proteínas potencialmente reguladas por metilación. a) *western blot* para E-caderina, Rb, PTEN, p16, and RARβ en los tumores sensibles, resistentes adquiridos y constitutivos. El patrón de expresión de estas proteías no sigue el mismo patrón de expresión que RPA. **b)** Inmunohistoquímica para p16, PTEN y Rb en cortes histológicos de los tumores sensibles (C4-HI y 59-2-HI), con resistencia constitutiva (C4-2-HI, 59-HI) y con resistencia adquirida (C4-HIR y 59-2-HIR). Barra: 50 µm.

Estos resultados sugieren que niveles más altos de las Dnmts serían los responsables de la metilación de RPA en los tumores con resistencia constitutiva. Además los tumores C4-2-HI mostraron mayor expresión de las 3 Dnmts, lo cual podría justificar la mejor respuesta de este tumor al tratamiento con el 5azadC + RU-486 en comparación a los tumores 59-HI.



DISCUSIÓN

Obtención de variantes tumorales con resistencia adquirida. Patrón de isoformas del RP.

Nuestro grupo había reportado hace algunos años ya, que los tumores sensibles y los resistentes constitutivos a la terapia endocrina, tenían niveles similares del RP evaluado por el ensayo de protección a la ARNasa y por inmunohistoquímica, pese a que por *western blot* se observaban diferencias en el patrón de expresión de isoformas del receptor (Helguero *et al.* 2003).

Para estudiar con mayor profundidad la diferencia entre tumores sensibles y resistentes, generamos 4 variantes tumorales con resistencia adquirida por presión selectiva con RU-486 en el modelo de carcinogénesis mamaria inducida por la administración de MPA. De manera que contamos para este estudio con tumores sensibles, resistentes constitutivos y resistentes adquiridos al RU-486. Cabe destacar que dos de las variantes obtenidas, la 32-2-HIR y la C7-2-HIR fueron muy difíciles de generar, a diferencia de la C4-HIR y la 59-2-HIR. Este resultado representa lo que ocurre en la clínica, donde sólo un porcentaje de pacientes desarrolla resistencia ante las terapias hormonales.

Demostramos que una diferencia importante entre los tumores sensibles y los resistentes, tanto constitutivos como adquiridos, reside en la relación RPA/RPB, expresando los tumores sensibles mayores niveles de RPA y los resistentes mayores niveles de RPB. Para realizar este análisis utilizamos los Ac. C-19 y Ab-7 que reconocen ambas isoformas del RP por *western blot*, pero sólo la isoforma A por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (Aupperlee *et al.* 2005b). El Ac. Ab-7 se caracteriza por marcar más la isoforma A que la B por *western blot*. Utilizamos además un anticuerpo específico para RPB, el Ab-6, que reconoce el extremo N-terminal ausente en la isoforma A. Es importante recalcar que para poder estudiar correctamente la relación RPA/RPB utilizamos geles *SDS-PAGE* al 8% que permiten separar bien ambas isoformas. Este no es un detalle menor, ya que existen bandas intermedias, de 94 y 105 kDa que no se separan de la isoforma B en geles al 10 o 12% y pueden brindar resultados confusos.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis confirmarían nuestra hipótesis que postula que los altos niveles de RPA son un marcador predictivo de una buena respuesta a la terapia con antiprogestágenos. Además, son resultados acordes con otros trabajos que también postulan que el RU-486 ejercería efectos agonistas cuando se

une a la isoforma B y antagonistas cuando se une a la A (Horwitz *et al.* 1995; Wardell & Edwards 2005; Wardell *et al.* 2010). Hemos observado también en resultados preliminares, no mostrados en este trabajo de tesis, que los tumores con resistencia constitutiva C4-2-HI que expresan altos niveles de RPB y bajos de RPA, muestran cierto grado de estimulación en el crecimiento tumoral cuando son tratados con RU-486 y son inhibidos cuando se los trata con MPA *in vivo*. Este resultado sería acorde con los mencionados, ya que si el antiprogestágeno RU-486 ejerce efectos agonistas cuando se une a la isoforma B, un progestágeno como el MPA podría ejercer el efecto contrario.

En nuestro modelo de trabajo de carcinomas mamarios inducidos por MPA ya habíamos observado que el antiprogestágeno onapristona era tan efectivo como el RU-486 para inducir regresión tumoral en los tumores sensibles 59-2-HI, 32-2-HI y C7-2-HI (Montecchia *et al.* 1999) y que el uso de oligonucleótidos antisentido del RP era capaz de inhibir el crecimiento tumoral en la variante 32-2-HI (Lamb *et al.* 2005). Hemos demostrado aquí también, que el antiprogestágeno ZK 230211 es tan efectivo como el RU-486 para inhibir el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* en las variantes sensibles que expresan altos niveles de RPA.

Cabe destacar que los tumores resistentes adquiridos, pese a crecer en presencia de los antiprogestágenos, algunas veces muestran una tasa de crecimiento menor, esto podría deberse a efectos sistémicos de los antiprogestágenos, probablemente atribuidos a la regulación de las células NK (Arruvito *et al.* 2008) o a mecanismos relacionados con propiedades antiglucocorticoides (Horwitz *et al.* 1995).

Los bajos niveles del RPA en las variantes con resistencia adquirida C4-HIR y 59-2-HIR se vieron acompañados de bajos niveles de REα, sugiriendo que los bajos niveles de dicho receptor podrían ser en parte responsables del fenotipo resistente. Sin embargo, dado que observamos que las variantes con resistencia adquirida C4-HIRR y 32-2-HIR expresan muy bajos niveles de RPA pero sí expresan REα, pensamos que no sería este receptor el único responsable del fenotipo resistente y que es el RP quien juega un rol definitorio.

Asimismo, vale destacar que resultados no publicados, obtenidos por el Dr. Juan Pablo Cerliani en nuestro laboratorio, mostraron que las células T47D-YA, que sobreexpresan la isoforma A (Tesis Doctoral de Juan Pablo Cerliani), inoculadas en hembras BALB/c, generan tumores que responden significativamente mejor a la terapia con RU-486 (12mg/kg/día) que aquellos tumores desarrollados a partir de células T47D *wt* que expresan niveles similares de RPA y RPB.

Como la terapia mayormente utilizada en el cáncer de mama es el tamoxifeno, usualmente cuando se habla de hormono-resistencia se refieren a resistencia a esta terapia. Luego se incorporaron varios estudios también de resistencia a los AI. Nuestro trabajo aporta por primera vez estudios sobre resistencia a los antiprogestágenos en cáncer de mama y la importancia en el patrón de expresión RPA/RPB y el fenotipo resistente. El interés se ha centrado mayormente en el REα, ya que por el momento son los protagonistas de la terapia hormonal. Sin embargo, hay otros grupos, junto con el nuestro, que proponen incluir a los antiprogestágenos en el tratamiento del cáncer de mama (Chwalisz *et al.* 1998; Chwalisz *et al.* 2000; Ismail *et al.* 2003; Michna *et al.* 1989a; Michna *et al* 1989b; Schoenlein *et al.* 2007).

El RU-486 ya fue utilizado para el tratamiento de tumores de mama que fracasaron a otros tratamientos y la respuesta obtenida fue sólo parcial en algunos casos. Este antiprogestágeno fue aprobado en el año 2000 por la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) para terminar con embarazos tempranos. La terapia consta de dos administraciones, el primer día se toman 600 mg, y el tercer día 400 mg (http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm111323.htm). En la actualidad se están reclutando pacientes con tumores de mama para probar la terapia con RU-486. La dosis a probar será de 200 mg diarios por entre 5 y 28 días (*ClinicalTrialFeeds.org*). En los resultados de esta tesis pudimos ver que la terapia prolongada por un año con el antiprogestágeno en hembras BALB/c no produjo efectos colaterales. Proponemos que el RU-486 sería una terapia interesante para etapas tempranas en pacientes seleccionados, con mayor expresión de RPA que de RPB. El patrón de isformas sería clave a la hora de indicar esta terapia, ya que, según resultados de nuestro laboratorio y otros (Wardell *et al.* 2010) esta terapia sería perjudicial en aquellos tumores que expresan altos niveles de RPB, porque es a través de esta isoforma que el RU-486 ejerce efectos agonistas. De todas maneras han sido desarrollados antiprogestágenos con menor actividad antiglucocorticoides y sin actividad agonista, como el ZK 230211 (Afhuppe *et al.* 2010), que podrían resultar aún mejores para la aplicación clínica. El ZK 230211 esta en fase II en tumores de mama metastáticos positivos para RP. En esta prueba se utilizan dosis de 25 y 100 mg diarios vía oral (*ClinicalTrialFeeds.org*). La aglepristona, otro antiprogestágeno con baja actividad antiglucocorticoide que hemos utilizado en este trabajo, es en la actualidad sólo de uso veterinario.

Finalmente, el grupo de S. Fuqua ha demostrado que tumores con una alta relación RPA/RPB no responden bien a la terapia con tamoxifeno (Hopp *et al.* 2004), y justamente son estos los tumores que hemos visto, en el modelo del MPA, que responden mejor a la terapia con antiprogestágenos.

Potencial metastásico

Generalmente los tumores que desarrollan resistencia a las terapias se hacen más metastáticos, planteando la posibilidad de que la hormono-resistencia y la capacidad metastásica sean fenómenos relacionados durante la progresión tumoral. Los resultados obtenidos aquí nos muestran que la adquisición de mayor capacidad metastásica sería un fenómeno irreversible e independiente de la respuesta hormonal. Observamos que la adquisición de un fenotipo más metastático es un evento unidireccional, ya que no revierte cuando sí lo hace el fenotipo resistente. Estos resultados nos sugieren que la expresión de RPA no estaría vinculada con el fenotipo metastático.

Ha sido reportado por otros grupos que tumores resistentes a la terapia endocrina presentan una mayor activación de la vía de las MAPK, la cual favorece la fosforilación del REα activando así al receptor de forma ligando-independiente (Brodie *et al.* 2006; Martin *et al.* 2005). Existen estudios que vinculan la activación de AKT con la hormono-resistencia y proponen además a dicha quinasa como un marcador de este fenómeno (Tokunaga *et al.* 2006). Nuestros resultados en particular no apoyan esta hipótesis ya que observamos que los tumores sensibles C4-HI muestran alta activación de AKT y que este patrón no se mantiene en los tumores sensibles C4-HIRev, sino que éstos últimos muestran una baja activación de AKT y alta de ERK1/2 al igual que los tumores resistentes C4-HIR. De manera que los tumores con mayor capacidad metastásica, los C4-HIR y los C4-HIRev, muestran baja pAKT y alta pERK1/2. Estos resultados coinciden con los reportados por Toker y Yoeli-Lerner (Toker & Yoeli-Lerner 2006) donde muestran que una alta activación de AKT1 inhibe la actividad transcripcional de NFAT, un factor de transcripción directamente relacionado con un fenotipo invasivo. La disminución de pAKT podría inducir un aumento de NFAT, que en consecuencia aumenta la expresión de la metaloproteinasa MMP-9 y otras vías relacionadas con la capacidad invasiva y metastásica. Sería interesante tratar los tumores C4-HIR y C4-HIRev, con mayor porcentaje de metástasis axilares y expresión de MMP-9, con un inhibidor de NFAT y ver si esto disminuye la capacidad metastásica, para ver si la hipótesis propuesta es la correcta.

Reversibilidad de la resistencia adquirida.

En este modelo, la resistencia adquirida a los antiprogestágenos, pero no la constitutiva, puede revertir por los siguientes mecanismos:

a) Pasajes singenéicos seriados en ausencia de la presión selectiva con el RU-486.
b) Tratamiento hormonal con E2 o tamoxifeno.
c) Aislamiento de células tumorales cultivadas en plástico y en matrigel.

En todos los casos la reversión de la resistencia se vio acompañada de la reexpresión de RPA. Estos resultados sugieren que la expresión de RPA estaría regulada por algún mecanismo epigenético, ya que puede manipularse al menos por los mecanismos enumerados.

Resumiendo, los tumores resistentes a la terapia hormonal pueden recuperar la sensibilidad al tratamiento e inclusive aquellos tumores con alta capacidad metastásica pueden regresionar si son tratados con la terapia hormonal indicada. Asimismo, la aplicación de terapias combinadas podría ser útil no sólo para revertir la resistencia sino también para evitar o demorar la aparición de la misma.

Participación de los CAFs en el fenotipo resistente adquirido.

Nuestro grupo ha demostrado que los CAFs provenientes de tumores C4-HI son más estimulatorios sobre la proliferación de las células epiteliales y expresan mayores niveles de FGF-2 *in vitro*, que los provenientes de tumores C4-HD (Giulianelli *et al.* 2008a). Este resultado nos llevó a pensar que tal vez los CAFs HI y los CAFs HIR eran diferentes, y que los últimos podrían participar en la determinación del fenotipo resistente.

Por este motivo decidimos realizar cultivos mixtos de EPI purificadas HI y HIR con CAFs HI y HIR en las distintas combinaciones posibles, para ver si los CAFs HIR podían conferirle resistencia a las EPI HI y a las EPI HIR. Observamos, sin embargo, que la respuesta de las células tumorales frente a los CAFs HI y los HIR fueron similares. Es decir, todos los co-cultivos fueron estimulados por MPA e inhibidos por antiprogestágeno, indicando que los CAFs por si sólos no son los responsables de conferir la resistencia hormonal en el tumor. Estos experimentos podrían repetirse en

cultivos en Matrigel para determinar si además de la presencia de los CAFs, es necesario mantener a las células epiteliales en un contexto tisular de uniones célula-célula y célula-matriz para preservar la resistencia en cultivo.

Los resultados obtenidos *in vitro* destacan la importancia que tiene el microambiente tumoral en el crecimiento de los tumores y su fenotipo, resistente en este caso. Vimos que ni los cultivos en plástico ni en matrigel fueron capaces de mantener el fenotipo resistente adquirido de las células C4-HIR y 59-2-HIR, pero que éste pudo recuperarse al reinocular las células epiteliales crecidas en plástico en hembras BALB/c, lo que indicaría que existe algún factor o factores del entorno tumoral *in vivo* que son imprescindibles para el mantenimiento del fenotipo resistente.

Metilación de *RPA* y reversión de la resistencia constitutiva.

Las modificaciones epigenéticas son aquellas que no alteran la secuencia del ADN pero que sí determinan si un gen se expresa o no, son hereditarias y reversibles (Veeck & Esteller 2010). La plasticidad de la expresión de RPA en los tumores con resistencia adquirida sugiere que esta isoforma estaría regulada por algún mecanismo epigenético. Esta hipótesis es aún más consistente cuando observamos que al reinocular *in vivo* las células epiteliales HIR crecidas en plástico, que son sensibles al RU-486, el tumor que se genera recupera su fenotipo resistente y la relación RPA/RPB<1.

Se ha demostrado previamente que tanto el REα como el RP pueden ser regulados por metilación (Fleury *et al.* 2008; Lapidus *et al.* 1996; Mirza *et al.* 2007; Ren *et al.* 2007; Vasilatos *et al.* 2009). Decidimos por lo tanto estudiar si la expresión de RPA estaba regulada por este mecanismo en los tumores resistentes. No hay en la actualidad estudios de metilación en tumores con resistencia adquirida, esto hace aún más interesante nuestros resultados. Inicialmente pensamos que los tumores con resistencia adquirida serían aquellos que regulan RPA por metilación de su promotor y no los constitutivos que mantuvieron en todas las condiciones experimentales el mismo patrón de expresión de esta isoforma de RP. En este trabajo de tesis pudimos demostrar por primera vez que RPA está metilado en dos tumores que espontáneamente se hicieron HI y resistentes a los antiprogestágenos y en ellos, la sensibilidad a la terapia con antiprogestágenos pudo ser recuperada mediante el tratamiento con un agente desmetilante.

Existen en la actualidad pocos trabajos en los que se estudia el silenciamiento de RP en tumores de mama (Lapidus *et al.* 1996; Leu *et al.* 2004; Mirza *et al.* 2007). Recientemente, Vasilatos et al, estudió el patrón de metilación de varios genes (Vasilatos *et al.* 2009), entre ellos RPA y RPB, y comunican que la metilación de *RPA* junto con la de RARβ (M4), INK4a/ARF y HIN-1 podrían predecir carcinomas mamarios no asociados a BRCA 1/2 y la progresión tumoral. Sin embargo, no había hasta este trabajo de tesis, ningún estudio clínico o experimental que sugiriera que la metilación de RP o REα podría ser el mecanismo epigenético relacionado con la adquisición de resistencia a los antiprogestágenos. Nuestros estudios demuestran claramente que la resistencia constitutiva y adquirida al RU-486 está regulada por mecanismos epigenéticos diferentes, y que sólo en el primer caso es la metilación del promotor de *RPA* la causante de la resistencia a los antiprogestágenos. En los tumores con resistencia adquirida, el mecanismo no ha podido ser elucidado aún.

La mayoría de los estudios se centran en la metilación del REα en las células MDA-MB-231, y la metilación del RP, mayormente RPB, ha sido estudiada como un gen regulado por REα. En estas células ha sido demostrado que tanto RE como RP están silenciados por metilación de su promotor. El tratamiento con un agente desmetilante induce la expresión de REα y RPB, pero no RPA (Ferguson *et al.* 1995). El mismo grupo demostró que REα era capaz de inducir la expresión de RP pese a que el promotor de este último está metilado, ya que cuando transfectan a estas células con REα inducen la expresión de RPB. Sin embargo, en clones RE negativos, derivados de las células MCF-7 han mostrado resultados opuestos, ya que la reexpresión del REα no fue suficiente para expresar el RP, sino que es necesaria la desmetilación de su secuencia (Leu *et al.* 2004).

En las células MDA-MB-231 también se demostró que el tratamiento con agentes desmetilantes *in vitro* induce la resensibilización al tamoxifeno (Sharma *et al.* 2006). El grupo de Shao y colaboradores, mostró que el tratamiento de células MDA-MB-435 *in vivo* con inhibidores de las Dnmt e inhibidores de las HDAC inhibe el crecimiento tumoral por sí solos, y más aun en animales ovariectomizados (Fan *et al.* 2008). Sin embargo, en nuestro conocimiento no hay hasta la fecha ningún trabajo donde estudien *in vivo* el efecto de terapias combinadas con antiestrógenos, tamoxifeno o antiprogestágenos con agentes desmetilantes.

Decidimos evaluar entonces si era posible inducir la expresión de RPA con un agente desmetilante *in vitro* e *in vivo*. Para ello utilizamos el 5azadC. Estudiamos primero la tolerancia al agente desmetilante por estudios de proliferación y de toxicidad *in vitro* barriendo concentraciones desde 5.10^{-8} M hasta 5.10^{-6} M de 5azadC. Como no observamos diferencias en la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada con ninguna de las concentraciones comparadas con el control, analizamos qué ocurría con el tratamiento combinado con RU-486, utilizando la concentración intermedia de 5.10-^{7} M de 5azadC. En las células C4-2-HI, esta concentración fue efectiva, inhibiendo la proliferación celular, mientras que en las 59-HI sólo pudimos observar un efecto similar con una concentración mayor (5.10^{-6} M). Sabemos por resultados previos del laboratorio que la incorporación de timidina correlaciona con el recuento celular. Cuando realizamos los tratamientos *in vivo*, observamos un fenómeno similar, ya que los tumores C4-2-HI fueron inhibidos con RU-486 combinado con 5azadC 0,75 mg/kg/día por medio, mientras que en los tumores 59-HI sólo pudimos ver un efecto inhibitorio utilizando el 5azadC a una concentración mayor, de 1 mg/kg/día por medio.

Cuando estudiamos los niveles de expresión de las Dnmts en los tumores resistentes constitutivos comparados con los sensibles, observamos que son las Dnmt1, Dnmt3b y Dnmt3a las que están aumentadas los tumores C4-2-HI, y las Dnmt1 y Dnmt3b en los 59-HI, siendo mayor el aumento en los tumores C4-2-HI que en los 59-HI. Esta podría ser la razón por la cual los C4-2-HI responden mejor a la terapia con el inhibidor de Dnmts que los 59-HI.

Los resultados observados acuerdan con los datos reportados por Veeck y Esteller (Veeck & Esteller 2010) quienes postulan que se observa un aumento de expresión de las 3 Dnmts en carcinomas mamarios, siendo el de Dnmt3b el más significativo comparado con muestras de mama normal, luego el de Dnmt1 y por último el de la Dnmt3a. Este grupo propone entonces que es la Dnmt3b la que parecería jugar un rol más importante que las otras dos en el proceso de carcinogénesis.

Desconocemos aún la razón por la cuál están aumentadas las Dnmts en los tumores que estudiamos. Estos mayores niveles podrían deberse a amplificaciones o mutaciones. Han sido detectadas en tumores de pulmón, próstata y mama varios polimorfismos de la Dnmt3b que podrían ser las responsables de este incremento. En tumores de pulmón se ha observado que la transición de C a T produce un incremento en la actividad transcripcional del promotor de la Dnmt3b. Han sido detectados además en la secuencia 3´UTR de las 3 Dnmts sitios complementarios para la familia mirR-29

(miARN), que podrían ser también responsables de la regulación de estas proteínas (Veeck & Esteller 2010). Son varios entonces los posibles mecanismos regulatorios a estudiar.

Hemos observado en resultados preliminares recientes, que en los tumores con resistencia constitutiva 59-HI hay una alta expresión de la HDAC1 por *western blot* y por inmunohistoquímica comparándola con la expresión en los tumores sensibles 59-2-HI y los tumores con resistencia adquirida 59-2-HIR. Esto sugiere que la expresión de RPA podría estar regulada por eventos de acetilación de histonas, además de la observada metilación en el promotor, dos fenómenos que muchas veces están asociados (Fleury *et al.* 2008; Sharma *et al.* 2006; Yan *et al.* 2001). Sería interesante entonces probar en estos tumores una terapia combinada con el agente desmetilante 5azadC, un inhibidor de las HDAC (como la Tricostatina A, TSA) y RU-486 para ver si se potencia la inhibición del crecimiento tumoral.

En los experimentos donde tratamos los tumores con el agente desmetilante, cabe destacar que, pese a que observamos un aumento en la expresión de RPA en los tumores tratados con 5azadC, en la mayoría de los casos el nivel de expresión de RPB se mantuvo más alto que el de RPA. Esto podría deberse a que, como se ve por inmunohistoquímica, sólo algunas células re-expresan RPA con el tratamiento con el agente desmetilante, y cuando realizamos extractos de tumor para analizar por *western blot,* las células que reexpresan RPA quedarían diluidas en el total de las células que componen el tumor. Esta heterogeneidad podría explicar porqué vemos solo una disminución en el crecimiento tumoral y no una completa regresión.

Se ha demostrado que agentes desmetilantes como la zebularina son capaces de inhibir la proliferación celular por inducir apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7. En estas células observaron que el tratamiento con zebularina indujo el clivaje de PARP y una disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2. En las células MDA-MB-231 observaron además un aumento de la proteína apoptótica Bax (Billam *et al.* 2010). Contrariamente a esto, el tratamiento *in vitro* e *in vivo* con el agente desmetilante 5azadC no fue capaz de inhibir la proliferación celular o el crecimiento tumoral *per se* en los tumores de nuestro modelo tumoral, pero sí fue capaz de inducir la expresión de RPA y la recuperación consecuente de la sensibilidad a los antiprogestágenos. Sólo la combinación de 5azadC + RU-486 produjo un aumento de Bax y una disminución de Bcl-xl observada por inmunohistoquímica.

Todos estos resultados en su conjunto nos hacen pensar en una posible aplicación terapéutica de los agentes desmetilantes junto a una terapia endócrina en aquellos tumores con altos niveles de Dnmts, que hayan desarrollado resistencia hormonal.

Los agentes desmetilantes han sido aprobados en la clínica para el uso en enfermedades hematológicas y son utilizados como agentes diferenciadores (Lyko & Brown 2005). Nuestros resultados, junto con los de otros grupos, sugieren que los inhibidores de las Dnmts podrían ser utilizados para reexpresar blancos terapéuticos, como RPA en nuestro caso (Brinkman & el Ashry 2009; O'Brien *et al.* 2009; Sharma *et al.* 2006).

Por otro lado, en la mayoría de los trabajos se informa una relación entre la metilación de *RE*α y del *RP*. Por este motivo estudiamos también la expresión de REα en los tumores resistentes. Si bien en algunos casos el nivel de expresión de REα también disminuyó, no se observó un patrón claro. Por este motivo analizamos también, por MSP, utilizando cuatro pares de *primers* diferentes, si el promotor de REα estaba también regulado por metilación, sin encontrar ningún patrón de metilación que diferencie a los tumores resistentes de los sensibles. Asimismo, investigamos si los tumores con resistencia constitutiva respondían a la terapia combinada de 5azadC y E2 como lo hacían con 5azadC y RU-486. En este caso no observamos respuesta inhibitoria tanto *in vitro* como *in vivo* (experimentos no mostrados en este trabajo de tesis). Estos resultados sugieren que si bien cambios en la expresión de REα pueden acompañar cambios en la respuesta hormonal, no serían determinantes de la misma.

Sabemos por resultados previos, que oligonucleótidos antisentido para RP inhiben la proliferación celular (Lamb *et al.* 2005), lo cual indica la importancia del RP en el crecimiento tumoral en los tumores del modelo de carcinogénesis inducida por MPA. Podría estar ocurriendo también que el aumento de las Dnmts observado en los tumores con resistencia constitutiva fuera responsable de la metilación de genes que favorecen el crecimiento hormono independiente, entre ellos el RPA. Asimismo, acorde con esta hipótesis, en los tumores con resistencia constitutiva observamos un crecimiento más rápido tanto *in vitro* como *in vivo*, y un patrón de crecimiento más independiente del estroma, ya es muy baja la proporción del mismo en relación al componente epitelial. Sin embargo, cuando tratamos los tumores con 5azadC no observamos una inhibición del crecimiento tumoral. La recuperación de funciones

supresoras del crecimiento tumoral deberían haberse recuperado con el tratamiento con el agente desmetilante y deberíamos haber observado cierta inhibición tumoral. Sin embargo, sólo observamos inhibición del crecimiento de los tumores cuando tratamos los animales con 5azadC combinado con RU-486. Cuando analizamos otros genes que se regulan por metilación, como son E-caderina, p16, PTEN, Rb, y RARβ, pudimos observar que no siguen el mismo patrón de metilación que RPA. Estos resultados en conjunto estarían indicando que los tumores estudiados presentan una metilación específica de RPA.

Se sabe en la actualidad que los progestágenos juegan un rol importante en el desarrollo de un fenotipo neoplásico en la glándula mamaria (Beral 2003; Pazos *et al.* 1992), de manera que el RP podría ser entonces un importante blanco terapéutico. Ha habido varios estudios donde muestran los efectos terapéuticos de antiprogestágenos solos o combinados con antiestrógenos en diferentes modelos experimentales (Gaddy *et al.* 2004; Klijn *et al.* 2000).

En los tumores con resistencia adquirida no hemos podido esclarecer cuál es el mecanismo que regula la expresión de RPA. Sabemos por los resultados obtenidos que no es la metilación de su promotor, pero mantenemos la hipótesis de que se trata de un mecanismo epigenético. Según resultados preliminares estos tumores también expresan HDAC1. Sería interesante entonces tratarlos con un inhibidor de las HDAC, como el TSA. Por otro lado ha sido reportado que los miARN juegan un rol importante regulando la expresión de genes en varios tipos de carcinomas, entre ellos, de mama. Están identificados aquellos que regulan la expresión de las Dnmt3a y Dnmt3b, y también del REα y del RP (Veeck & Esteller 2010). Podría ser entonces que la expresión de RPA en los tumores con resistencia adquirida este regulada por miARNs.

RG y efecto antiprogestágeno.

El RU-486 es un potente antiprogestágeno y antiglucocorticoide (Horwitz 1992). En nuestro modelo experimental resultados previos a este trabajo de tesis han mostrado una importante participación del RP mediando los efectos de la terapia con el RU-486, ya que resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó otro antiprogestágeno con baja actividad antigluococorticoide: la onapristona (ZK 98299; Montecchia *et al.* 1999; Wargon *et al.* 2009). En este trabajo validamos dicho resultado utilizando otros dos antiprogestágenos, el ZK 230211 y la aglepristona, que tienen menor actividad antiglucocorticoide y no presentan actividad agonista como el RU-486. Pese a esta validación, debíamos descartar que el tratamiento con 5azadC no estuviese incrementando los niveles de expresión del RG, ya que se sabe que puede estar regulado por metilación (Alt *et al.* 2010). Curiosamente cuando analizamos la expresión de dicho receptor observamos una disminución del mismo cuando las células o los tumores fueron tratados con 5azadC, sugiriendo que los RG no estarían mediando el efecto inhibitorio del RU-486. La expresión del RG, al igual que la del resto de los receptores para hormonas esteroides, está regulada por varios factores, entre ellos la participación de coactivadores, como la familia p160 y correspresores, como NcoR (Heitzer *et al.* 2007). La disminución en la expresión del RG con el tratamiento con 5azadC podría deberse, por ejemplo, al aumento de algún/algunos corepresor/es debido al tratamiento con el agente desmetilante.

Asimismo, cuando tratamos los tumores con 5azadC y aglepristona, obtuvimos resultados similares a los que vimos al utilizar el RU-486, lo cual confirma que el efecto inhibitorio del antiprogestágeno es vía el RP y no el RG.

Cabe mencionar también que los tumores C4-2-HI sin tratar si bien expresan muy bajos niveles de RPA, expresan alto nivel de RG, de manera que si el efecto del RU-486 fuese vía el RG deberíamos haber observado inhibición del crecimiento con el antiprogestágeno en los tumores del grupo control. Contrariamente a esto, no sólo no se observan efectos inhibitorios del RU-486 en estos tumores sino que por el contrario los tumores crecieron aún más en presencia del RU-486.

CONCLUSIONES

1) Utilizando dos familias tumorales diferentes del modelo de carcinogénesis mamaria inducida por MPA en ratones, demostramos que una diferencia importante entre los tumores sensibles y los resistentes (constitutivos y adquiridos) a los antiprogestágenos, reside en la relación RPA/RPB. Los tumores sensibles expresan mayores niveles de RPA, mientras que los resistentes mayores niveles de RPB. Esta diferencia sería entonces un posible marcador para discriminar un tumor sensible de uno resistente.

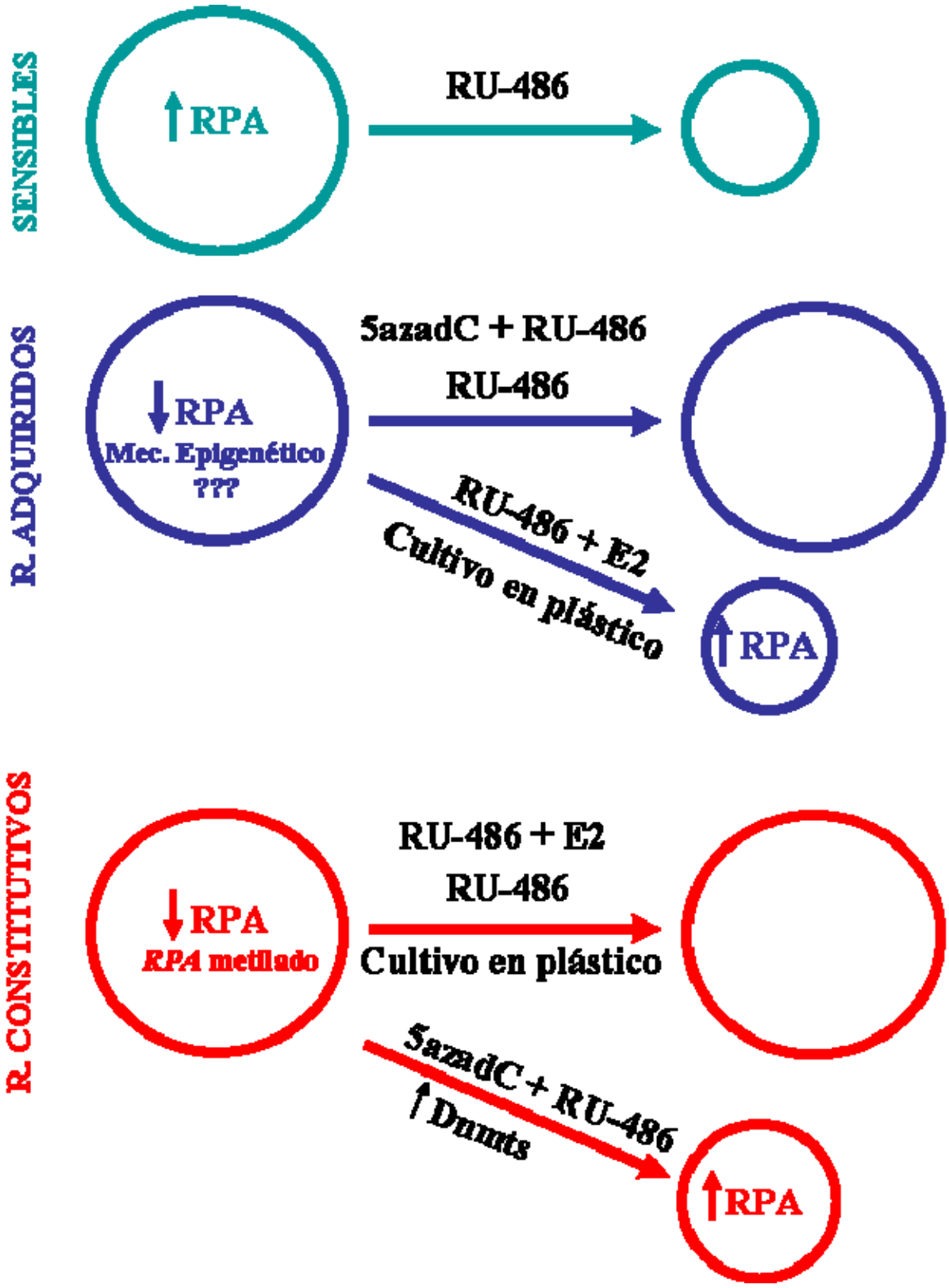
2) Demostramos por primera vez que el RPA está metilado en dos tumores espontáneos diferentes con resistencia constitutiva a los antiprogestágenos en un modelo de carcinogénesis mamaria de ratón, y que la sensibilidad a la terapia con antiprogestágenos pudo ser recuperada reexpresando RPA mediante el tratamiento con un agente desmetilante. Este resultado, además de ser relevante por mostrar la metilación de *RPA* en ratón por primera vez, apoya nuestra hipótesis que propone que altos niveles de RPA son predictivos de una buena respuesta a la terapia con antiprogestágenos.

3) No hemos podido hasta el momento dilucidar cuál es el mecanismo que regula la expresión de RPA en los tumores con resistencia adquirida, sin embargo la plasticidad que observamos en la expresión de esta isoforma nos hace pensar que se trata de algún mecanismo epigenético y no de alguna modificación genética.

4) Reportamos que los tumores con resistencia adquirida muestran mayor potencial metastático, y que este fenotipo más agresivo no revierte cuando sí lo hace el fenotipo resistente. Este resultado nos indica por un lado, que la expresión de RPA no está asociada a un fenómeno de selección clonal, y nuevamente nos sugiere que se regula por algún mecanismo epigenético. La adquisición de un fenotipo más agresivo sí estaría asociada a una selección clonal.

La fuerte correlación que hemos visto a lo largo de todo este trabajo de tesis entre la expresión de RPA y la sensibilidad a los antiprogestágenos sugieren fuertemente que la terapia con antiprogestágenos debería ser considerada como posible tratamiento para tumores de mama con alta expresión de dicha isoforma.

Proponemos también con estos resultados que la terapia combinada de antiprogestágenos con estrógenos o TAM podría ser una posible opción para tratar tumores con resistencia adquirida y demorar la aparición de resistencia en aquellos tumores que responden adecuadamente en un inicio.


SENSIBLES
↑RPA
RU-486
R. ADQUIRIDOS
↓RPA
Mec. Epigenético
???
5azadC + RU-486
RU-486
RU-486 + E2
Cultivo en plástico
↑RPA
R. CONSTITUTIVOS
↓RPA
RPA metilado
RU-486 + E2
RU-486
Cultivo en plástico
5azadC + RU-486
↑Dnmts
↑RPA

APÉNDICE

CULTIVO CELULAR: MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio de cultivo

- DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1) (Sigma Aldrich, St Louis) sin rojo fenol. 15,6 g/l
- Bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich) 1,2 g/l
- Sulfato de gentamicina comercial 50 mg/l

Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

Suero Fetal Bovino (SFB) decomplementado

SFB (PAA Lab. BIOSER, Argentina) calentado en baño térmico a 56°C durante treinta min.

SFB depletado en hormonas adsorbido con carbón (SFBch)

Se incubó el SFB decomplementado con carbón activado (5%; Mallinckrodt) durante 1 h a 4°C con agitación permanente. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó dos veces a 12000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se volvió a incubar con 5% de carbón activado pero esta vez durante toda la noche y, finalmente, el suero se centrifugó 6 ó 7 veces hasta eliminar completamente el carbón y se esterilizó por filtración.

Medio de cultivo para células epiteliales y CAFS

- DMEM/F12
- 10% SFB decomplementado

Medio de lavado

- DMEM/F12
- 2% SFB decomplementado.

PBS 10X

- $Na_2HPO_4.12H_2O$

(fosfato dibásico de sodio, dodecahidrato. Anedra) 30,06 g

- $NaH_2PO_4.H_2O$
  (fosfato monobásico de sodio monohidratado. Anedra) 2,56 g
- NaCl (Anedra) 87,6 g

Se llevó a un litro con H_2Od. Para trabajar se hace una dilución 1:10 con H_2Od.

Solución enzimática utilizada para la digestión tumoral

- Tripsina (Gibco, 1:250) 0,25% p/v
- Colagenasa Tipo II (Gibco) 0,25% p/v
- Albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich) 0,5% p/v

Se disolvió en PBS 1X.

Solucion de Tripsina

- Tripsina (Gibco, 1:250) 0,25% p/v

Se disolvió en PBS 1X.

Solucion de Tripsina-EDTA

- Tripsina (Gibco, 1:250) 0,25% p/v
- EDTA (Cicarelli) 0,2 % p/v

Se disolvió en PBS 1X.

Timidita tritiada (utilizada en ensayos de proliferación celular)

- ^{3}H-timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) 0,4 μCi/hoyo

Líquido de centelleo

- Optiphase 'HISAFE' 3 (PerkinElmer).

<u>INMUNOHISTOQUIMICA / INMUNOFLUORESCENCIA</u>

<u>PBS 10 X</u>

- Fosfato dibásico de Sodio ($NaHPO_4.12H_20$) 30,06 g.
- Fosfato monobásico de Sodio ($NaH_2PO_4.2H_20$) 2,89 g.

- Cloruro de Sodio (NaCl) 87,6 g.

Volumen final: 1 litro de agua destilada.

Para utilizar, se diluye a una concentración 1X, en agua destilada.

Ioduro de Propidio (solución madre)

- 2 mg en 1 ml de agua destilada.

Solución de bloqueo

Suero fetal bovino (SFB) al 10%, tritón 0,1% en PBS 1X en el caso de ser policlonales, y en SFB al 10%, MOM 10% (M.O.M. kit VECTOR) tritón 0,1%, en PBS 1X en el caso de ser monoclonales. El Tritón se utiliza para permeabilizar los núcleos y permitir así el marcado específico más eficientemente y el MOM para disminuir la reacción del anticuerpo monoclonal con las inmunoglobulinas propias del ratón que aumentan el marcado inespecífico

WESTERN BLOT

PBS 10X

- Cloruro de Sodio (NaCl) 80,0 g.
- Cloruro de Potasio (KCl) 2,0 g.
- di-sodio hidrogenofosfato anhidro (Na_2HPO_4) 36,2 g.
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 2,4 g.

Volumen final: 1 litro de agua destilada.

Para utilizar se diluye a una concentración 1X, en agua destilada.

Para preparar PBS 1X, tween 0,1%, se le agrega:

- Tween 20 1 ml

Acrilamida 30%

- Acrilamida (Gibco BRL) 29 g.
- Bisacrilamida (Gibco BRL) 1 g.

Volumen final: 100 ml agua destilada

Se filtra y se conserva a 4º C protegida de la luz.

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

- Tris 90,85 g.

Volumen final: 500 ml agua destilada.

(Llevar a pH con HCl 1:2)

Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

- Tris 60,57 g.

Volumen final: 500 ml agua destilada.

(Llevar a pH con HCl 1:2)

SDS 10%

- SDS (Gibco BRL) 10 g.

Volumen final: 100 ml agua destilada

Persulfato 10% (APS)

- APS (Gibco SRL) 1 g.

Volumen final: 10 ml agua destilada

Buffer de siembra (Loading *Buffer*) 3X

- SDS 6 %
- β-mercaptoetanol 15 % V/V
- Glicerol 60 %
- Tris 0,18 M pH 6,8 0,18 M

- Azul de Bromofenol 0,006 % p/v

Se lleva a 1X con la muestra que se va a sembrar en el gel.

Buffer de Corrida 10X

- Tris 30 g.
- Glicina 144 g.
- SDS 10 g.

Volumen final: 1 litro de agua destilada.

Para utilizar se diluye a una concentración 1X, en agua destilada.

Buffer de transferencia

- *Buffer* de corrida 10X 100 ml.
- Metanol 200 ml

Volumen final: 1 litro de agua destilada.

Solución de Revelado

- A) 4,6 ml agua destilada + 333µl Tris pH 8.8 + 50 µl Luminol (Sigma) + 22µl Acido Cumárico (Sigma).
- B) 4,6 ml agua destilada + 333µl Tris pH 8.8 + 3.2 µl H_2O_2 (Merck).

Se mezclan las soluciones A y B y se coloca la resultante sobre la/s membrana/s de nitrocelulosa durante 2 min aproximadamente antes de exponer las películas fotográficas.

Luminol: 22 mg de luminol en 500 µl de DMSO

Cumárico: 7,5 mg de acido cumárico en 500 µl de DMSO.

Solución de bloqueo

Leche descremada en polvo al 5% en PBS 1X/ tween 0.1%

Marcadores de peso molecular

Rainbow prestained molecular weight markers (Amersham).

Membrana de nitrocelulosa

Hybond C (0,45 μm; Amersham).

EXTRACTOS CITOSÓLICOS Y NUCLEARES

TUMORES

Buffer A (TEDG; preparación extractos totales)

- Tris-HCl pH 7.4 — 20 mM
- EDTA (Sigma) — 1,5 mM
- Dithiothreitol (Sigma) — 0,25 mM
- Na_2MO_4 (Merck) — 20 mM
- Glicerol (Raudo) — 10 %

Para los extractos nucleares es la misma preparación + Sucrosa 0.25 M + NaCl 0.4 M.

CÉLULAS

Medios y soluciones:

TEDGS 10%:	Tris	50 mM (pH 7.4)
	EDTA	7,5 mM
	DTT	0,5 mM
	Glicerol	10%
	Sacarosa	0,25 M
***Buffer* lavado núcleos:**	TEDGS 10% + NP-40 0,01%.	
***Buffer* rotura núcleos:**	TEDGS 10% + KCl 0,4 M.	

TEDGS 30%: *Ídem* TEDGS 10% pero con 30% de glicerol.

Inhibidores de proteasas

- PMSF (Sigma) — 0.5 mM

- Mezcla de ZPCK (Sigma) 0,025mM, TLC (Sigma) 0,025 mM, TPCK (Sigma) 0,025mM y TAME (Sigma) 0,025 mM.

MÉTODO DE LOWRY

Curva standard de albúmina (Sigma) con valores en un rango desde 0-80 μg (por duplicado).

Sc1: $CuSO_4$ 1%, tartrato de Na_2K 1% en *buffer* Na_2CO_3 2% NaOH 0,1N

Se diluyen 3 μl de cada muestra en 100 μl de agua destilada (por duplicado), y se le agregan 0,9 ml de Sc1. Se agitan las muestras en un vortex y luego de 10 min se agregan 100 μl del reactivo de Folin (Folin-Ciocalteu) diluido 1:2. Se esperan 30 min y se mide la absorbancia a 750 nm en un lector de ELISA.

A partir de la curva de calibración obtenida se averigua la concentración proteica de las muestras incógnitas.

EXTRACCIÓN DEL ADN DE TUMORES.

***Buffer* de digestión**

(Usar agua demonizada y destilada para todas las soluciones)

- 100mM NaCL
- 10mM TrisCl pH8
- 25mM EDTA pH8
- 0,5% SDS
- mg/ml proteinasa K (agregar en el momento)

BIBLIOGRAFÍA

Afhuppe W, Beekman JM, Otto C, Korr D, Hoffmann J, Fuhrmann U & Moller C 2010 In vitro characterization of ZK 230211--A type III progesterone receptor antagonist with enhanced antiproliferative properties. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 119 45-55.

Alt SR, Turner JD, Klok MD, Meijer OC, Lakke EA, Derijk RH & Muller CP 2010 Differential expression of glucocorticoid receptor transcripts in major depressive disorder is not epigenetically programmed. *Psychoneuroendocrinology* 35 544-556.

Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK & Elledge RM 2005 Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J.Natl.Cancer Inst.* 97 1254-1261.

Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK & Schiff R 2008 Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr.Rev.* 29 217-233.

Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C & Fainboim L 2008 NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J.Immunol.* 180 5746-5753.

Aupperlee M, Kariagina A, Osuch J & Haslam SZ 2005a Progestins and breast cancer. *Breast Dis.* 24 37-57.

Aupperlee MD, Smith KT, Kariagina A & Haslam SZ 2005b Progesterone Receptor Isoforms A and B: Temporal and Spatial Differences in Expression During Murine Mammary Gland Development. *Endocrinology*.

Badia E, Oliva J, Balaguer P & Cavailles V 2007 Tamoxifen resistance and epigenetic modifications in breast cancer cell lines. *Curr.Med.Chem.* 14 3035-3045.

Balana ME, Lupu R, Labriola L, Charreau EH & Elizalde PV 1999 Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 18 6370-6379.

Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F & Beato M 2003 Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.* 23 1994-2008.

Baulieu EE 1978 Cell membrane, a target for steroid hormones. *Mol.Cell Endocrinol.* 12 247-254.

Beato M, Herrlich P & Schutz G 1995 Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83 851-857.

Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK & Edwards DP 1993 The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 4441-4445.

Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM & Osborne CK 1992 Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res.Treat.* 24 85-95.

Beral V 2003 Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362 419-427.

Bernstein L 2002 Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 7 3-15.

Billam M, Sobolewski MD & Davidson NE 2010 Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* 120 581-592.

Bjornstrom L, Kilic E, Norman M, Parker MG & Sjoberg M 2001 Cross-talk between Stat5b and estrogen receptor-alpha and -beta in mammary epithelial cells. *J.Mol.Endocrinol.* 27 93-106.

Boney-Montoya J, Ziegler YS, Curtis CD, Montoya JA & Nardulli AM 2010 Long-range transcriptional control of progesterone receptor gene expression. *Mol.Endocrinol.* 24 346-358.

Boonyaratanakornkit V & Edwards DP 2007 Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin.Reprod.Med.* 25 139-153.

Bottino MC, Cerliani JP, Rojas P, Giulianelli S, Soldati R, Mondillo C, Gorostiaga MA, Pignataro OP, Calvo JC, Gutkind JS, Panomwat A, Molinolo AA, Luthy IA & Lanari C 2010 Classical membrane progesterone receptors in murine mammary carcinomas: agonistic effects of progestins and RU-486 mediating rapid non-genomic effects. *Breast Cancer Res.Treat.*

Bouchard J & Momparler RL 1983 Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. *Mol.Pharmacol.* 24 109-114.

Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH & Mader S 2004 Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol.Endocrinol.* 18 1411-1427.

Bray JD, Jelinsky S, Ghatge R, Bray JA, Tunkey C, Saraf K, Jacobsen BM, Richer JK, Brown EL, Winneker RC, Horwitz KB & Lyttle CR 2005 Quantitative analysis of gene regulation by seven clinically relevant progestins suggests a highly similar mechanism of action through progesterone receptors in T47D breast cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 97 328-341.

Brinkman JA & el Ashry D 2009 ER re-expression and re-sensitization to endocrine therapies in ER-negative breast cancers. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 14 67-78.

Brodie A, Sabnis G & Jelovac D 2006 Aromatase and breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 102 97-102.

Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H & McTiernan A 2003 Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 289 3243-3253.

Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stumpp H & Elger W 2000 Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* 65 741-751.

Chwalisz K, Stockemann K, Fritzemeier KH & Fuhrmann U 1998 Modulation of oestrogenic effects by progesterone antagonists in the rat uterus. *Hum.Reprod.Update.* 4 570-583.

Clemm DL, Sherman L, Boonyaratanakornkit V, Schrader WT, Weigel NL & Edwards DP 2000 Differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol.Endocrinol.* 14 52-65.

Coleman RE 2005 Bisphosphonates in breast cancer. *Ann.Oncol.* 16 687-695.

Conneely OM, Mulac-Jericevic B & Lydon JP 2003 Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68 771-778.

Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP & De Mayo FJ 2001 Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol.Cell Endocrinol.* 179 97-103.

Cork DM, Lennard TW & Tyson-Capper AJ 2008 Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10 207.

Cotran RS, Kumar V, Collins T & Robbins SL 1999 *Robbins Pathologic Basis of Disease* . W B Saunders Co.

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA & Korach KS 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138 4613-4621.

Dauvois S, White R & Parker MG 1993 The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J.Cell Sci.* 106 (Pt 4) 1377-1388.

DeMarzo AM, Onate SA, Nordeen SK & Edwards DP 1992 Effects of the steroid antagonist RU486 on dimerization of the human progesterone receptor. *Biochemistry* 31 10491-10501.

Demonty G, Bernard-Marty C, Puglisi F, Mancini I & Piccart M 2007 Progress and new standards of care in the management of HER-2 positive breast cancer. *Eur.J.Cancer* 43 497-509.

Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Charreau EH, Pasqualini CD & Lanari C 1995 Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res.Treat.* 35 173-186.

Dressing GE, Hagan CR, Knutson TP, Daniel AR & Lange CA 2009 Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. *Endocr.Relat Cancer* 16 351-361.

Duffy MJ 2005 Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin.Chem.* 51 494-503.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998 Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 351 1451-1467.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005 Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365 1687-1717.

Edwards DP 2005 Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu.Rev.Physiol* 67 335-376.

Elizalde P, Guerra F, Lanari C, Pazos P, Kornblihtt A & Charreau E 2000 Amplificación del oncogen c-erbB-2 en adenocarcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona. *Medicina (B.Aires)* 54 555.

Elizalde, P, Labriola, L., Salatino, M., Movsichoff, F., Proietti, C., Pecci, A., Coso, O., Kornblihtt, A., and Charreau, E. Heregulin Regulates the Progesterone Receptor (Pr) Transcriptional Activity by a Mechanism That Requires a Functional erbB-2 and Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) Activation. AACR. 42. 25-3-2001. Proceedings of the AACR. Proceedings of the AACR.
Ref Type: Conference Proceeding

Elizalde PV, Lanari C, Molinolo AA, Guerra FK, Balana ME, Simian M, Iribarren AM & Charreau EH 1998 Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 67 305-317.

Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R & Strissel PL 2009 Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol.Life Sci.* 66 2405-2426.

Eroles P, Bosch A, Bermejo B & Lluch A 2010 Mechanisms of resistance to hormonal treatment in breast cancer. *Clin.Transl.Oncol.* 12 246-252.

Esteller M 2002 CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21 5427-5440.

Fabris VT, Benavides F, Conti C, Merani S & Lanari C 2005 Cytogenetic findings, Trp53 mutations, and hormone responsiveness in a medroxyprogesterone acetate induced murine breast cancer model. *Cancer Genet.Cytogenet.* 161 130-139.

Fan J, Yin WJ, Lu JS, Wang L, Wu J, Wu FY, Di GH, Shen ZZ & Shao ZM 2008 ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 134 883-890.

Feinberg AP, Kalikin LM, Johnson LA & Thompson JS 1994 Loss of imprinting in human cancer. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 59 357-364.

Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB & Davidson NE 1995 Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res.* 55 2279-2283.

Fleury L, Gerus M, Lavigne AC, Richard-Foy H & Bystricky K 2008 Eliminating epigenetic barriers induces transient hormone-regulated gene expression in estrogen receptor negative breast cancer cells. *Oncogene* 27 4075-4085.

Franks LM & Teich NM 1997 *Introduction to Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press.

Fuhrmann U, Hess-Stumpp H, Cleve A, Neef G, Schwede W, Hoffmann J, Fritzemeier KH & Chwalisz K 2000 Synthesis and biological activity of a novel, highly potent progesterone receptor antagonist. *J.Med.Chem.* 43 5010-5016.

Gaddy VT, Barrett JT, Delk JN, Kallab AM, Porter AG & Schoenlein PV 2004 Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Clin.Cancer Res.* 10 5215-5225.

Galac S, Kooistra HS, Dieleman SJ, Cestnik V & Okkens AC 2004 Effects of aglepristone, a progesterone receptor antagonist, administered during the early luteal phase in non-pregnant bitches. *Theriogenology* 62 494-500.

Gama-Sosa MA, Wang RY, Kuo KC, Gehrke CW & Ehrlich M 1983 The 5-methylcytosine content of highly repeated sequences in human DNA. *Nucleic Acids Res.* 11 3087-3095.

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, Novaro V, Gongora A, Baldi A, Molinolo A & Lanari C 2008a 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.

Giulianelli SJ, Herschkowitz JI, Patel V, Molinolo AA, Gutkind S, Perou CM & Lanari C 2008b Gene expression profiles in epithelial and stromal cells from murine mammary tumors with different hormone dependence. *99th AACR Annual Meeting, San Diego, CA.USA.*

Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F & Hortobagyi GN 2007 Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv.Exp.Med.Biol.* 608 1-22.

Greiser CM, Greiser EM & Doren M 2005 Menopausal hormone therapy and risk of breast cancer: a meta-analysis of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Hum.Reprod.Update.* 11 561-573.

Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK & Dowsett M 2005 Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin.Oncol.* 23 2469-2476.

Hagan CR, Faivre EJ & Lange CA 2009 Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids* 74 568-572.

Hagihara K, Wu-Peng XS, Funabashi T, Kato J & Pfaff DW 1994 Nucleic acid sequence and DNase hypersensitive sites of the 5' region of the mouse progesterone receptor gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 205 1093-1101.

Hall JM & McDonnell DP 1999 The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140 5566-5578.

Heitzer MD, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF & DeFranco DB 2007 Glucocorticoid receptor physiology. *Rev.Endocr.Metab Disord.* 8 321-330.

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.

Herynk MH & Fuqua SA 2004 Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr.Rev.* 25 869-898.

Hewitt SC & Korach KS 2003 Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction.* 125 143-149.

Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathak DR, Slomski CA & Haslam SZ 1999 Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84 4559-4565.

Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB & Fuqua SA 2004 Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin.Cancer Res.* 10 2751-2760.

Horwitz KB 1992 The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocr.Rev.* 13 146-163.

Horwitz KB, Koseki Y & McGuire WL 1978 Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* 103 1742-1751.

Horwitz KB & McGuire WL 1979 Estrogen control of progesterone receptor induction in human breast cancer: role of nuclear estrogen receptor. *Adv.Exp.Med.Biol.* 117 95-110.

Horwitz KB, Tung L & Takimoto GS 1995 Novel mechanisms of antiprogestin action. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 53 9-17.

Hurvitz SA & Pietras RJ 2008 Rational management of endocrine resistance in breast cancer: a comprehensive review of estrogen receptor biology, treatment options, and future directions. *Cancer* 113 2385-2397.

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

Ismail PM, Amato P, Soyal SM, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW & Lydon JP 2003 Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis--as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids* 68 779-787.

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.

Johnston SR 2009 Enhancing the efficacy of hormonal agents with selected targeted agents. *Clin.Breast Cancer* 9 Suppl 1 S28-S36.

Jones PA & Baylin SB 2007 The epigenomics of cancer. *Cell* 128 683-692.

Jordan VC & Brodie AM 2007 Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids* 72 7-25.

Kalluri R & Zeisberg M 2006 Fibroblasts in cancer. *Nat.Rev.Cancer* 6 392-401.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H & Chambon P 1990 Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9 1603-1614.

King TA, Gemignani ML, Li W, Giri DD, Panageas KS, Bogomolniy F, Arroyo C, Olvera N, Robson ME, Offit K, Borgen PI & Boyd J 2004 Increased progesterone receptor expression in benign epithelium of BRCA1-related breast cancers. *Cancer Res.* 64 5051-5053.

Klijn JG, Setyono-Han B & Foekens JA 2000 Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65 825-830.

Klinge CM 2000 Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65 227-251.

Kok M, Holm-Wigerup C, Hauptmann M, Michalides R, Stal O, Linn S & Landberg G 2009 Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 101 1725-1729.

Kordon E, Lanari C, Meiss R, Charreau E & Pasqualini CD 1990 Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced in vivo by medroxyprogesterone acetate. *Breast Cancer Res.Treat.* 17 33-43.

Kordon E, Lanari C, Molinolo AA, Elizalde PV, Charreau EH & Pasqualini CD 1991 Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int.J.Cancer* 49 900-905.

Kraus WL, Montano MM & Katzenellenbogen BS 1994 Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol.Endocrinol.* 8 952-969.

Kuiper GG & Gustafsson JA 1997 The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* 410 87-90.

Kurita T, Lee KJ, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB & Cunha GR 2000 Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol.Reprod.* 62 821-830.

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

Lamb C, Simian M, Molinolo A, Pazos P & Lanari C 1999 Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70 133-142.

Lamb CA, Helguero LA, Giulianelli S, Soldati R, Vanzulli SI, Molinolo A & Lanari C 2005 Antisense oligonucleotides targeting the progesterone receptor inhibit hormone-independent breast cancer growth in mice. *Breast Cancer Res.* 7 R1111-R1121.

Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD & Charreau EH 1989 Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int.J.Cancer* 43 845-850.

Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC, Giulianelli S, Cerliani JP, Wargon V & Molinolo A 2009 The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* 16 333-350.

Lanari C, Molinolo AA & Pasqualini CD 1986a Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.* 33 215-223.

Lanari C, Molinolo AA & Pasqualini CD 1986b Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 77 157-164.

Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP & Davidson NE 1996 Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin.Cancer Res.* 2 805-810.

Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG & Rose DW 1998 Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 2920-2925.

Lazennec G, Thomas JA & Katzenellenbogen BS 2001 Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 77 193-203.

Leo JC & Lin VC 2008 The activities of progesterone receptor isoform A and B are differentially modulated by their ligands in a gene-selective manner. *Int.J.Cancer* 122 230-243.

Leonhardt SA & Edwards DP 2002 Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 227 969-980.

Leu YW, Yan PS, Fan M, Jin VX, Liu JC, Curran EM, Welshons WV, Wei SH, Davuluri RV, Plass C, Nephew KP & Huang TH 2004 Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res.* 64 8184-8192.

Li X & O'Malley BW 2003 Unfolding the action of progesterone receptors. *J.Biol.Chem.* 278 39261-39264.

Lyko F & Brown R 2005 DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J.Natl.Cancer Inst.* 97 1498-1506.

Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M & Sgroi DC 2009 Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 11 R7.

Martin LA, Farmer I, Johnston SR, Ali S & Dowsett M 2005 Elevated ERK1/ERK2/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling during long-term estrogen deprivation. *Endocr.Relat Cancer* 12 Suppl 1 S75-S84.

McGuire WL 1975 Endocrine therapy of breast cancer. *Annu.Rev.Med.* 26 353-363.

McGuire WL 1980 Steroid hormone receptors in breast cancer treatment strategy. *Recent Prog.Horm.Res.* 36 135-156.

Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL & Bird AP 1989 Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58 499-507.

Meyer ME, Pornon A, Ji JW, Bocquel MT, Chambon P & Gronemeyer H 1990 Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J* 9 3923-3932.

Michna H, Schneider MR, Nishino Y & el Etreby MF 1989a Antitumor activity of the antiprogestins ZK 98.299 and RU 38.486 in hormone dependent rat and mouse mammary tumors: mechanistic studies. *Breast Cancer Res.Treat.* 14 275-288.

Michna H, Schneider MR, Nishino Y & el Etreby MF 1989b The antitumor mechanism of progesterone antagonists is a receptor mediated antiproliferative effect by induction of terminal cell death. *J.Steroid Biochem.* 34 447-453.

Micke P & Ostman A 2005 Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 9 1217-1233.

Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD & Ralhan R 2007 Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci.* 81 280-287.

Molinolo A, Simian M, Vanzulli S, Pazos P, Lamb C & Lanari C 1998 Involvement of EGF in medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary gland hyperplasia and its role in MPA-induced mammary tumors in BALB/c mice. *Cancer Lett.* 126 49-57.

Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N & Pasqualini CD 1987 Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J.Natl.Cancer Inst.* 79 1341-1350.

Momparler RL & Bovenzi V 2000 DNA methylation and cancer. *J.Cell Physiol* 183 145-154.

Montano MM, Jaiswal AK & Katzenellenbogen BS 1998 Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta. *J.Biol.Chem.* 273 25443-25449.

Montecchia MF, Lamb C, Molinolo AA, Luthy IA, Pazos P, Charreau E, Vanzulli S & Lanari C 1999 Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 68 11-21.

Moulder SL, Craft BS & Hortobagyi GN 2008 Inhibition of receptor tyrosine kinases in combination with chemotherapy for the treatment of breast cancer. *Anticancer Agents Med.Chem.* 8 481-487.

Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ & Conneely OM 2003 Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 9744-9749.

Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP & Conneely OM 2000 Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289 1751-1754.

Muphung W, Rungsipipat A & Chatdarong K 2009 Effects of the anti-progestin aglepristone on the uterine tissue of cats administered medroxyprogesterone acetate. *Reprod.Domest.Anim* 44 Suppl 2 204-207.

Nardulli AM, Greene GL, O'Malley BW & Katzenellenbogen BS 1988 Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 122 935-944.

Normanno N, Ciardiello F, Brandt R & Salomon DS 1994 Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 29 11-27.

Normanno N, Di Maio M, De Maio E, De Luca A, de Matteis A, Giordano A & Perrone F 2005 Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12 721-747.

O'Brien CS, Howell SJ, Farnie G & Clarke RB 2009 Resistance to endocrine therapy: are breast cancer stem cells the culprits? *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 14 45-54.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA & Hynes NE 2000 The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19 3159-3167.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW 1995 Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270 1354-1357.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL & Weinberg RA 2005 Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121 335-348.

Orimo A & Weinberg RA 2006 Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5 1597-1601.

Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM & Schiff R 2003 Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 95 353-361.

Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC & Ali S 1997 Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J.Biol.Chem.* 272 25832-25838.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ & Scanlan TS 1997 Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277 1508-1510.

Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD & Robertson KD 2008 DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol.Cell Biol.* 28 752-771.

Pancholi S, Lykkesfeldt AE, Hilmi C, Banerjee S, Leary A, Drury S, Johnston S, Dowsett M & Martin LA 2008 ERBB2 influences the subcellular localization of the estrogen receptor in tamoxifen-resistant MCF-7 cells leading to the activation of AKT and RPS6KA2. *Endocr.Relat Cancer* 15 985-1002.

Pandis N, Heim S, Bardi G, Limon J, Mandahl N & Mitelman F 1992 Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer [published erratum appears in Genes Chromosom Cancer 1992 Nov;5(4):410]. *Genes Chromosomes Cancer* 5 14-20.

Parkin DM 2004 International variation. *Oncogene* 23 6329-6340.

Parkin DM 2006 The evolution of the population-based cancer registry. *Nat.Rev.Cancer* 6 603-612.

Pazos P, Lanari C, Meiss R, Charreau EH & Pasqualini CD 1992 Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and medroxyprogesterone acetate (MPA) in BALB/c mice. *Breast Cancer Res.Treat.* 20 133-138.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO & Botstein D 2000 Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406 747-752.

Petz LN & Nardulli AM 2000 Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Mol.Endocrinol.* 14 972-985.

Petz LN, Ziegler YS, Loven MA & Nardulli AM 2002 Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143 4583-4591.

Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Kim H, Kemper JK & Nardulli AM 2004 Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 88 113-122.

Pietras RJ & Szego CM 1977 Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265 69-72.

Plaza-Menacho I, Morandi A, Robertson D, Pancholi S, Drury S, Dowsett M, Martin LA & Isacke CM 2010 Targeting the receptor tyrosine kinase RET sensitizes breast cancer cells to tamoxifen treatment and reveals a role for RET in endocrine resistance. *Oncogene.*

Polisca A, Scotti L, Orlandi R, Brecchia G, Maranesi M, Zerani M & Boiti C 2010 Aglepristone (RU534) administration to non-pregnant bitches in the mid-luteal phase induces early luteal regression. *Theriogenology*.

Porter W, Saville B, Hoivik D & Safe S 1997 Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol.Endocrinol.* 11 1569-1580.

Radisky ES & Radisky DC 2007 Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion. *Rev.Endocr.Metab Disord.* 8 279-287.

Ren Y, Liu X, Ma D, Feng Y & Zhong N 2007 Down-regulation of the progesterone receptor by the methylation of progesterone receptor gene in endometrial cancer cells. *Cancer Genet.Cytogenet.* 175 107-116.

Richardson B & Yung R 1999 Role of DNA methylation in the regulation of cell function. *J.Lab Clin.Med.* 134 333-340.

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.

Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ, Rosemblit C, Beguelin W, Salatino M, Charreau EH, Frahm I, Sapia S, Brouckaert P, Elizalde PV & Schillaci R 2008 TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp.Cell Res.* 314 509-529.

Robertson JF, Willsher PC, Winterbottom L, Blamey RW & Thorpe S 1999 Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *Eur.J.Cancer* 35 214-218.

Rodriguez, L. G., Wu, X., and Guan, J. L. Wound-healing assay. Methods Mol.Biol. 294, 23-32. 2005.
Ref Type: Generic

Roemer SC, Donham DC, Sherman L, Pon VH, Edwards DP & Churchill ME 2006 Structure of the progesterone receptor-deoxyribonucleic acid complex: novel interactions required for binding to half-site response elements. *Mol.Endocrinol.* 20 3042-3052.

Roll JD, Rivenbark AG, Jones WD & Coleman WB 2008 DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. *Mol.Cancer* 7 15.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM & Ockene J 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.

Rountree MR, Bachman KE & Baylin SB 2000 DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat.Genet.* 25 269-277.

Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E & Berger R 1987 Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum.Genet.* 77 280-282.

Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D & Russo IH 2005 The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 7 131-142.

Russo J & Russo IH 2006 The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 102 89-96.

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.

Sartorius CA, Shen T & Horwitz KB 2003 Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Res.Treat.* 79 287-299.

Schneider W, Ramachandran C, Satyaswaroop PG & Shyamala G 1991 Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton 'A' form. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 38 285-291.

Schoenlein PV, Hou M, Samaddar JS, Gaddy VT, Thangaraju M, Lewis J, Johnson M, Ganapathy V, Kallab A & Barrett JT 2007 Downregulation of retinoblastoma protein is involved in the enhanced cytotoxicity of 4-hydroxytamoxifen plus mifepristone combination therapy versus antiestrogen monotherapy of human breast cancer. *Int.J.Oncol.* 31 643-655.

Schott DR, Shyamala G, Schneider W & Parry G 1991 Molecular cloning, sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor. *Biochemistry* 30 7014-7020.

Schultz JR, Petz LN & Nardulli AM 2003 Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol.Cell Endocrinol.* 201 165-175.

Selman PJ, van Garderen E, Mol JA & van den Ingh TS 1995 Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. *Vet.Q.* 17 128-133.

Sharma D, Saxena NK, Davidson NE & Vertino PM 2006 Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complexes. *Cancer Res.* 66 6370-6378.

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H & Schiff R 2004 Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 96 926-935.

Simian M, Molinolo A & Lanari C 2006 Involvement of matrix metalloproteinase activity in hormone-induced mammary tumor regression. *Am.J.Pathol.* 168 270-279.

Skafar DF 1991 Differences in the binding mechanism of RU486 and progesterone to the progesterone receptor. *Biochemistry* 30 10829-10832.

Soldati RC, Wargon V, Cerliani JP, Giulianelli S, Vanzulli S, Gorostiaga MA, Bolado J, do Campo P, Molinolo A, Vollmer G & Lanari C 2009 Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role of ERa and ERb? *Breast Cancer Research and Treatment.* - Aceptado.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein LP & Borresen-Dale AL 2001 Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 10869-10874.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL & Botstein D 2003 Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 8418-8423.

Speirs V, Malone C, Walton DS, Kerin MJ & Atkin SL 1999 Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Res.* 59 5421-5424.

Stirone C, Duckles SP & Krause DN 2003 Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 284 E184-E192.

Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL, Sansone P, Sasser AK, Tavolari S, Huang T, Chan MW, Marini FC, Rosol TJ, Bonafe M & Hall BM 2008 Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer Res.* 68 9087-9095.

Susan Clark, -aaron Statham, Clare Stirzaker, Peter L Molloy, and MArianne Frommer. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. 1 NO.5, 2352-2364. 2006.
Ref Type: Generic

Thomas DB 1991 Oral contraceptives and breast cancer: review of the epidemiologic literature. *Contraception* 43 597-642.

Thomas DB 1993 Oral contraceptives and breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 85 359-364.

Toker A & Yoeli-Lerner M 2006 Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 66 3963-3966.

Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, Morita M, Kakeji Y, Baba H & Maehara Y 2006 Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer* 13 137-144.

Tonetti DA & Jordan VC 1997 The role of estrogen receptor mutations in tamoxifen-stimulated breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 62 119-128.

Tyulmenkov VV & Klinge CM 2000 Selectivity of antibodies to estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) for detecting DNA-bound ERalpha and ERbeta in vitro. *Steroids* 65 505-512.

Vanzulli S, Efeyan A, Benavides F, Helguero LA, Peters G, Shen J, Conti CJ, Lanari C & Molinolo A 2002 p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogestin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. *Carcinogenesis* 23 749-758.

Vasilatos SN, Broadwater G, Barry WT, Baker JC, Jr., Lem S, Dietze EC, Bean GR, Bryson AD, Pilie PG, Goldenberg V, Skaar D, Paisie C, Torres-Hernandez A, Grant TL, Wilke LG, Ibarra-Drendall C, Ostrander JH, D'Amato NC, Zalles C, Jirtle R, Weaver VM & Seewaldt VL 2009 CpG island tumor suppressor promoter methylation in non-BRCA-associated early mammary carcinogenesis. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 18 901-914.

Veeck J & Esteller M 2010 Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 15 5-17.

Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW & McDonnell DP 1993 Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol.Endocrinol.* 7 1244-1255.

Viegas MH, Salatino M, Goin M, Peters G, Labriola L, Costa dc, Lanari C, Charreau EH & Elizalde PV 1999 Differential expression of and responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in hormone-dependent and independent lines of mouse mammary tumors. *Cancer Detect.Prev.* 23 375-386.

Wardell SE & Edwards DP 2005 Mechanisms controlling agonist and antagonist potential of selective progesterone receptor modulators (SPRMs). *Semin.Reprod.Med.* 23 9-21.

Wardell SE, Narayanan R, Weigel NL & Edwards DP 2010 Partial agonist activity of the progesterone receptor antagonist RU486 mediated by an amino-terminal domain coactivator and phosphorylation of serine400. *Mol.Endocrinol.* 24 335-345.

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.

Webb P, Lopez GN, Uht RM & Kushner PJ 1995 Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol.Endocrinol.* 9 443-456.

Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL & Quinn PG 1996 An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol.Endocrinol.* 10 1379-1387.

Yamashita H 2008 Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. *Int.J.Clin.Oncol.* 13 380-383.

Yan L, Nass SJ, Smith D, Nelson WG, Herman JG & Davidson NE 2003 Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol.Ther.* 2 552-556.

Yan L, Yang X & Davidson NE 2001 Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 6 183-192.

Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson WG, Herman JG & Davidson NE 2001 Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 61 7025-7029.

Zhang Y, Zhao H, Asztalos S, Chisamore M, Sitabkhan Y & Tonetti DA 2009 Estradiol-induced regression in T47D:A18/PKCalpha tumors requires the estrogen receptor and interaction with the extracellular matrix. *Mol.Cancer Res.* 7 498-510.

Zysman MA, Chapman WB & Bapat B 2002 Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am.J.Pathol.* 160 795-800.